



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **SİSTEİN TESPİTİ VE HÜCRESEL GÖRÜNTÜLEME İÇİN YENİ BİR KUMARİN BAZLI FLORESANS SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**Mohammed Adnan Abdulsalam ABDULSALAM**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN**

**ANKARA  
2026**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİSTEİN TESPİTİ VE HÜCRESEL GÖRÜNTÜLEME İÇİN YENİ  
BİR KUMARİN BAZLI FLORESANS SENSÖR  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Mohammed Adnan Abdulsalam ABDULSALAM**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Ergin YALÇIN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün TYL-  
2025-4133 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

**ANKARA**

**2026**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sistein Tespiti ve Hücrel Görüntüleme için Yeni Bir Kumarin Bazlı Floresans Sensör Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mohammed Adnan Abdulsalam ABDULSALAM

Tarih: 16.01.2026

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalında  
Mohammed Adnan Abdulsalam ABDULSALAM tarafından hazırlanan  
“Sistein Tespiti ve HücreSEL Görüntüleme için Yeni Bir Kumarin Bazlı Floresans Sensör  
Geliştirilmesi” adlı  
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile  
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.01.2026

Dr. Öğr. Üyesi Merve YENCE

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK

Ankara Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### Sistein Tespiti ve Hücresel Görüntüleme için Yeni Bir Kumarin Bazlı Floresans Sensör Geliştirilmesi

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, çok basamaklı bir sentez süreci ile yeni bir kumarin-kinolin hibrit floresans molekülü (P3) tasarlanıp sentezlenmiştir. Geliştirilen probun ve özgün ara ürünlerinin karakterizasyonu  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR ve HR-MS ile gerçekleştirilmiştir. Prob, 407 nm’de uyarıldığında 497 nm’de emisyon göstermiş, serbest tiyol gruplarına bağlandığında ise floresans şiddetinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu gözlem, probun biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesinde kullanılabilmesini sağlamıştır. Hücre boyama deneylerinde elde edilen yüksek etkinlik, probun canlı hücre görüntüleme tekniklerinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Probu serbest tiyoller ile etkileştiğinde şiddetli floresans artışı göstermesi, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden ayrımında önemli bir avantaj sunmaktadır. Kanserli hücrelerde derişimi yüksek olan glutatyon ile gerçekleşen etkileşim sayesinde kanser hücrelerinin seçici olarak tespit edilmesi mümkün olmuştur. Kanserli akciğer hücrelerinde (HT-29) ve kolon hücrelerinde (A549) floresans şiddetinin belirgin şekilde arttığı; buna karşın sağlıklı akciğer (FHC) ve kolon hücrelerinde (BEAS) düşük emisyon verdiği gözlemlenmiştir.

Geliştirilen floresans probun ayrıca proteinlerin üçüncül yapılarının doğrulanması için serbest tiyol miktarının belirlenmesinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu kapsamda insan serum albümini ve  $\alpha$ -sinüklein proteinleri üzerinde yapılan testler, probun protein konformasyonunun incelenmesinde etkin bir araç olduğunu kanıtlamıştır.

Analitik validasyon çalışmalarında, probun sistein ve glutatyon tayininde belirlenen aralıkta doğrusal yanıt verdiği belirlenmiştir. Ayrıca doğruluk ve kesinlik testleri sonucunda elde edilen geri kazanım oranlarının %98-101 arasında olması ve %2’den küçük bağıl standart sapma (BSS) değerleri, probun güvenilirliğini ve tekrar edilebilirliğini ortaya koymuştur. Seçicilik çalışmalarında, sistein sinyali %100 artırırken, tiyol içermeyen moleküller yalnızca %10’a kadar artış göstermiştir.

Son olarak gıda takviyelerinde seçici bir kantitatif araç olarak kullanılabilirliği L-sistein içeren takviyelerde test edilmiş ve Ellman reaktifi ile karşılaştırma testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, floresans probun bu amaçla da kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen kumarin türevi floresans prob, hem proteinlerin üçüncül yapıların incelenmesinde hem de kanser hücrelerinin seçici olarak görüntülenmesinde yüksek potansiyele sahip, güvenilir ve etkin bir araç olarak öne çıkmaktadır. Bu özellikler, probun klinik tanı uygulamalarında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Floresans Prob, Hücre Görüntüleme, Optik Sensör, Serbest Tiyoller

## SUMMARY

### **Development of a Novel Coumarin-Based Fluorescence Sensor for Cysteine Detection and Cellular Imaging**

In this master's thesis study, a novel 3-aryl-substituted coumarin-derived fluorescent probe was designed and synthesized through a multi-step synthetic process. The developed probe exhibited emission at 497 nm upon excitation at 407 nm. A significant increase in fluorescence intensity was observed upon binding to free thiol groups, enabling the probe to be utilized in the investigation of biomolecular interactions. High efficiency obtained in cell staining experiments demonstrated that the probe can be successfully applied in live-cell imaging techniques.

The pronounced fluorescence enhancement upon interaction with free thiols provides a major advantage in distinguishing cancer cells from healthy cells. Through interaction with glutathione, which is present at high concentrations in cancer cells, selective detection of cancer cells was achieved. In cancerous lung cells (HT-29) and colon cells (A549), fluorescence intensity increased markedly, whereas healthy lung (FHC) and colon cells (BEAS) exhibited low emission.

Furthermore, the applicability of the developed fluorescent probe in determining free thiol content for the validation of protein tertiary structures was demonstrated. Tests performed on human serum albumin and  $\alpha$ -synuclein proteins confirmed that the probe is an effective tool for investigating protein conformation.

Analytical validation studies revealed that the probe provided a linear response within the defined range for cysteine and glutathione determination. Moreover, the recovery rates obtained from accuracy and precision tests being in the range of 98-101%, together with relative standard deviation (RSD) values below 2% demonstrated the reliability and repeatability of the probe. In the selectivity studies, cysteine increased the signal by 100%, whereas molecules lacking thiol groups showed only a minor increase of up to 10%.

Finally, the probe's applicability as a selective quantitative tool in dietary supplements was tested in L-cysteine-containing supplements, with comparative assays performed against Ellman's reagent. The results demonstrated that the fluorescent probe can also be used for this purpose.

In conclusion, the coumarin-derived fluorescent probe developed in this study emerges as a reliable and effective tool with high potential both for investigating protein tertiary structures and for selective imaging of cancer cells. With these properties, the probe is considered a valuable candidate for clinical diagnostic applications.

**Keywords:** Cell imaging, Fluorescent probe, Free thiols, Optical sensor

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Etik Beyan                                                                                                             | ii   |
| Kabul ve Onay                                                                                                          | iii  |
| Özet                                                                                                                   | iv   |
| Summary                                                                                                                | v    |
| İçindekiler                                                                                                            | vi   |
| Önsöz                                                                                                                  | viii |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                                                                | xi   |
| Şekiller                                                                                                               | xiii |
| Çizelgeler                                                                                                             | xv   |
| <br>                                                                                                                   |      |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                                        | 1    |
| 1.1. Giriş ve Amaç                                                                                                     | 1    |
| 1.2. Serbest Tiyoller                                                                                                  | 2    |
| 1.2.1. Sistein                                                                                                         | 3    |
| 1.2.2. Glutasyon                                                                                                       | 4    |
| 1.2.3. Glutasyon ve Sisteinin Gıda Takviyelerindeki Kullanımı                                                          | 5    |
| 1.2.4. Proteinlerdeki Disülfid-Tiyol Ayrımının Önemi                                                                   | 6    |
| 1.2.5. Serbest Tiyollerin Tayini için Kullanılan Analitik Yöntemler                                                    | 7    |
| 1.3. Optik Sensörler                                                                                                   | 8    |
| 1.3.1. Floresans Spektroskopisi                                                                                        | 9    |
| 1.3.2. Kumarin Bazlı Optik Sensörler                                                                                   | 10   |
| 1.4. Hücre Görüntüleme Teknikleri                                                                                      | 10   |
| 1.4.1. Kanser Hücrelerinde Glutasyon Artışı ve Görüntüleme Uygulamaları                                                | 11   |
| <br>                                                                                                                   |      |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                                              | 13   |
| 2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler                                                                              | 13   |
| 2.2. Cihazlar                                                                                                          | 14   |
| 2.3. P3 Bileşiğinin Sentezi                                                                                            | 14   |
| 2.3.1. 4-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)fenil asetat P1 Bileşiğinin Sentezi                                    | 14   |
| 2.3.2. 5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksibenzaldehit P2 Bileşiğinin Sentezi                          | 15   |
| 2.3.3. 2-(5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksistiril)-1-etilkinolinyum-1 iyodür P3 Bileşiğinin Sentezi | 15   |
| 2.4. Çözeltilerin Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmaları                                                             | 16   |
| 2.5. Hücre Görüntüleme Çalışmaları                                                                                     | 17   |
| <br>                                                                                                                   |      |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                     | 19   |
| 3.1. Karakterizasyonu Bulguları                                                                                        | 19   |
| 3.1.1. P1'in Yapı Karakterizasyonu                                                                                     | 19   |
| 3.1.2. P2'nin Yapı Karakterizasyonu                                                                                    | 20   |
| 3.1.3. P3'ün Yapı Karakterizasyonu                                                                                     | 22   |
| 3.1.4. P3'ün Optik Özellikleri                                                                                         | 23   |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Çözücü Ortamının Floresans Özellikleri Üzerindeki Etkisi           | 24        |
| 3.3. P3 - Sertbest Tiyol Etkileşimi                                     | 25        |
| 3.3.1. Optimizasyon                                                     | 25        |
| 3.3.1.1. pH                                                             | 25        |
| 3.3.1.2. Etkileşim Süresi                                               | 26        |
| 3.3.2. Analitik Performans                                              | 27        |
| 3.3.2.1. P3 - Cys Titrasyonu                                            | 27        |
| 3.3.2.2. P3 - GSH Titrasyonu                                            | 28        |
| 3.3.3. Validasyon Çalışmaları                                           | 30        |
| 3.3.3.1. Tekrar edilebilirlik                                           | 30        |
| 3.3.3.2. Seçicilik                                                      | 30        |
| 3.4. P3'ün Serbest Tiyollere Karşı Algılama Mekanizması                 | 31        |
| 3.5. Bağlanma Stokiyometrisi                                            | 34        |
| 3.6. Difülfıt-Serbest Tiyol Tayini ve Uygulamaları                      | 35        |
| 3.6.1. Proteinlerin Üçüncül Yapılarının Karakterizasyonu için ST Tayini | 35        |
| 3.6.2. ALA Disülfıt-ST Tayini                                           | 36        |
| 3.6.3. Gıda Takviyelerinde ST Tayini                                    | 37        |
| 3.7. Hücre Görüntüleme Tekniğı                                          | 39        |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                      | <b>42</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                             | <b>50</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                        | <b>52</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                         | <b>59</b> |

## ÖNSÖZ

Sistein, hücrelerin korunması ve vücudun sağlıklı kalma süreçlerinde önemli bir rol üstlenen temel bir moleküldür. Bu bileşiğin miktarının doğru şekilde belirlenmesi, hastalıkların erken dönemde fark edilmesine katkı sağlamakta ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak tanımaktadır. Sistein düzeylerinin tayini, yalnızca tıp alanında değil, aynı zamanda gıda güvenliği açısından da büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle sisteinin hassas ve seçici biçimde ölçülmesine yönelik yöntemlerin geliştirilmesi, insan sağlığına yönelik çalışmalarda değerli bir katkı sunmaktadır.

Literatürde mevcut yöntemlerin sınırlılıklarını aşmayı amaçlayan bu çalışma hem analitik kimya hem de biyomedikal uygulamalar açısından özgün bir yaklaşım sunmaktadır. Protein konformasyonlarının incelenmesi, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden ayrımı ve biyolojik sistemlerde tiyol tayini gibi kritik alanlarda sağladığı bulgular, gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutacak niteliktedir. Böylece tez, yalnızca deneysel bir katkı değil, aynı zamanda literatürde yeni bir perspektif kazandıran bilimsel bir değer ortaya koymaktadır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi birikimi, yol göstericiliği ve akademik desteğiyle bana ilham veren, bilimsel bakış açımı geliştirmemde büyük katkılar sağlayan değerli danışmanımın desteğini her daim hissettim. Sabırlı ve anlayışlı tutumuyla yalnızca akademik değil, aynı zamanda kişisel gelişimime de ışık tuttu, bana bilimsel disiplinin yanında azim, kararlılık ve sorumluluk bilincini kazandırdı. Onunla çalışmak benim için büyük bir gurur olmasının yanı sıra, aynı zamanda kendimi çok şanslı hissettiğim bir ayrıcalık olmuştur. Tüm bu katkılarından dolayı, birlikte çalışmaktan büyük bir onur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesi sürecinde eş danışmanım olarak değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama önemli katkılar sağlayan, ayrıca bilimsel görüşleriyle bana yol gösteren Doç. Dr. Ergin YALÇIN hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmamın değerli katkılarıyla sürecin ilerlemesine büyük destek sağlayan ve araştırmamın daha sağlam temeller üzerine inşa edilmesine yardımcı olan Prof. Dr. Jonathan L. Sessler, Prof. Dr. Ferda HACİVELİOĞLU ve Arş. Gör. Halil DUYAR hocalarıma çok teşekkür ederim

Yüksek lisans eğitimim süresince güler yüzü, samimi sohbetleri ve destekleyici yaklaşımıyla bizlere her zaman moral ve motivasyon sağlayan, üstün başarısı,engin bilgisi ve

akademik duruşuyla örnek aldığım saygı değer Analitik Kimya Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN hocama çok teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, değerli bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşarak gelişimimize önemli katkılar sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, araştırma görevlilerine ve idari personeline teşekkür ederim.

Bilime adanmışlığı, çalışkanlığı ve üstün başarısıyla her zaman örnek aldığım, azmiyle bana ilham veren ve birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve şans duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca, her zaman desteklerini hissettiğim, bilgilerini ve tecrübelerini titizlikle aktaran, güler yüzlü ve samimi yaklaşımıyla bizlere daima yakın olan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÇETİNKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Merve YENCE'ye içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda duran, desteğini esirgemeyen, neşesiyle bana moral kaynağı olan ve edinebildiğim en değerli arkadaşlardan biri olan Gülsu KELEŞ'e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans sürecimin en büyük kazanımları arasında yer alan, zorlu süreçleri kolaylaştıran ve güzelleştiren, birlikte unutulmaz anılar biriktirdiğimiz, her türlü sıkıntıda ve mutluluğumda yanımda olan ve ailem olarak gördüğüm kıymetli ekip arkadaşlarım Arş. Gör. Cansu BEYRET, Betül YÜKSELOĞLU, Ülkü Nisa YILMAZ, Büşra Canan ASLAN, Amr AL-JABI, Eray KARATAŞOĞLU ve İrem TECİMAN'a teşekkürlerimi sunarım. Bununla birlikte, gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalar ve aktivitelerde birlikte çok güzel zamanlar geçirdiğim değerli arkadaşlarım Ensar PİŞKİN ve İclal ATAY'a de içten teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bursiyeri olmaktan gurur duyduğum TÜBİTAK ARDEB, TÜBİTAK 1001 ve TÜBİTAK COST 2515/SBAK projelerinde bursiyer Araştırmacı olarak yer alma fırsatı bulduğum için minnettarım. Bu projeler kapsamında sağlanan destek, akademik gelişimime ve tez çalışmamın ilerlemesine önemli katkılar sağlamıştır.

Yüksek lisans çalışmalarına TYL-2025-4133 kodlu projemiz ile destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof. Dr. Fügen AKTAN'a, değerli öğretim üyelerine ve tüm çalışan personele çok teşekkür ederim.

En büyük teŖekkürümü hayatım boyunca tüm desteklerini esirgemeyen, bana güvenleriyle güç veren, kararlarımaya duydukları saygıyla her zaman yanımda olan ve bana daima doğru yolu gösteren sevgili anneme ve babama sunarım. Bununla birlikte, her zaman sevgileriyle yanımda olan, bana örnek teşkil eden ve hayatımı güzelleştiren ablalarımaya da çok teŖekkür ederim.



## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                     |                                            |
|---------------------|--------------------------------------------|
| %ΔF                 | Normalize edilmiş floresans şiddetin farkı |
| <sup>13</sup> C-NMR | Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans        |
| <sup>1</sup> H-NMR  | Proton Nükleer Manyetik Rezonans           |
| A549                | İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı          |
| Abs                 | Absorbans                                  |
| ACN                 | Asetonitril                                |
| AcOH                | Asetik asit                                |
| ALA                 | α-Lipoik asit                              |
| BEAS                | Normal İnsan Akciğer Epitel Hücre Hattı    |
| BSA                 | Bovin serum albümini                       |
| BSS                 | Bağıl standart sapma                       |
| CE                  | Kapiler elektroforez                       |
| Cys                 | Sistein                                    |
| d                   | dörtlü                                     |
| D-Cys               | D-sistein                                  |
| DHALA               | dihidrolipoik asit                         |
| Dk                  | Dakika                                     |
| DMF                 | Dimetilformamid                            |
| DMSO                | Dimetilsülfoksit                           |
| DTNB                | 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)        |
| EDTA                | Etilendiamintetraasetik asit               |
| eq                  | Ekivalan                                   |
| F                   | Floresans şiddeti                          |
| F <sub>0</sub>      | Analit yokluğundaki floresans şiddeti      |
| FHC                 | Normal İnsan Kolon Epitel Hücre Hattı      |
| FL                  | Floresans                                  |
| FLIM                | Fluorescence lifetime imaging microscopy   |
| GSH                 | Glutatyon                                  |
| Hcy                 | Homosistein                                |
| HMBC                | Heteronuclear Multiple Bond Correlation    |
| HMTA                | Hekzametilentetramin                       |
| HRMS                | Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi   |
| HT-29               | İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı            |
| ICT                 | Intramoleküler yük transferi               |
| i                   | ikili                                      |
| ii                  | ikilinin iklisi                            |

|                   |                                                                                          |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| L-Cys             | L-sistein                                                                                |
| MeOH              | Metanol                                                                                  |
| MS                | Kütle spektrometrisi                                                                     |
| NIR               | Yakın kızılötesi                                                                         |
| nm                | nanometre                                                                                |
| NMR               | Nükleer Magnetik Rezonans                                                                |
| P1                | 4-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)fenil asetat                                    |
| P2                | 5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksibenzaldehit                          |
| P3                | 2-(5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksistiril)-1-etilkinolinyum-1 iyodür |
| ppm               | Kimyasal kayma                                                                           |
| ROS               | Reaktif oksijen türleri                                                                  |
| RSD               | Relative standard deviation                                                              |
| ST                | Serbest tiyol                                                                            |
| t                 | tekli                                                                                    |
| TS                | Teşhis sınırı                                                                            |
| TNB <sup>2-</sup> | 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit                                                               |
| UV                | Ultraviyole                                                                              |
| ü                 | üçlü                                                                                     |
| YPSK              | Yüksek performanslı sıvı kromatografi                                                    |
| $\alpha$ -syn     | $\alpha$ -sinüklein                                                                      |
| $\Delta F$        | Floresans şiddetin farkı                                                                 |
| $\mu M$           | mikromolar                                                                               |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. P3 Molekülü                                                                                                                                                     | 2  |
| Şekil 1.2. Cys molekülü                                                                                                                                                    | 4  |
| Şekil 1.3. GSH molekülü                                                                                                                                                    | 4  |
| Şekil 1.4. Oksidatif stresin hücre üzerindeki etkisi                                                                                                                       | 5  |
| Şekil 1.5. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları                                                                                                   | 7  |
| Şekil 1.6. Absorbsiyon ve floresans için kısmi enerji diyagramı (Skoog vd., 2014)                                                                                          | 9  |
| Şekil 1.7. Kumarin molekül yapısı                                                                                                                                          | 10 |
| Şekil 2.1. P3 molekülünün sentez yolu                                                                                                                                      | 16 |
| Şekil 3.1. P1'in <sup>1</sup> H NMR spektrumu                                                                                                                              | 19 |
| Şekil 3.2. P1'in <sup>13</sup> C NMR spektrumu                                                                                                                             | 19 |
| Şekil 3.3. P1'in kütle spektrumu                                                                                                                                           | 20 |
| Şekil 3.4. P2'nin <sup>1</sup> H NMR spektrumu                                                                                                                             | 21 |
| Şekil 3.5. P2'nin <sup>13</sup> C NMR spektrumu                                                                                                                            | 21 |
| Şekil 3.6. P2'nin kütle spektrumu                                                                                                                                          | 22 |
| Şekil 3.7. P3'ün <sup>1</sup> H NMR spektrumu                                                                                                                              | 22 |
| Şekil 3.8. P3'ün <sup>13</sup> C NMR spektrumu                                                                                                                             | 23 |
| Şekil 3.9. P3'ün kütle spektrumu                                                                                                                                           | 23 |
| Şekil 3.10. 10 µM P3 molekülünün emisyon spektrumu                                                                                                                         | 24 |
| Şekil 3.11. 10 µM P3 molekülünün UV absorbans spektrumu                                                                                                                    | 24 |
| Şekil 3.12. P3 molekülünün farklı çözücülerde emisyon spektrumları (su:DMSO 19:1 v:v)                                                                                      | 25 |
| Şekil 3.13. pH'nın floresans yanıtına etkisi                                                                                                                               | 26 |
| Şekil 3.14. P3 molekülü ile analit arasındaki etkileşim süresinin floresans yanıtına etkisi                                                                                | 26 |
| Şekil 3.15. pH 7 koşullarında 10 µM P3 molekülünün emisyon spektrumları; farklı L-Cys konsantrasyonlarının floresans şiddeti üzerindeki etkisi (normalize edilmiş veriler) | 27 |
| Şekil 3.16. L-Cys için doğrusal yanıt aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                            | 28 |
| Şekil 3.17. L-Cys ile 10 µM P3 molekülünün UV absorbans titrasyonu                                                                                                         | 28 |
| Şekil 3.18. pH 7 koşullarında 10 µM P3 molekülünün emisyon spektrumları; farklı GSH konsantrasyonlarının floresans şiddeti üzerindeki etkisi (normalize edilmiş veriler)   | 29 |
| Şekil 3.19. GSH için doğrusal yanıt aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                              | 29 |
| Şekil 3.20. P3 molekülünün serbest tiyollere ve diğer amino asitler ile bileşiklere verdiği yanıt                                                                          | 31 |
| Şekil 3.21. Biyotiyollerin tespitinde P3 molekülü için önerilen reaksiyon mekanizması. Mekanizma adımlarında temsil molekül olarak Cys seçilmiştir                         | 32 |
| Şekil 3.22. P3 molekülünün DMSO içinde ve (3 eq) L-Cys varlığında (DMSO/H <sub>2</sub> O, v/v 7:3) <sup>1</sup> H-NMR spektrumları                                         | 33 |
| Şekil 3.23. P3 molekülünün <sup>1</sup> H-NMR spektrumları; L-Cys yokluğunda ve (3 eq) L-Cys varlığında (d <sub>6</sub> -DMSO)                                             | 33 |
| Şekil 3.24. P3 molekülünün HMBC spektrumları; (3 eq) L-Cys varlığında (d <sub>6</sub> -DMSO)                                                                               | 34 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.25.</b> P3-Cys etkileşimi için Job's plot grafiği                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 35 |
| <b>Şekil 3.26.</b> Sensörün proteinlere ve disülfid içeren moleküllere verdiği floresans yanıtı, $\alpha$ -sinüklein ve BSA ile etkileşim sonrası gözlenen floresans değişimleri                                                                                                                                                                                                | 36 |
| <b>Şekil 3.29.</b> P3 ile muamele edilmiş kanserli akciğer hücreleri (HT-29) floresans mikroskobu görüntüsü                                                                                                                                                                                                                                                                     | 39 |
| <b>Şekil 3.30.</b> P3 ile muamele edilmiş sağlıklı akciğer hücreleri (FHC) floresans mikroskobu görüntüsü                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Şekil 3.31.</b> P3 ile muamele edilmiş kanserli kolon hücreleri (A549) floresans mikroskobu görüntüsü                                                                                                                                                                                                                                                                        | 40 |
| <b>Şekil 3.32.</b> P3 ile muamele edilmiş sağlıklı kolon hücreleri (BEAS-2B) floresans mikroskobu görüntüsü                                                                                                                                                                                                                                                                     | 41 |
| <b>Şekil 3.33.</b> Hücrelerin 20x büyütmede floresans mikroskopi görüntüleri: (A) 5 $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş kanserli akciğer hücreleri (HT-29), (B) 5 $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş sağlıklı akciğer hücreleri (FHC), (C) 2,5 $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş kanserli kolon hücreleri (A549), (D) 2,5 $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş sağlıklı kolon hücreleri (BEAS-2B) | 41 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.1.</b> Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları ( $n = 3$ ) | 30 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Ellman ve P3 yöntemleri ile bir adet kapsülde bulunan Cys miktarı    | 38 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> Gıda takviyesi analizinde uygulanan t-testi sonuçları                | 38 |



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Giriş ve Amaç

Tiyol grubu içeren biyomoleküller, hücrel redoks dengesi, sinyal iletimi ve detoksifikasyon süreçlerinde kritik roller üstlenmektedir (Gai vd., 2018; Lai vd., 2010; Zhu vd., 2014). Bu moleküller, hücre içi oksidatif stresin düzenlenmesinde ve zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) nötralize edilmesinde temel işlevlere sahiptir (Ghanizadeh vd., 2012). Özellikle sistein (Cys), homosistein (Hcy) ve glutatyon (GSH) gibi düşük molekül ağırlıklı biyotiyoller, redoks homeostazının korunmasında kilit rol oynar (Ghobadloo vd., 2024; Li vd., 2024; Huilin Wang vd., 2012). GSH, hücre içi en bol bulunan tiyol bileşiği olup, antioksidan savunma sisteminin merkezinde yer alır (Ghanizadeh vd., 2012). Cys ise proteinlerin yapısal stabilitesini sağlayan disülfid bağlarının oluşumunda görev alırken, Hcy düzeyleri kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Radzinski vd., 2021; Huilin Wang vd., 2012).

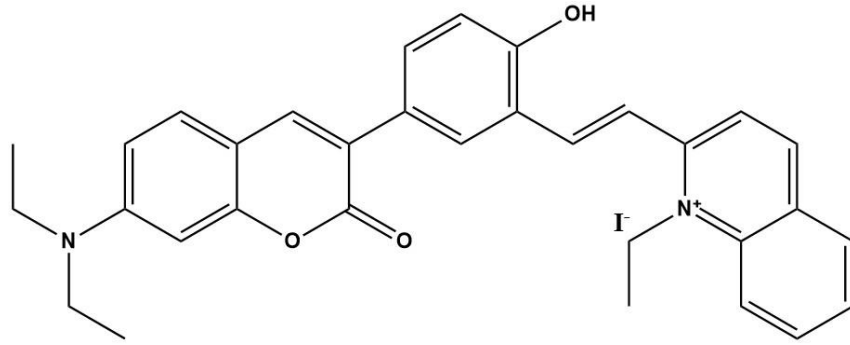
Bu biyotiyollerin düzeylerindeki değişimler, çeşitli patofizyolojik durumların erken teşhisi ve izlenmesi açısından önemli biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir (Haseena vd., 2022; Hyslop vd., 2023). Özellikle kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi hastalıklarda tiyol/disülfid dengesi bozulmakta, bu da hücrel hasarın ve hastalık progresyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilmektedir (Akunal ve Alisik, 2024; Semenovich vd., 2021). Dolayısıyla, biyotiyollerin hassas, seçici ve hızlı bir şekilde tespiti hem temel biyolojik araştırmalar hem de klinik tanı uygulamaları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda geliştirilen analitik yöntemlerin, biyolojik örneklerde düşük konsantrasyonlarda bulunan tiyol gruplarını ayırt edebilmesi ve gerçek zamanlı izleme kapasitesine sahip olması gerekmektedir.

Floresans probalar, bu gereksinimleri karşılayan güçlü araçlar olarak öne çıkmaktadır. Yüksek duyarlılıkları, düşük algılama sınırları, hızlı yanıt süreleri ve canlı hücrelerde görüntüleme imkanı sunmaları nedeniyle biyotiyol tespiti için ideal platformlardır (Zhang vd., 2014).

Literatürde kumarin yapısına kinolinyum gibi hetaril yapıların eklenmesiyle, tiyol gruplarına karşı daha seçici ve duyarlı floresans probalar geliştirilmiştir (Tan vd., 2014). Kinolinyum grubu, tiyol ile nükleofilik etkileşimlere girerek “turn-on” tipi floresans yanıtı oluşturabilir (Hu vd., 2023). Bu tür hibrit yapılar hem çözeltide hem de hücrel ortamlarda biyotiyol tespiti için potansiyel taşırlar.

Bu tezde, tiyol grubu içeren biyomoleküllerin seçici ve yüksek duyarlılıkla tayini amacıyla kumarin-kinolinyum temelli yeni bir floresans prob geliştirilmiş; tasarım, sentez, karakterizasyon ve uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.1). Çalışmalar sonucunda probun hem çözeltide hem de biyolojik ortamlarda yüksek özgüllük ve sinyal-gürültü oranı ile etkin şekilde kullanılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, kanserli hücrelerin teşhisi, proteinlerin üçüncül yapılarının incelenmesi ve gıda takviyesi ürünlerinde yer alan serbest tiyol (ST) içeren moleküllerin hassas tayini gibi farklı uygulama alanlarında probun başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir.

Geliştirilen probun düşük miktarda organik çözücü ile kullanılabilmesi, toksisite riskini azaltarak hem temel biyolojik araştırmalarda hem de klinik tanı uygulamalarında güvenli kullanım potansiyeli sunmaktadır. Bunun yanı sıra, probun canlı hücre görüntüleme teknikleri ile uyumlu olması, tiyol grubu içeren biyomoleküllerin hücre içi lokalizasyonunun ve dinamik değişimlerinin gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlükte izlenmesine olanak sağlamaktadır. Böylece hem in vivo hastalık analizlerinde hem de in vitro hücre kültürü tabanlı deneylerde, biyomoleküler değişimlerin görsel olarak kolayca ayırt edilebildiği, hızlı ve güvenilir bir analiz platformu geliştirilmiştir. Bu yaklaşım, hem kanser biyolojisi gibi karmaşık patolojik süreçlerin aydınlatılmasına hem de hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek niteliktedir.



Şekil 1.1. P3 Molekülü

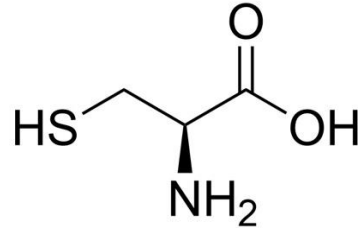
## 1.2. Serbest Tiyoller

Serbest tiyoller, hücre içi redoks homeostazının korunmasında temel rol oynayan sülfhidril (-SH) grubu içeren organik bileşiklerdir (Lai vd., 2010; Zhang vd., 2024). Bu tiyol grupları, oksidatif stres koşullarında reaktif oksijen türleriyle etkileşime girerek disülfid (-S-S-) bağlarına dönüşür; bu dönüşüm geri dönüşümlü olup dinamik bir redoks döngüsünün parçasıdır (Paulsen ve Carroll, 2013). Disülfid bağlarının oluşumu, proteinlerin yapısal

stabilitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, hücrel sinyal iletimi ve apoptozis gibi yaşamsal süreçlerde de görev alır (Riemer vd., 2015). Tiyol-disülfid dönüşümleri, hücrelerin çevresel stres faktörlerine adaptasyonunu sağlayan hassas bir redoks sensör sistemi gibi çalışır. Ancak bu homeostazın bozulması, oksidatif stresin artmasına ve çeşitli hastalıkların patogeneze neden olur (Akunal ve Alisik, 2024; Semenov vd., 2021). Örneğin, kronik hepatit B hastalarında yapılan çalışmalar, total ve nativ tiyol düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığını, buna karşın disülfid oranlarında belirgin bir değişiklik olmadığını göstermiştir; bu durum, antioksidan kapasitenin azaldığını ancak disülfid oluşumunun dengeleyici bir yanıt olarak sabit kaldığını düşündürmektedir (Yıldır ve Meriç Koç, 2018). Benzer şekilde, diyabetik ve diyabetik olmayan kronik böbrek yetmezliği hastalarında tiyol-disülfid homeostazının bozulduğu ve ileri oksidasyon protein ürünleri düzeylerinin arttığı bildirilmiştir; bu da oksidatif stresin hastalık progresyonunda önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Coşkun vd., 2016; Solak vd., 2020). Aynı zamanda disülfid bağlarında meydana gelen düzensizlikler, proteinlerin yanlış katlanmasına ve agregat oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum özellikle  $\alpha$ -sinüklein ve Tau gibi proteinlerde gözlenmiş olup, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde ve teşhisinde kritik bir rol oynamaktadır (Sweeney vd., 2017). Bu bulgular, tiyol-disülfid homeostazının sadece hücrel savunma mekanizması olarak değil, aynı zamanda hastalıkların tanı, prognoz ve tedavi takibinde potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Wang vd., 2017). Disülfid bağlarının oluşumu, hücrelerin oksidatif yük altında verdiği biyokimyasal yanıtın bir göstergesi olup, bu bağların kantitatif olarak ölçülmesiyle hastalıkların redoks temelli biyolojik izleri daha net şekilde ortaya konulabilir. Dolayısıyla, serbest tiyollerin disülfid bağlarına dönüşüm süreci, hem moleküler düzeyde hücrel adaptasyonun bir parçası hem de klinik düzeyde hastalıkların izlenmesinde değerli bir parametredir (Erel ve Erdoğan, 2020).

### 1.2.1. Sistein

Cys, proteinleri oluşturan 20 temel amino asitten biridir ve yan zinciri serbest tiyol (-SH) grubu barındırır (Şekil 1.2.) (Zhang vd., 2024). Bu özellik, onu diğer amino asitlerden ayırır ve redoks reaksiyonlarında aktif rol almasını sağlar (Zhu vd., 2014). Doğada aktif formu olan L-Cys, hücre içi metabolik süreçlerde önemli görevler üstlenir (Gao vd., 2024). Özellikle disülfid bağları oluşturma yeteneği sayesinde proteinlerin üç boyutlu yapısının stabilitesini korur. Bu bağlar, iki Cys molekülü arasında oluşur ve proteinlerin katlanma, dayanıklılık ve fonksiyonel özelliklerini belirlemede kritik rol oynar (Feige vd., 2018a).



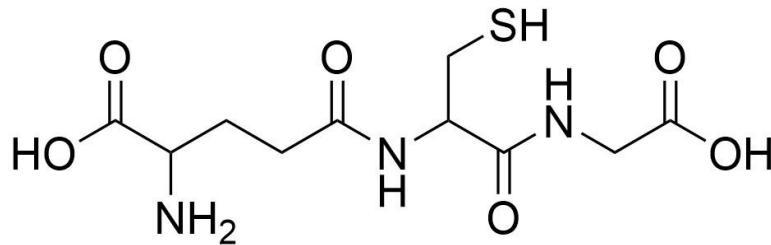
**Şekil 1.2.** Cys molekülü

Cys düzeylerinin normal aralıkta olması (200 µM civarı), hücresel fonksiyonların sağlıklı şekilde sürdürülmesi açısından önemlidir. Eksikliği durumunda bağışıklık sistemi zayıflayabilir, kas ve cilt sağlığı bozulabilir, büyüme geriliği, yorgunluk ve karaciğer fonksiyonlarında bozulmalar görülebilir (Rasheed vd., 2019). Öte yandan, aşırı Cys birikimi nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Özellikle Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda Cys metabolizmasındaki bozuklukların oksidatif stres üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir (Paul vd., 2018; Safavi vd., 2014).

Cys, hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir antioksidan olan GSH sentezinde temel bileşen olarak görev yapar (McCarty ve DiNicolantonio, 2015).

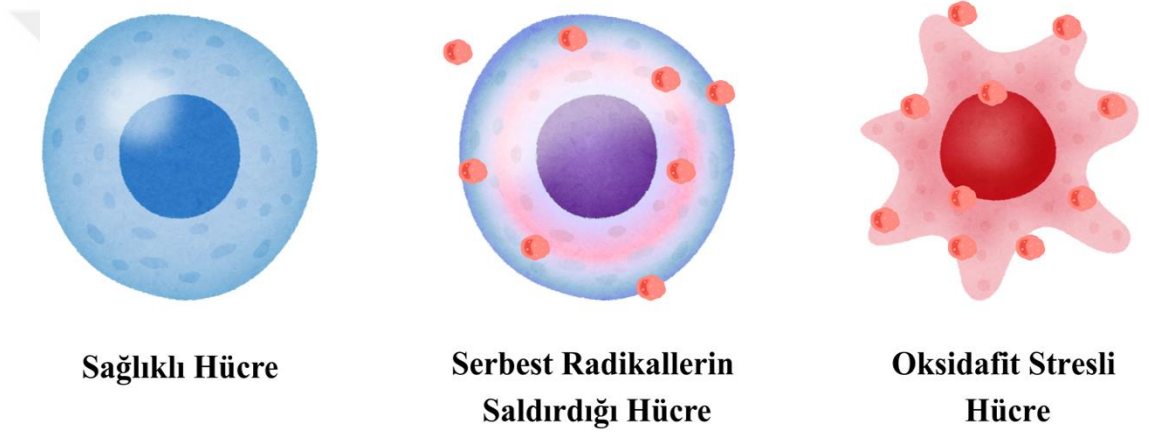
### 1.2.2. Glutatyon

Glutatyon (GSH), hücre içi redoks dengesinin korunmasında kritik rol oynayan ve üç amino asitten (glutamat, Cys, glisin) oluşan bir tripeptittir (Şekil 1.3.). Özellikle indirgenmiş formu olan GSH, vücudun en güçlü antioksidanlarından biri olarak kabul edilir. Bu form, serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korur ve detoksifikasyon süreçlerinde aktif görev alır (Galano ve Alvarez-Idaboy, 2011). GSH, karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve toksinlerin, ağır metallerin ve reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında temel bir bileşen olarak işlev görür (Wu vd., 2004).



**Şekil 1.3.** GSH molekülü

Normal GSH düzeyleri yaklaşık 1-10 mM olarak bilinir, bağışıklık sisteminin etkinliği, hücre yenilenmesi ve mitokondriyal fonksiyonların sağlıklı şekilde sürdürülmesi açısından hayati öneme sahiptir. Normal değerlerin dışına çıktığı durumlarda kronik yorgunluk, enfeksiyonlara yatkınlık, cilt problemleri ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bazı durumlar ortaya çıkabilir. Bu hastalıklarda GSH metabolizmasındaki bozulmaların, oksidatif stresin artışıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.4.). Ayrıca, bazı kanser türlerinde GSH düzeylerinin normalin üzerinde olması, hastalığın gelişimi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, GSH'nin biyolojik bir belirteç (biyomarker) olarak kullanımı, tanı ve tedavi sürecinin izlenmesinde potansiyel bir araç olarak değerlendirilmektedir (Balendiran vd., 2004; Mazzetti vd., 2015).



Şekil 1.4. Oksidatif stresin hücre üzerindeki etkisi

### 1.2.3. Glutasyon ve Sisteinin Gıda Takviyelerindeki Kullanımı

GSH ve Cys, hücresel redoks homeostazının korunmasında ve oksidatif stresin azaltılmasında kritik öneme sahip biyomoleküllerdir. GSH, güçlü bir endojen antioksidan olarak detoksifikasyon süreçlerinde görev almakta, Cys ise hem GSH biyosentezinin öncül bileşiği hem de protein yapılarında disülfid bağlarının oluşumunda temel bir amino asit olarak rol oynamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle her iki molekül de ticari gıda takviyelerinde yaygın biçimde kullanılmakta, bağışıklık fonksiyonlarının desteklenmesi, yaşlanmaya bağlı oksidatif hasarın azaltılması ve hücresel metabolizmanın güçlendirilmesi amacıyla formülasyonlara dahil edilmektedir (Garrido Ruiz vd., 2022; Kersick ve Willoughby, 2005).

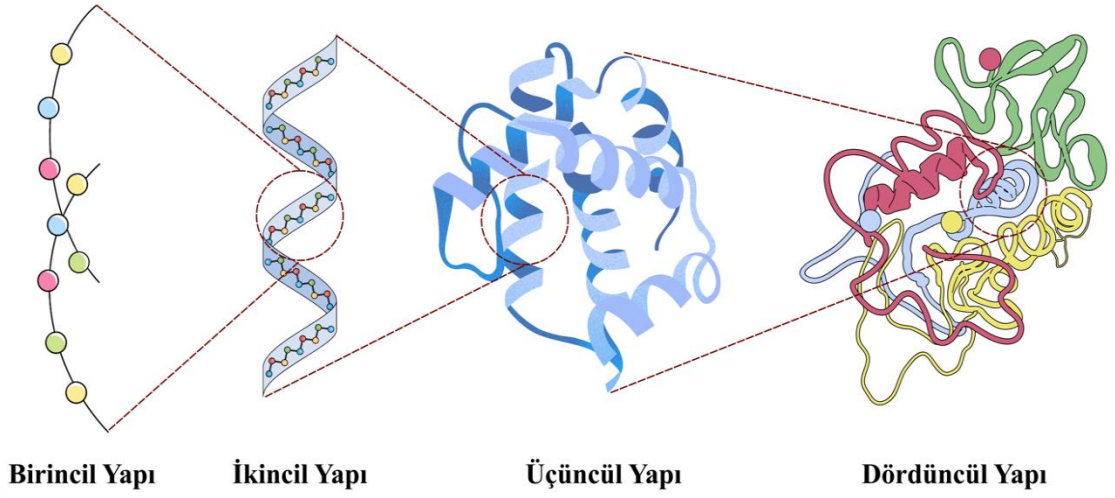
Cys, gıda, kozmetik ve farmasötik endüstrilerde geniş kullanım alanına sahip olup, özellikle unların işlenmesinde hamurun elastikiyetini artırmak amacıyla gıda sektöründe değerlendirilmektedir. Kozmetik ürünlerde saç ve cilt sağlığını destekleyici bileşen olarak yer

almaktadır (Chen vd., 2020). Farmasötik alanda ise antioksidan özellikleri nedeniyle takviye edici ürünlerde kullanılmaktadır. Keratin proteininin sentezinde görev alması, Cys saçın dayanıklılığı ve elastikiyeti üzerinde doğrudan etkili olmasını sağlamaktadır (Cruz vd., 2017). Ayrıca Cys içeren takviyelerin egzersiz sonrası toparlanmayı hızlandırdığı ve bağışıklık sistemini desteklediği bildirilmektedir (McCarty ve DiNicolantonio, 2015). Bu geniş uygulama yelpazesi dikkate alındığında, Cys kantitatif olarak doğru ve hassas şekilde tayini hem kalite kontrol hem de biyolojik değerlendirme açısından büyük önem taşımaktadır.

GSH da benzer şekilde gıda, kozmetik ve farmasötik endüstrilerde yaygın kullanım alanına sahiptir. Gıda sektöründe antioksidan koruyucu olarak kozmetik ürünlerde ise cilt aydınlatıcı ve yaşlanma karşıtı formülasyonlarda yer almaktadır. Farmasötik uygulamalarda özellikle intravenöz takviyeler şeklinde karaciğer hastalıkları, diyabet ve nörolojik bozuklukların destek tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca GSH'nin C ve E vitaminlerini yeniden aktif hale getirme özelliği, onu hücrel savunma sistemlerinde vazgeçilmez bir bileşen haline getirmektedir (Al-Temimi vd., 2023; Forman vd., 2009). Bu nedenle, GSH'nin kantitatif olarak doğru ve hassas şekilde tayini de hem biyolojik değerlendirme hem de kalite kontrol açısından kritik öneme sahiptir.

#### **1.2.4. Proteinlerdeki Disülfid-Tiyol Ayrımının Önemi**

Proteinlerin yapısal bütünlüğü ve biyolojik işlevselliği büyük ölçüde serbest tiyol (-SH) grupları ile bu grupların oluşturduğu disülfid bağlarının dinamik dengesi tarafından belirlenir. Serbest tiyoller, disülfid bağlarının oluşumu ve indirgenmesinde doğrudan rol oynayarak proteinlerin üçüncül yapısının korunmasına katkı sağlar (Şekil 1.5.) (Feige vd., 2018a, 2018b). Bu nedenle, serbest tiyol miktarının belirlenmesi proteinlerin katlanma durumunun ve yapısal stabilitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Proteinlerde meydana gelen yapısal değişiklikler, örneğin açılma (unfolding) veya denatürasyon süreçleri, serbest tiyol gruplarının erişilebilirliğini ve sayısını önemli ölçüde değiştirebilir. Dolayısıyla, tiyol gruplarının hassas ve seçici biçimde tespit edilmesi, proteinlerin katlanma mekanizmalarının anlaşılması ve üçüncül yapı karakterizasyonu açısından kritik bir analitik yaklaşımdır (Shcherbatykh vd., 2022).



Şekil 1.5. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları

#### 1.2.5. Serbest Tiyollerin Tayini için Kullanılan Analitik Yöntemler

Serbest tiyol bileşikleri, özellikle Cys ve GSH gibi biyomoleküller, hastalıkların teşhisi açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, bu bileşiklerin hassas ve seçici şekilde tayini, biyomedikal ve klinik araştırmalarda temel bir gereklilik haline gelmiştir. Geleneksel analiz yöntemleri arasında yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) (Chen vd., 2008), kapiler elektroforez (CE) (Ling vd., 2005), voltametri (Calvo-Marzal vd., 2006; Nezamzadeh-Ejhi ve Hashemi, 2012), akış enjeksiyon analizleri (Wang vd., 2017; Waseem vd., 2008) ve kütle spektrometrisi (MS) (Xu vd., 2010) gibi teknikler öne çıkmaktadır. Bu yöntemler her ne kadar yüksek analitik performansa sahip olsalar ve rutin uygulamaya uygun olsalar da genellikle pahalı ve karmaşık cihazlar gerektirir. Özellikle YPSK ve MS gibi sistemlerin hem ekipman maliyeti hem de karmaşık numune hazırlama prosedürleri zorlayıcı olabilir. Ayrıca, bu teknikler çoğunlukla tek örnek üzerinden çalıştığı için yüksek verimli analizlere uygun değildir, bu da klinik ve biyomedikal uygulamalarda zaman kaybına yol açabilir.

Bir diğer önemli dezavantaj ise bu yöntemlerde sıklıkla toksik ve çevresel açıdan zararlı kimyasalların kullanılmasıdır. Örneğin organik çözücüler, ağır metaller veya uçucu bileşikler içeren analiz protokolleri, laboratuvar ortamında toksik maruziyet riskini artırmakta ve sürdürülebilirlik açısından olumsuz etkiler yaratmaktadır. Bu nedenlerle, daha basit, güvenli, hızlı, düşük maliyetli ve çoklu örnek analizine uygun alternatif yöntemlerin geliştirilmesi; özellikle Cys ve GSH gibi biyolojik açıdan önemli serbest tiyol içeren

bileşiklerin tayinine yönelik kolay uygulanabilir sensör sistemlerinin tasarımı günümüzde önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır.

Ellman reaktifi (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit), DTNB), serbest tiyol gruplarının spektrofotometrik tayininde yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu reaktif, tiyol grupları ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit ( $TNB^{2-}$ ) oluşumuna neden olur ve bu ürünün 412 nm dalga boyunda güçlü absorbanısı sayesinde kantitatif ölçüm yapılabilir. Ellman yöntemi, hızlı ve basit uygulanabilirliği nedeniyle biyomedikal araştırmalarda tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bazı protein tiyolleri sterik veya elektrostatik engeller nedeniyle reaktif ile tam etkileşime girmeyebilir ve bu durum ölçüm hassasiyetini sınırlayabilir. Yine de düşük maliyetli ve pratik bir spektrofotometrik yaklaşım olması nedeniyle Ellman reaktifi, Cys ve GSH gibi biyomoleküllerin tayininde halen önemli bir araçtır (Riener vd., 2002).

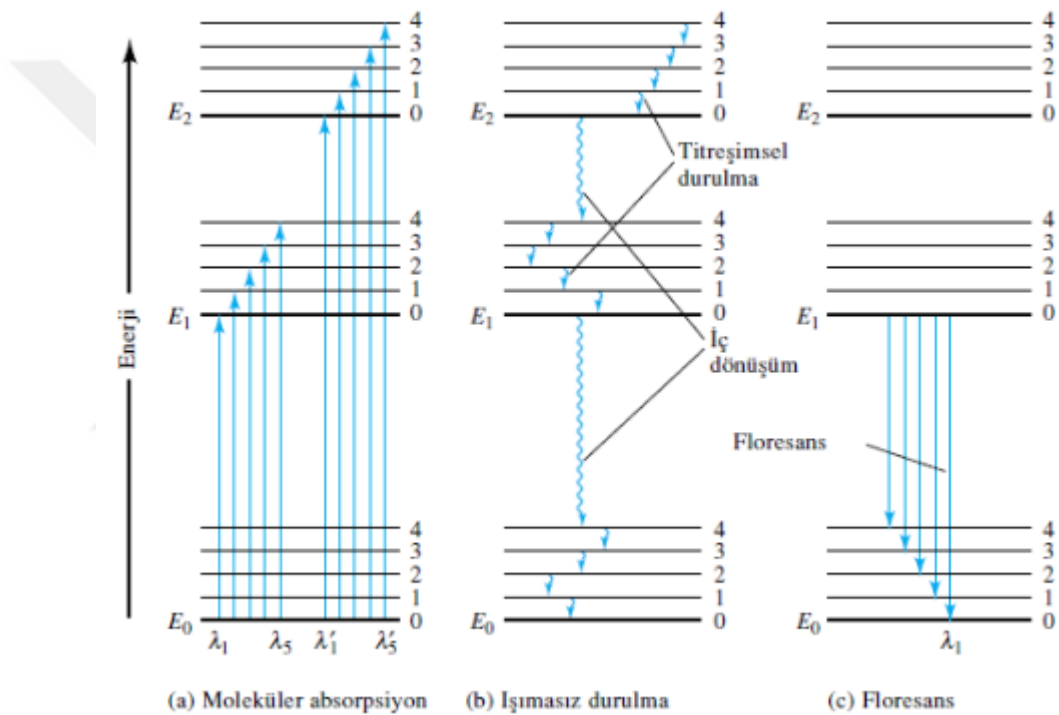
### 1.3. Optik Sensörler

Optik sensörler, bir maddenin ışıkla olan etkileşimini ölçerek hem kimyasal yapısını hem de derişimini belirlemek amacıyla kullanılan hassas analitik araçlardır. Bu sensörler; ışığın absorpsiyonu, saçılması, kırılması ve floresans gibi optik özelliklerdeki değişimleri algılayarak, hedef analitin fiziksel ve kimyasal analizini gerçekleştirebilir. Ayrıca, moleküller arası etkileşimlerin izlenmesi, bağlanma kinetiklerinin hesaplanması ve moleküler yapıların aydınlatılması gibi analizlerde de etkin biçimde kullanılmaktadır (Khani ve Rezaei, 2024).

Optik alan, çok geniş bir çalışma yelpazesi sunmakta olup, kullanılan dalga boyu aralığı da oldukça çeşitlidir. Ölçümde tercih edilecek dalga boyu hem çalışılacak cihazın teknik özelliklerine hem de hedeflenen analizin amacına bağlı olarak belirlenir. Örneğin, ultraviyole (UV) bölgesi (200-400 nm) genellikle aromatik bileşiklerin ve konjuge sistemlerin tespitinde kullanılırken, görünür bölge (400-700 nm) renkli komplekslerin, pigmentlerin ve floresans boyaların analizi için uygundur. Yakın kızılötesi (NIR) bölgesi (700-2500 nm) ise biyolojik dokuların derinlemesine incelenmesi, su içeriğinin belirlenmesi veya gıda kalite kontrolü gibi uygulamalarda tercih edilmektedir. Bu geniş dalga boyu seçeneği, optik sensörlerin hem temel bilim araştırmalarında hem de endüstriyel ve klinik uygulamalarda yüksek esneklik ve uyarlanabilirlik sağlamasına olanak tanır (Kalinichev vd., 2023; Schoonheydt, 2010).

### 1.3.1. Floresans Spektroskopisi

Spektroskopik teknikler arasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan floresans spektroskopisi, bir molekülün uyarılarak yüksek enerji seviyelerine geçmesi ve ardından bu enerjiyi genellikle daha uzun dalga boyunda ışık olarak yayması prensibine dayanır (Şekil 1.6.). Floresans spektroskopisi, yüksek sinyal-gürültü oranı, özellikle düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tayininde yüksek duyarlılık ve seçicilik sunar. Geniş Stokes kayması, yüksek absorpsiyon katsayısı ve yüksek kuantum verimine sahip floresans sensörler hem kantitatif hem de kalitatif analizlerde çok sayıda kullanım alanına sahiptirler ve yeni floresans sensörlerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanıdır (Grover vd., 2025).

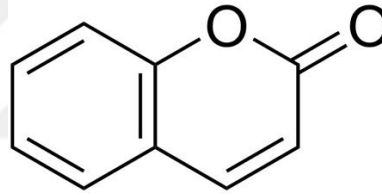


Şekil 1.6. Absorbsiyon ve floresans için kısmi enerji diyagramı (Skoog vd., 2014)

Araştırmacılar, analitik kimya, biyokimya ve çevre bilimleri gibi alanlarda çeşitli elementlerin, enzimlerin ve organik bileşiklerin tayini için BODIPY, koumarin, fluoresein ve rodamin gibi florofor iskeletlerine sahip floresans problemlerin sentezine yönelmişlerdir. Bu problemler, özgün fotofiziksel özellikleri sayesinde hedef moleküllerle seçici etkileşim kurarak yüksek duyarlılıkla analiz imkânı sunarlar. Özellikle floresans özellik taşıyan moleküller kullanılarak gerçekleştirilen hücre görüntüleme uygulamaları, biyolojik araştırmalarda ve tıbbi tanı süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır (Sun vd., 2020).

### 1.3.2. Kumarin Bazlı Optik Sensörler

Kumarin türevleri, Şekil 1.7’de gösterildiği gibi benzopiran-2-on yapısına sahip bileşikler olup, özgün fotofiziksel özellikleri sayesinde optik sensör tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu moleküller, özellikle floresans ve absorbans temelli algılama sistemlerinde yüksek kuantum verimi, geniş Stokes kayması ve mikroçevreye duyarlılık gibi avantajlar sunar. Genellikle hedef analitlerle (örneğin metal iyonları, biyotiyoller, reaktif oksijen türleri) seçici etkileşim kurarak sinyal değişimi oluşturur ve bu değişim genellikle floresans şiddeti veya dalga boyu kayması üzerinden izlenir (Khan ve Shaily, 2023). Ayrıca, kumarin türevlerinin yapısal modifikasyona açık olması, onları çok çeşitli analitlere duyarlı hale getirmeyi mümkün kılar. Bu sensörler, düşük algılama limitleri ve hızlı yanıt süreleri ile analitik kimya uygulamalarında tercih edilmektedir. Ayrıca, başta biyomedikal görüntüleme olmak üzere çevre analizi, gıda güvenliği, toksik madde tayini ve klinik tanı gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin,  $Fe^{3+}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi ağır metal iyonlarının florimetrik tayini için geliştirilen kumarin türevli sensörleri de oldukça yaygındır (Mousavi vd., 2024).



Şekil 1.7. Kumarin molekül yapısı

### 1.4. Hücre Görüntüleme Teknikleri

Hücre görüntüleme teknikleri, hücrelerin yapısal, fonksiyonel ve moleküler özelliklerinin gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlükte incelenmesine olanak tanıyan güçlü analitik araçlardır. Bu yöntemler aracılığıyla hücre içi bileşenlerin konumu, dinamik davranışları ve karşılıklı etkileşimleri ayrıntılı biçimde analiz edilebilmektedir. Konfokal mikroskopi ve FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) gibi ileri düzey görüntüleme sistemleri, canlı hücrelerin üç boyutlu ve yüksek kontrastlı olarak görselleştirilmesini mümkün kılar (Green vd., 2023). Özellikle floresans temelli görüntüleme yaklaşımları, biyobelirteçlerin hassas tespiti ve hücre içi metabolik değişimlerin izlenmesi yoluyla hastalıkların erken tanısında önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu teknikler, yüksek duyarlılık ve özgüllüklerinin yanı sıra, uygulama kolaylığı ile de öne çıkar. Kullanılan floresans probalar, hedef biyomolekülleri belirli dalga boylarında güçlü sinyallerle işaretleyerek mikroskop altında doğrudan gözle ayırt edilebilecek netlikte görüntüler elde edilmesini sağlar. Böylece, karmaşık

analiz yazılımlarına ihtiyaç duyulmaksızın deneysel veriler hızlı ve görsel olarak değerlendirilebilir (Gao vd., 2021). Ayrıca, canlı hücrelerde anlık ve dinamik izleme imkânı sunması, biyomoleküler süreçlerin zaman içindeki değişimlerinin takip edilmesine olanak tanır. Tüm bu görsel ve pratik avantajlar, floresans temelli hücre görüntüleme tekniklerini hem temel biyolojik araştırmalarda hem de klinik tanı uygulamalarında vazgeçilmez bir konuma taşımaktadır (Kumar vd., 2025).

Kumarin türevleri, hücre görüntüleme alanında yaygın olarak kullanılan floroforlar arasında yer almaktadır. Bu moleküller yalnızca temel biyolojik araştırmalarda değil, aynı zamanda tıbbi tanı, ilaç geliştirme ve toksikolojik değerlendirme gibi translasyonel alanlarda da etkin biçimde kullanılmaktadır (Ma vd., 2025). Özellikle kanser hücrelerinde GSH seviyelerinin izlenmesi, oksidatif stresin hücre içi dağılımının belirlenmesi ve metal iyonlarının lokal tayini gibi uygulamalar, kumarin bazlı problemlerin klinik potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu tür problemler, konfokal mikroskopi ve süper çözünürlüklü görüntüleme sistemleriyle entegre edilerek hücre içi süreçlerin gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlükte izlenmesine olanak tanır. Fakat, kumarin bazlı floresans problemlerin hücre görüntüleme uygulamalarında kullanılabilmesi için genellikle yüksek saflıkta ve çözünürlükte organik çözücülere ihtiyaç duyulmaktadır. Dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO) ve asetonitril (ACN) gibi çözücüler, probun çözünürlüğünü ve hücreye penetrasyonunu artırsa da yüksek konsantrasyonlarda hücre zarına zarar verebilmekte ve hücresel fizyolojiyi bozabilmektedir. Bu durum, özellikle canlı hücre görüntüleme çalışmalarında biyolojik verilerin güvenilirliğini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, güncel araştırmalar daha az toksik ve suda çözünen kumarin türevlerinin geliştirilmesine odaklanmakta; böylece hem görüntüleme kalitesi korunmakta hem de hücreye zarar vermeyen problemler oluşturulmaktadır (Majhi vd., 2024; Sun vd., 2020).

#### **1.4.1. Kanser Hücrelerinde Glutasyon Artışı ve Görüntüleme Uygulamaları**

Kanser hücrelerinde, lizozomal düzeyde artan oksidatif stres, hücre içi redoks dengesini önemli ölçüde etkileyerek antioksidan özelliklere sahip bazı amino asitlerin, özellikle de GSH, konsantrasyonunda belirgin bir artışa yol açmaktadır. Lizozomlarda oluşan bu oksidatif yük, hücrelerin oksidatif hasara karşı savunma mekanizmalarını tetiklerken, GSH gibi tiyol grubu içeren antioksidanların biyosentezini ve birikimini de hızlandırmaktadır (Hong Wang vd., 2020). GSH, hem doğrudan serbest radikalleri nötralize etme kapasitesi hem de redoks sinyal yollarının düzenlenmesindeki kritik rolü nedeniyle, kanser hücrelerinin

hayatta kalma ve proliferasyon süreçlerinde önemli bir biyomolekül olarak öne çıkmaktadır (Valenti vd., 2023). Yapılan çalışmalar, bu biyokimyasal değişimlerin yalnızca kantitatif analizlerle değil, aynı zamanda canlı hücre görüntüleme teknikleri ile de yüksek duyarlılıkta tespit edilebileceğini ortaya koymuştur. Özellikle floresans prob lar ve optik sensörler kullanılarak tiyol grubu içeren antioksidanların hücre içi dağılımı, yoğunluğu ve dinamik değişimleri gerçek zamanlı olarak izlenebilmekte, bu sayede hem kanser biyolojisinin anlaşılmasına hem de hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanmaktadır. Bu bağlamda, GSH'nin hücre içi görüntülenmesi hem tanısal hem de prognostik açıdan önem kazanmaktadır (Wang vd., 2024). Kanserli hücrelerde GSH düzeyleri, sağlıklı hücrelere göre belirgin şekilde daha yüksektir. Bunun nedeni, tümör hücrelerinde artan metabolik faaliyet ve sürekli oksidatif stresin hücre içi dengeyi bozarak GSH üretimini ve geri dönüşümünü artırmasıdır (Kennedy vd., 2020). Kanser hücreleri, oksidatif hasara karşı korunmak ve çoğalmalarını sürdürmek için GSH seviyelerini yükseltir. Bu durum aynı zamanda ilaçlara karşı direnç gelişmesine de katkıda bulunur (Tian vd., 2024). Sağlıklı hücrelerde GSH normal düzeylerde bulunurken, kanserli hücrelerde hem sitoplazmada hem de mitokondrilerde birkaç kat daha fazla biriktiği görülmektedir (Xiong vd., 2021). Bu farklılık, GSH'ı kanser biyolojisinde önemli bir belirteç haline getirmekte ve tanı ile tedaviye yönelik görüntüleme çalışmalarında değerli bir hedef olarak öne çıkarmaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, serbest tiyol gruplarının seçici ve duyarlı biçimde tayini için yeni bir kumarin-kinolin hibrit floresans prob geliştirmektir. Çalışmada, probun hem kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden ayrımında hem de proteinlerin üçüncül yapılarının incelenmesinde etkin bir araç olarak kullanılabilirliği hedeflenmiştir. Ayrıca, gıda takviyelerinde kantitatif analizlerde uygulanabilirliği gösterilerek mevcut yöntemlere alternatif, güvenilir ve hızlı bir sensör sistemi sunulmuştur. Bu yönüyle tez, biyotiyol tayininde yüksek özgüllük sağlayan yeni bir optik sensör yaklaşımı ile bilime katkı sağlamaktadır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler, aksi belirtilmedikçe ticari tedarikçilerden temin edilmiş ve ek saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır. Çözücüler, deneysel uygulamalardan önce klasik yöntemlerle saflaştırılmıştır.

Moleküler sentez aşamalarında kullanılan başlıca kimyasallar şunlardır: 4-hidroksifenilasetik asit, 4-dietilamino-2-hidroksibenzaldehit, trietilamin, asetik anhidrit, diklorometan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), asetik asit ( $\text{AcOH}$ ), hekzametilentetramin (HMTA), deiyonize su, 1-etil-2-metilkinolinyum iyodür, susuz etanol ve metanol ( $\text{MeOH}$ , Sigma-Aldrich/BLD Pharmatech Ltd.).

Britton-Robinson tampon çözeltisinin hazırlanmasında fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich), asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Sigma-Aldrich), borik asit ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Sigma-Aldrich), Milli-Q ultra saf su (Millipore, USA) ve sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ , Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan diğer reaktifler arasında magnezyum sülfat ( $\text{MgSO}_4$ , Sigma-Aldrich), çinko sülfat ( $\text{ZnSO}_4$ , Macklin), tiamin (vitamin B1, Macklin), folik asit (Macklin), kumarin 6 (BLD), glisin (BLD), L-lizin (BLD), glutatyon (GSH, BLD), L-karnitin (BLD), L-arjinin (Macklin), L-sistein (L-Cys, Sigma-Aldrich), D-sistein (D-Cys, Sigma-Aldrich), homosistein (Hcy, Sigma-Aldrich), sodyum borhidrür ( $\text{NaBH}_4$ , Sigma-Aldrich), bovin serum albümini (BSA, Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -sinüklein (AlexoTech),  $\alpha$ -lipoik asit (ALA, Sigma-Aldrich), asetonitril (ACN, Sigma-Aldrich), dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich), dimetilformamid (DMF, Sigma-Aldrich) ve Türkiye menşeli ticari gıda takviyesi kapsülleri (biyotin, L-Cys ve çinko içeren) yer almaktadır.

Tüm stok çözeltiler taze olarak hazırlanmış, 10 dakika süreyle ultrasonik banyoda (J.P. Selecta Co.) sonike edilmiş, ışığa duyarlılık nedeniyle alüminyum folyo ile korunmuş ve 4 °C’de saklanmıştır.

Bu kimyasallar ve hazırlanan çözeltiler, sentezlenen floresans probun fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi, biyomoleküler etkileşimlerin değerlendirilmesi ve hücre görüntüleme deneylerinde kullanılmıştır.

## 2.2. Cihazlar

FT-IR spektrumları Bruker Alpha-P cihazında ATR tekniği ile 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  aralığında kaydedildi. Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) analizleri Q.one Instruments Quantum IPLUS 500 MHz ve Varian Mercury 400 spektrometreleri ile gerçekleştirildi. Kütle spektrometrisi ölçümleri ise Bruker MALDI-TOF ve Agilent 6120 sistemleri kullanılarak yapıldı. Bu analizler, örneklerin yapısal ve moleküler karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirildi.

Spektroskopik ölçümler, Cary Eclipse floresans spektrofotometre (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ve Cary 60 UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresans mikroskopi çalışmaları ise Zeiss Axiovert 5 dijital ters floresans mikroskobu ile yürütülmüştür.

Hücre görüntüleme deneylerinde, kanser hücre hatları olarak HT-29 (kolorektal adenokarsinom, USA) ve A549 (akciğer karsinomu, USA) kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ise sağlıklı hücre hatları FHC (normal insan kolon hücreleri) ve BEAS-2B (normal insan bronşiyal epitel hücreleri) tercih edilmiştir.

Bu cihazlar ve hücre hatları, geliştirilen floresans probun fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi, biyomoleküler etkileşimlerin değerlendirilmesi ve kanser hücrelerinin seçici olarak görüntülenmesi amacıyla kullanılmıştır.

## 2.3. P3 Bileşiğinin Sentezi

### 2.3.1. 4-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)fenil asetat P1 Bileşiğinin Sentezi

P1 bileşiği, başlangıç maddeleri olarak 4-Dietilaminosalisilaldehit ve p-Hidroksifenilasetik asit kullanılarak sentezlenmiştir. Bu amaçla, 4-Hidroksifenilasetik asit (4,2 mmol, 0,639 g), 4-Dietilamino-2-hidroksibenzaldehit (4 mmol, 0,772 g), Trietilamin (1,05 mL, 40 mmol) ve Asetik anhidrit (1,8 mL, 19 mmol) mikrodalga reaksiyon tüpünde karıştırılmış ve 140 °C'de 20 dakika mikrodalga ışınlamaya tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulan karışım, silika jel kolon kromatografisi ile (elüent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) saflaştırılmış ve etanolden yeniden kristallendirilerek saf P1 bileşiği elde edilmiştir (0,9126 g, 2,6 mmol, Verim: %65). Sentezlenen bileşiğin yapısal karakterizasyonu, Proton Nükleer Manyetik Rezonans ( $^1\text{H}$ -NMR), Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans ( $^{13}\text{C}$ -NMR) ve MS analizleri

kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.06 (t, 1H), 7.71 (i,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.47 (i,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.15 (i,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.71 (i,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 6.54 (t, 1H), 3.42 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 4H), 2.27 (t, 3H), 1.11 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.7, 160.9, 156.2, 150.9, 150.2, 141.7, 133.6, 130.1, 129.5, 122.0, 118.4, 109.6, 108.8, 96.5, 44.5, 21.3, 12.8.ppm; HRMS (MALDI) kütle/yük  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  için hesaplanan $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 374.1363, bulunan: 374.1357 ( Şekil 3.1. -3.3.).

### 2.3.2. 5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksibenzaldehit P2

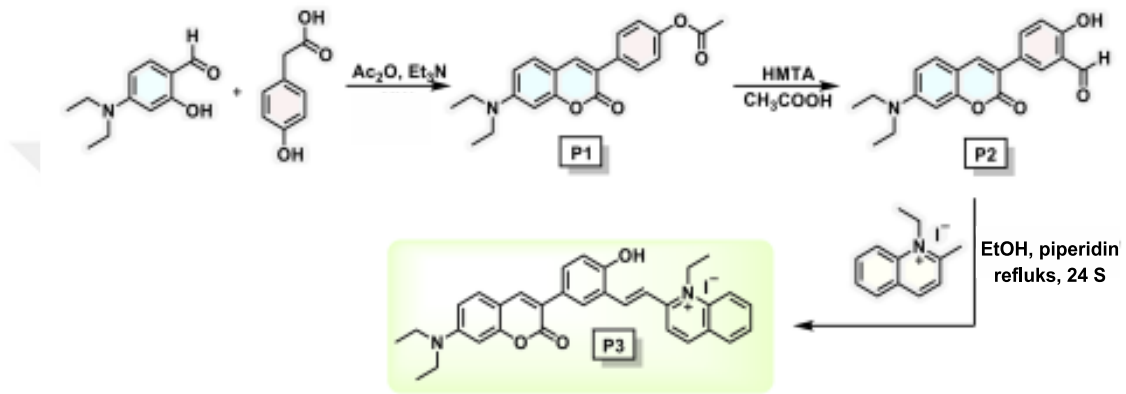
#### Bileşiğinin Sentezi

P1 bileşiği (0,351 g, 1 mmol) 10 mL asetik asit içinde çözülmüş ve buz banyosunda sıcaklık 0 °C'ye ayarlanmıştır. Üzerine tek seferde HMTA (0,210 g, 1,5 mmol) eklenmiş, karışım geri soğutucu altında kaynatılarak reaksiyon ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Başlangıç maddelerinin tamamen tüketilmesinin ardından karışıma 50 mL su eklenmiş, çöken ürün süzölmüş ve silika jel kolon kromatografisi (elüent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 100:1) ile saflaştırılarak sarı renkli P2 bileşiği elde edilmiştir (175 mg, 0,35 mmol, Verim: %52). P2 bileşiğinin yapısal karakterizasyonu,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR ve MS analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.87 (t, 1H), 10.31 (t, 1H), 8.07 (t, 1H), 8.03 (t, 1H), 7.87 (i,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.51 (i,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (i,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.73 (i,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.56 (t, 1H), 3.44 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 4H), 1.13 (ü,  $J$  = 6.8 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  193.8, 163.2, 162.8, 158.3, 152.9, 142.9, 138.5, 132.1, 130.9, 128.5, 124.6, 120.2, 119.7, 111.8, 111.0, 98.7, 46.7, 14.9. ppm; HRMS (MALDI): kütle/yük  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  için hesaplanan  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  = 374.1363; bulunan = 374.1357 (Şekil 3.4.-3.6.).

### 2.3.3. 2-(5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-il)-2-hidroksistiril)-1-etilkinolinyum-1 iyodür P3 Bileşiğinin Sentezi

1-Etil-2-metilkinolinyum iyodür (300 mg, 1,0 mmol) ve P2 bileşiği (337 mg, 1 mmol), 10 mL susuz etanol ve katalitik miktarda piperidin içeren çözelti içinde geri soğutucu altında bir gece boyunca ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan karışım, vakum altında çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra silika jel kolon kromatografisi (elüent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 250:1) ile saflaştırılmış ve koyu yeşil renkli P3 bileşiği elde edilmiştir (78,7 mg, Verim: %74,8). Son ürünün yapısal karakterizasyonu,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR ve MS analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.98 (t, 1H), 9.03 (i,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 8.57 (ii,  $J$  = 16.0, 9.0 Hz, 2H), 8.37 (i,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 8.29 (i,  $J$  = 15.7 Hz, 1H), 8.21 – 8.14

(ç, 2H), 8.08 – 8.00 (ç, 2H), 7.94 (ü,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.73 – 7.67 (ç, 1H), 7.50 (i,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.05 (i,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.73 (ii,  $J = 9.0$ , 1.8 Hz, 1H), 6.56 (i,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 5.08 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.44 (d,  $J = 6.9$  Hz, 4H), 1.59 (ü,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.13 (ü,  $J = 7.0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.2, 157.8, 156.3, 156.1, 150.8, 144.8, 144.2, 140.7, 138.6, 135.6, 133.3, 130.9, 129.9, 129.4, 128.6, 127.7, 121.9, 121.7, 119.4, 119.0, 118.7, 116.7, 109.7, 108.9, 96.7, 47.4, 44.6, 14.3, 12.8. (MALDI-TOF): kütle/yük  $[\text{M}]^+$   $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$  için hesaplanan: 491.23; bulunan = 490.129 ( $[\text{M} - \text{H}]^+$ ) (Şekil 3.7-3.9).



Şekil 2.1. P3 molekülünün sentez yolu

#### 2.4. Çözeltilerin Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada kullanılan floresans prob (P3) için stok çözelti, 10  $\mu\text{M}$  derişimde hazırlanmış olup %5 (v/v) dimetilsülfoksit (DMSO) ve %95 (v/v) Britton-Robinson tamponu (pH 7.0) içerisinde çözülmüştür. Britton-Robinson tamponu, 0,1345 mL fosforik asit, 0,1145 mL %96'lık asetik asit ve 0,1236 g borik asit karışımına 50 mL saf su ilave edilerek hazırlanmış, ardından pH ayarı 1 M NaOH çözeltisi ile yapılmıştır. Absorpsiyon ve floresans spektrumları, 3.0 mL çözelti kuvars küvet içerisine alınarak kaydedilmiştir. Biyomoleküllerin tayinleri için L-Cys ve GSH stok çözeltileri, 10 mM derişimde hazırlanmış ve 1,0 mL Britton-Robinson tamponu (pH 7.0) içerisinde çözülmüş P3 sensör çözeltisi ile titrasyon ve geri kazanım çalışmalarında kullanılmıştır.

Zaman ve pH optimizasyon çalışmaları için 10  $\mu\text{M}$  P3 ve 40  $\mu\text{M}$  Cys içeren 3 mL çözeltiler hazırlanmıştır. Zaman optimizasyonunda, Cys, P3 üzerine eklendikten sonra 5, 10, 15 ve 20 dakika zaman aralıklarında floresans spektrumları ölçülmüştür. pH optimizasyonunda ise, Britton-Robinson tamponu ile pH 2 - 12 Aralığında incelenmiştir. Validasyon çalışmaları için ise farklı derişimlerde Cys içeren çözeltiler hazırlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, validasyon kapsamında yapılan seçicilik çalışmasında kullanılan analitlerin 10 mM stok çözeltileri hazırlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır. Ayrıca, Ellman reaktifi yöntemi karşılaştırması için blank ile birlikte 7 farklı derişimde Cys standart çözeltileri hazırlanmış ve önceden hazırlanan 4 mg/mL Ellman reaktifi ile 1 mM EDTA içeren 0.1 M sodyum fosfat (pH 8) tamponu kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde bovin serum albümini (BSA),  $\alpha$ -lipoik asit (ALA) ve  $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ -syn) stok çözeltileri aynı koşullarda hazırlanmış ve ilgili deneylerde değerlendirilmiştir.

Ticari gıda takviyesi çözeltilerinin hazırlanması için satın alınan gıda takviyesinden 2 adet kapsül açılarak tartılmış, ardından 1 kapsüle denk gelecek şekilde içerik behere alınmıştır. Her bir beher Britton-Robinson tamponu (pH 7.0) ile 25 mL'ye tamamlanmış ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında çözeltiler filtreden geçirilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler, saklama koşulu olarak 4 °C'de ve karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir.

## 2.5. Hücre Görüntüleme Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları; insan kolorektal adenokarsinom hücreleri (HT-29), normal insan kolon epiteli hücreleri (FHC), insan akciğer adenokarsinom hücreleri (A549) ve normal insan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) olmuştur. Tüm hücreler, önerilen besi ortamlarında, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin ilavesiyle, standart koşullarda (37 °C, %5 CO<sub>2</sub>) kültüre edilmiştir.

Görüntüleme deneyleri için hücreler, plastik tabanlı 48 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiş ve yaklaşık %70-80 konfluens seviyesine ulaşmaları beklenmiştir. Deneysel uygulamalarda kullanılan floresans prob (P3), kültür ortamında taze olarak seyreltilmiş ve hücrelere 1, 2,5, 5, 7,5 ve 10  $\mu$ M son konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise %0,1 DMSO içeren işlem görmemiş hücreler kullanılmıştır.

P3 ile muamele edilen hücreler, 10 dakika inkübasyon sonrasında Zeiss Axiovert 5 dijital ters floresans mikroskobu ile incelenmiştir. Görüntüleme sırasında yeşil kanal kullanılmış, yaklaşık 488 nm uyarma dalga boyu ve 510-550 nm emisyon aralığı tercih edilmiştir. Her bir koşul ve hücre hattı için görüntüler, 5x, 10x ve 20x objektifler altında kaydedilmiş; tüm gruplarda aynı pozlama süresi, kazanç ve ışık yoğunluğu değerleri kullanılarak karşılaştırılabilirlik sağlanmıştır.

Ayrıca, hücrelerin morfolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla floresans görüntülere paralel olarak brightfield (ışık mikroskobu) görüntüleri de kaydedilmiştir. Bu yaklaşım hem floresans sinyallerin doğrulanmasına hem de hücre sağlığının ve yapısal bütünlüğünün kontrol edilmesine olanak sağlamıştır.

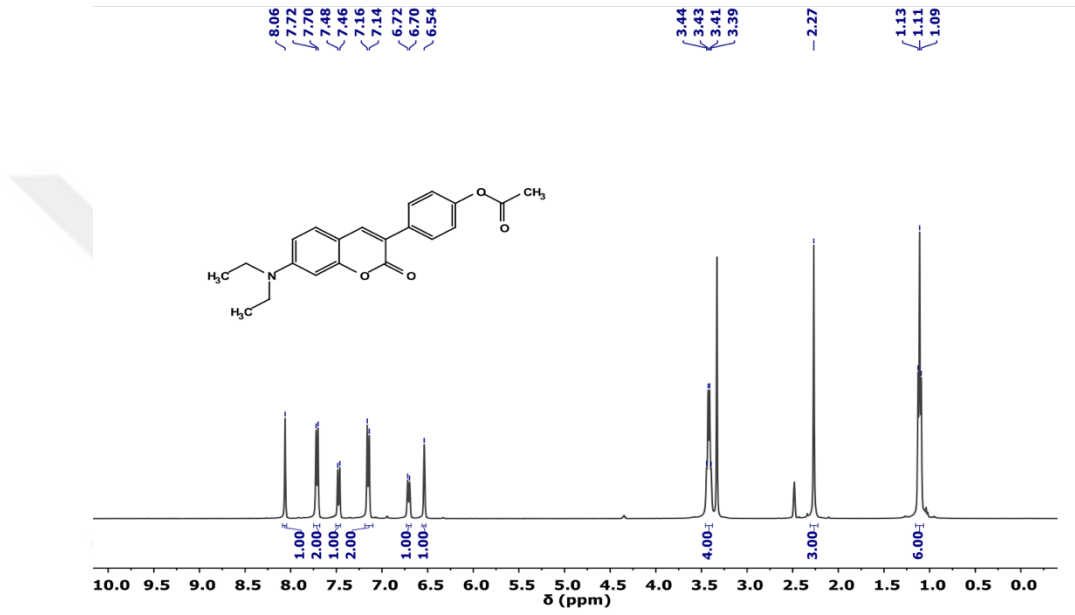


### 3. BULGULAR

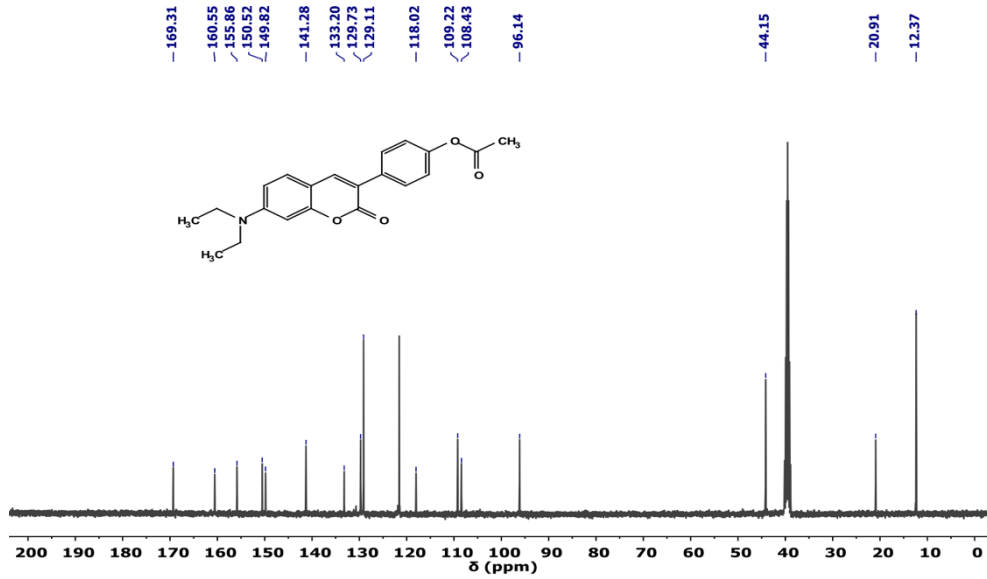
#### 3.1. Karakterizasyonu Bulguları

##### 3.1.1. P1'in Yapı Karakterizasyonu

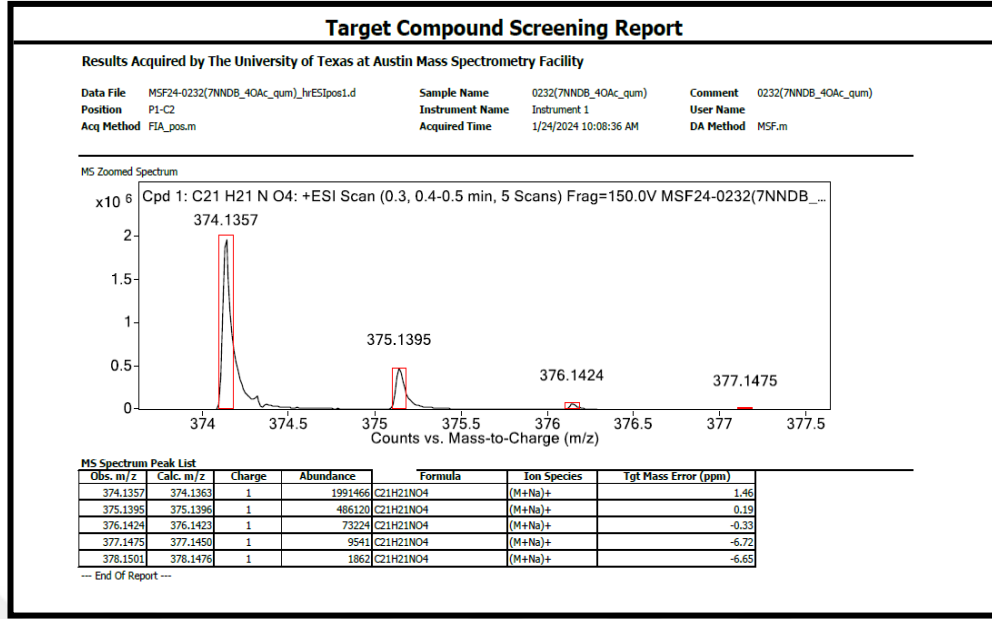
P3 molekülün ara ürünü olan P1 bileşiğinin Proton  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu Şekil 3.1., karbon  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu Şekil 3.2. ve kütle spektrumu Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. P1'in  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



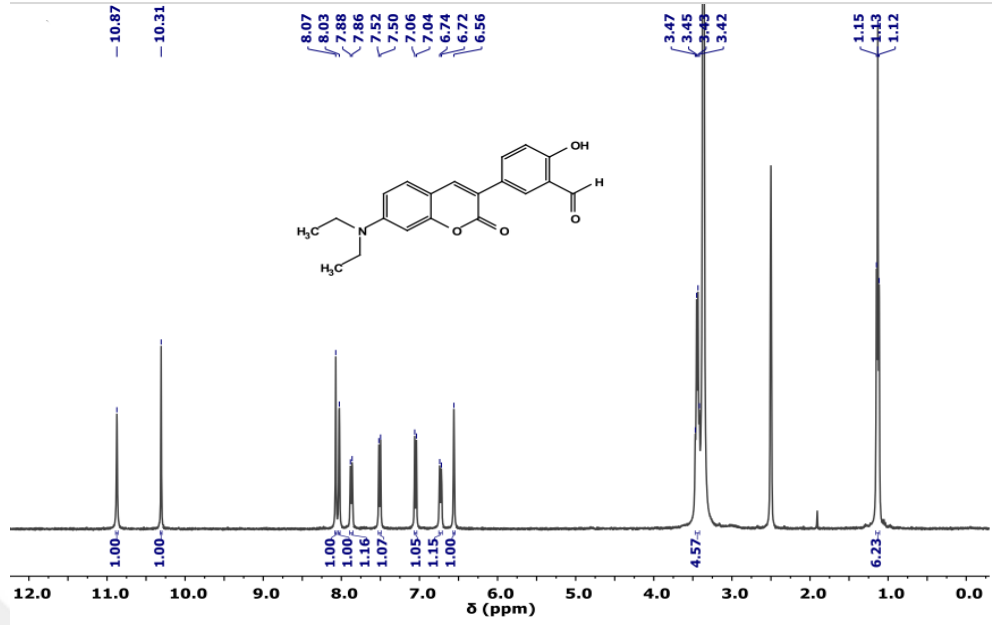
Şekil 3.2. P1'in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



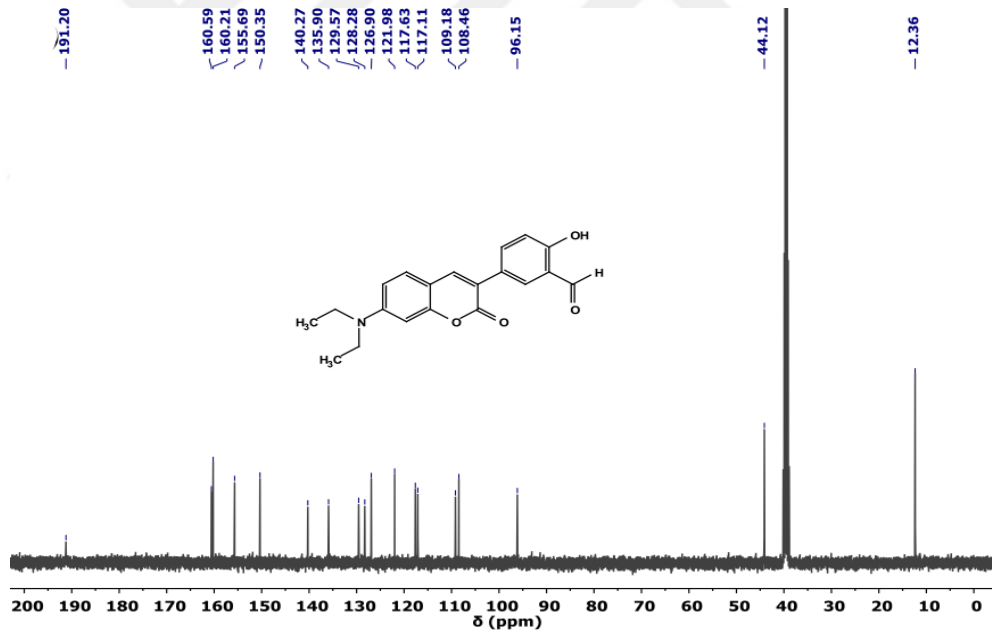
Şekil 3.3. P1'in kütle spektrumu

### 3.1.2. P2'nin Yapı Karakterizasyonu

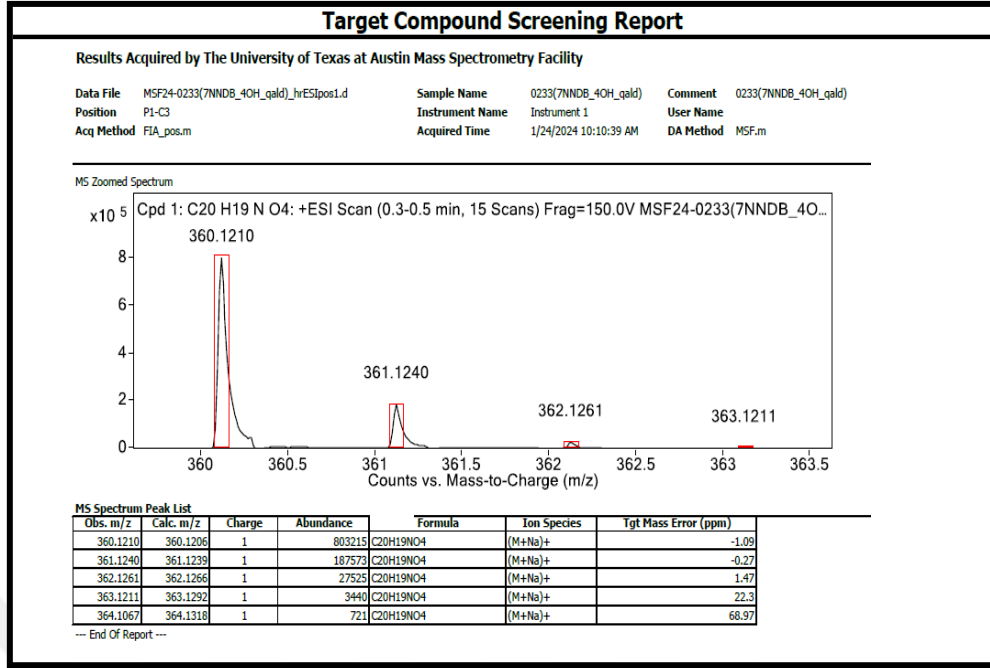
P3 molekülünün ara ürünü olan P2 bileşiğinin Proton <sup>1</sup>H NMR spektrumu Şekil 3.4., karbon <sup>13</sup>C NMR spektrumu Şekil 3.5. ve kütle spektrumu Şekil 3.6'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. P2'nin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Şekil 3.5. P2'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

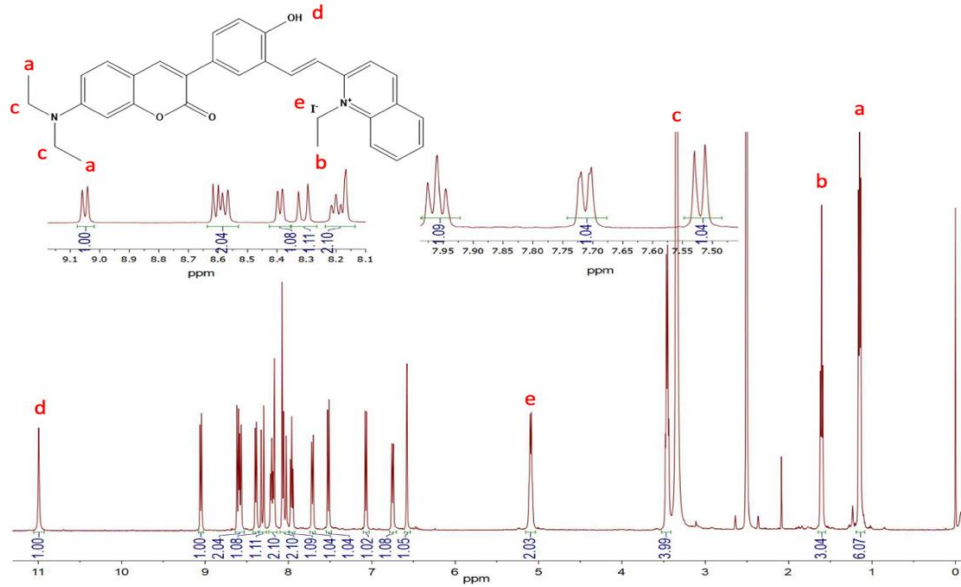


Şekil 3.6. P2'nin kütle spektrumu

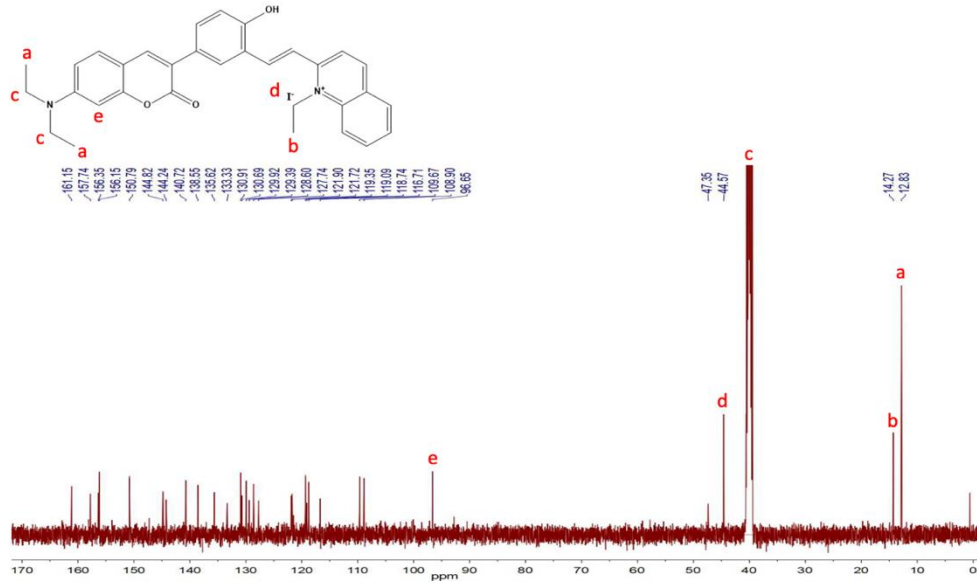
### 3.1.3. P3'ün Yapı Karakterizasyonu

Son ürün olan P3 molekülünün yapı karakterizasyonu için Proton <sup>1</sup>H NMR spektrumu

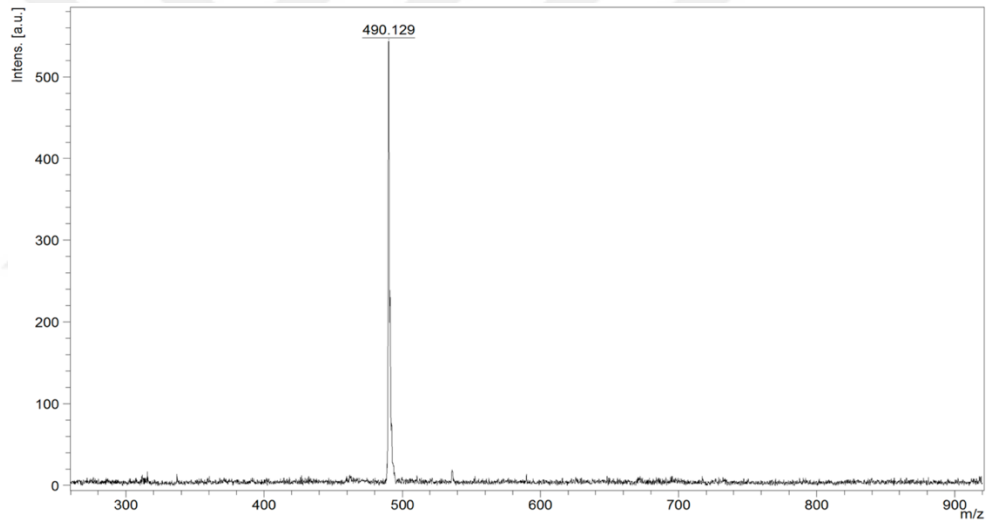
Şekil 3.7., karbon <sup>13</sup>C NMR spektrumu Şekil 3.8. ve kütle spektrumu Şekil 3.9'de verilmiştir.



Şekil 3.7. P3'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu



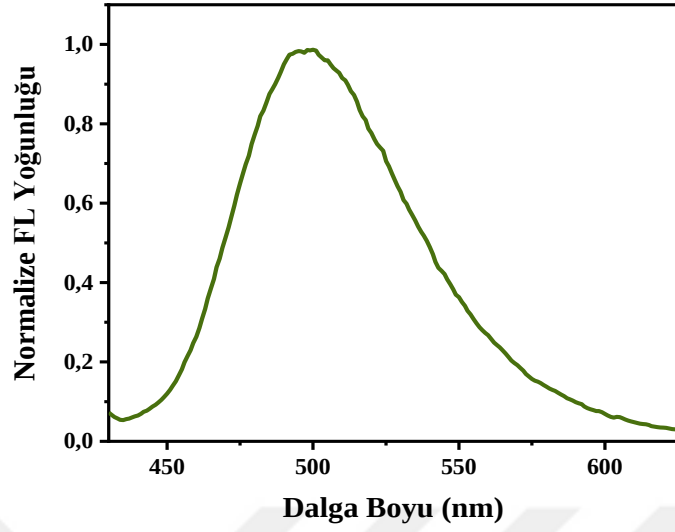
Şekil 3.8. P3'ün  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



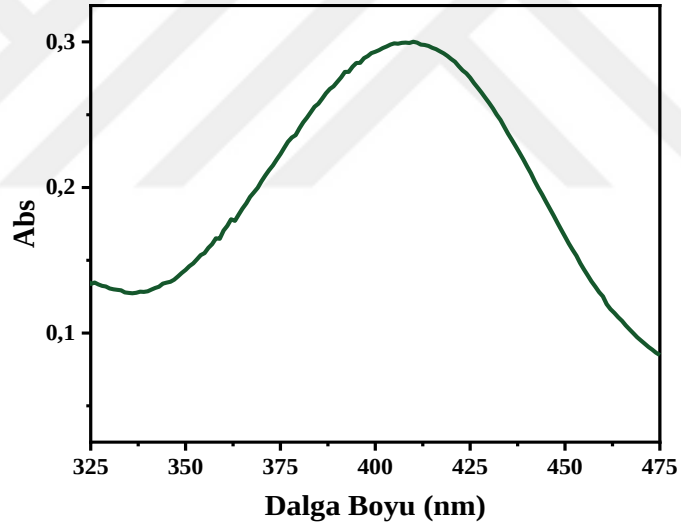
Şekil 3.9. P3'ün kütle spektrumu

### 3.1.4. P3'ün Optik Özellikleri

P3 bileşiğinin optik özellikleri, floresans ve UV-Vis spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.10. ve 3.11'de sunulan veriler, bileşiğin karakteristik absorpsiyon bantlarını ve floresans davranışını açıkça ortaya koymaktadır. Elde edilen verilere göre absorpsiyon maksimum dalga boyu 409 nm, floresans uyarma dalga boyu 407 nm, emisyon dalga boyu ise 497 nm olarak bulunmuştur.



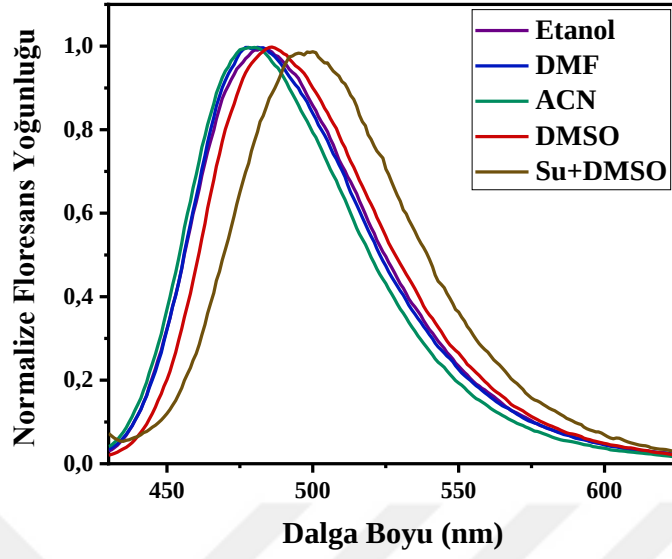
Şekil 3.10. 10  $\mu$ M P3 molekülünün emisyon spektrumu



Şekil 3.11. 10  $\mu$ M P3 molekülünün UV absorbans spektrumu

### 3.2. Çözücü Ortamının Floresans Özellikleri Üzerindeki Etkisi

P3 bileşiğinin floresans özellikleri, çözücü polaritesi ve hidrojen bağlama kapasitesi dikkate alınarak incelenmiştir. Şekil 3.12’de farklı çözücü ortamlarında kaydedilen floresans spektrumları gösterilmiştir. Çözücü sisteminde polarite yükseldikçe emisyonunun batokromik kayma gösterdiği görülmektedir.



Şekil 3.12. P3 molekülünün farklı çözücülerde emisyon spektrumları (su:DMSO 19:1 v:v)

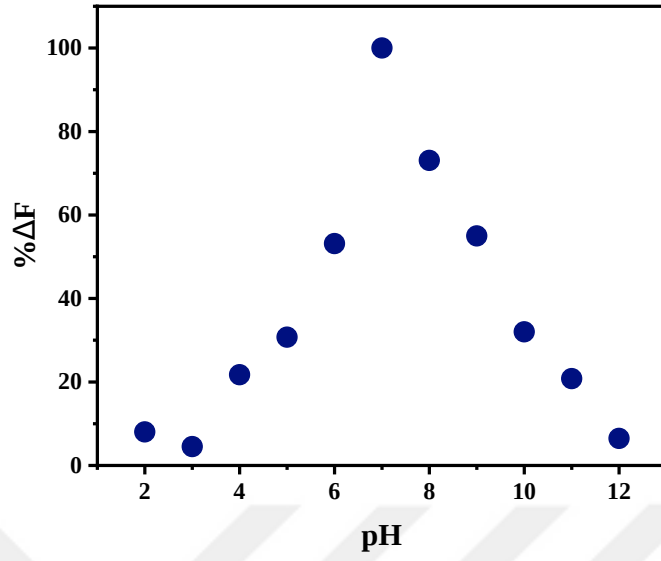
### 3.3. P3 - Serbest Tiyol Etkileşimi

#### 3.3.1. Optimizasyon

Optimal algılama performansını elde etmek amacıyla, pH ve etkileşim süresi deneysel parametreleri, L-Cys model analit olarak kullanılarak sistematik biçimde değerlendirilmiştir. Sensör yanıtı, floresans artışı ( $\Delta F = F - F_0$ ; burada F analit varlığındaki,  $F_0$  ise analit yokluğundaki floresans şiddetini temsil etmektedir) üzerinden nicel olarak belirlenmiştir ve en yüksek floresans artışına neden olan koşullar optimum olarak belirlenmiştir.

##### 3.3.1.1. pH

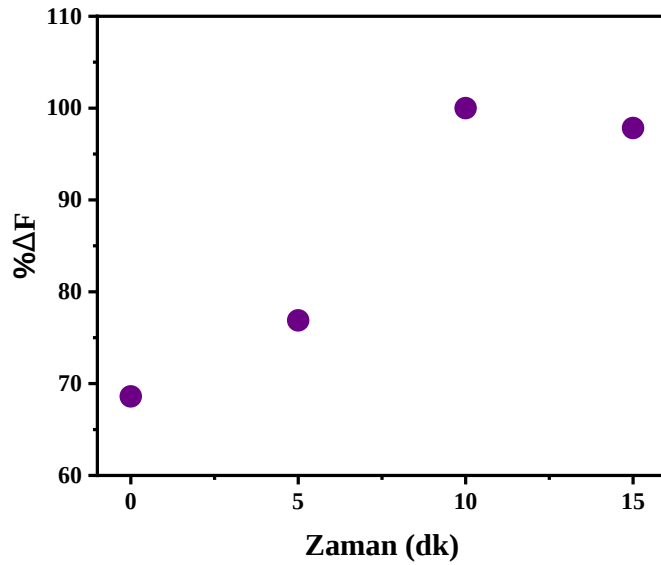
Şekil 3.13'te gösterildiği gibi ilk olarak sensörün performansını etkileyen ortam Britton-Robinson tampon sistemi kullanılarak pH'ı 2-12 aralığında incelenmiştir.



Şekil 3.13. pH'nın floresans yanıtına etkisi

### 3.3.1.2. Etkileşim Süresi

Bir diğer önemli parametre olarak etkileşim süresi değerlendirilmiştir. Ölçümler 5 dakikalık aralıklarla gerçekleştirilmiş ve elde edilen normalize floresans artışı verileri Şekil 3.14'te sunulmuştur.

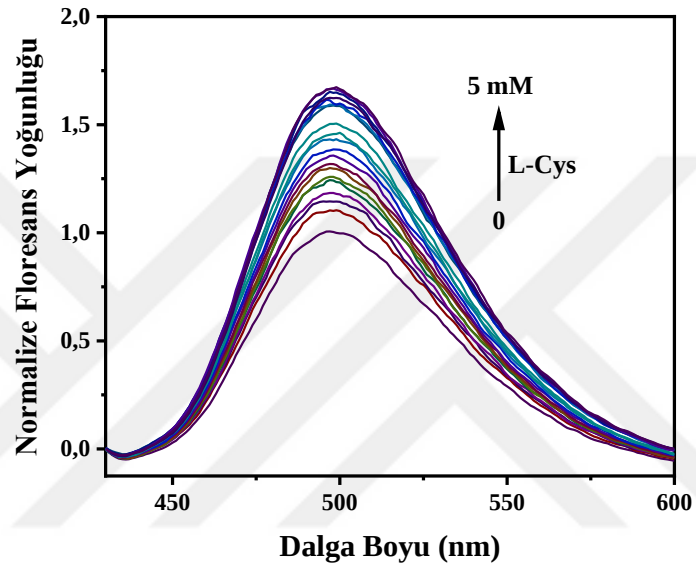


Şekil 3.14. P3 molekülü ile analit arasındaki etkileşim süresinin floresans yanıtına etkisi

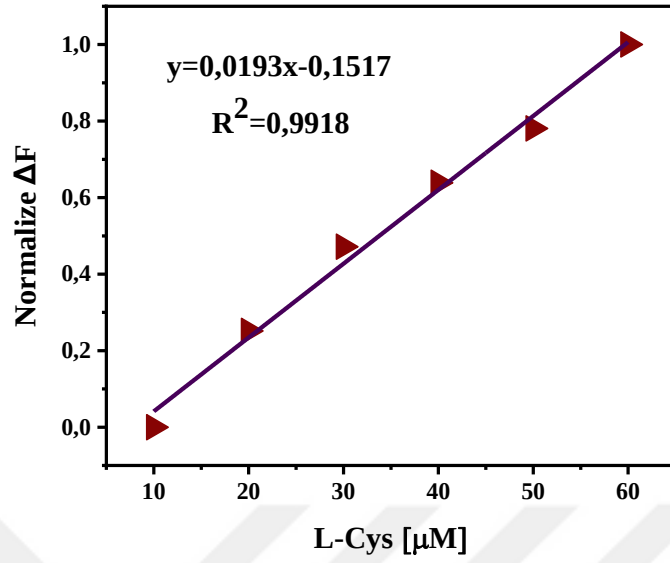
### 3.3.2. Analitik Performans

#### 3.3.2.1. P3 - Cys Titrasyonu

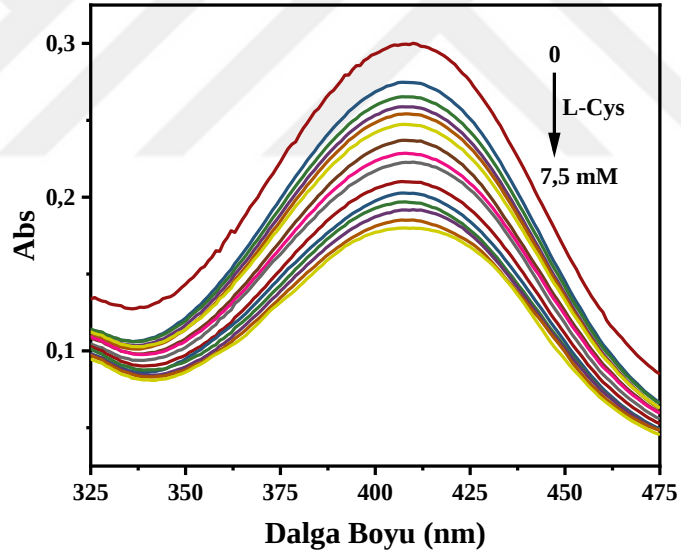
L-Cys ile gerçekleştirilen titrasyon sonucunda elde edilen sinyal farkı değerlendirilerek kantitatif bir yöntem geliştirilmiştir. Titrasyon spektrumları, kalibrasyon eğrisi ve UV absorpsiyon verileri şekil 3.15., şekil 3.16. ve şekil 3.17’de sunulmuştur.



şekil 3.15. pH 7 koşullarında 10  $\mu$ M P3 molekülünün emisyon spektrumları; farklı L-Cys konsantrasyonlarının floresans şiddeti üzerindeki etkisi (normalize edilmiş veriler)



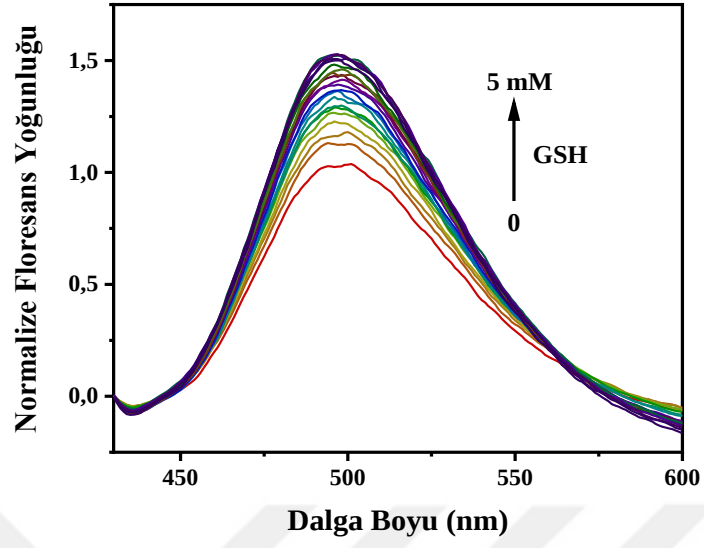
Şekil 3.16. L-Cys için doğrusal yanıt aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi



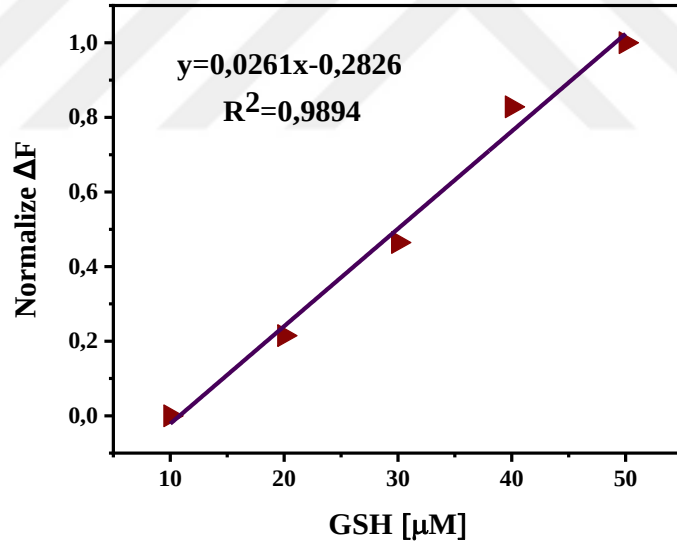
Şekil 3.17. L-Cys ile 10 μM P3 molekülünün UV absorbans titrasyonu

### 3.3.2.2. P3 - GSH Titrasyonu

Aynı şekilde, GSH ile floresans titrasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen floresans verileri değerlendirilmiştir. Şekil 3.18’de gösterildiği üzere titrasyon spektrumları kaydedilmiş ve bu verilerden kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.19.)



Şekil 3.18. pH 7 koşullarında 10 µM P3 molekülünün emisyon spektrumları; farklı GSH konsantrasyonlarının floresans şiddeti üzerindeki etkisi (normalize edilmiş veriler)



Şekil 3.19. GSH için doğrusal yanıt aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi

### 3.3.3. Validasyon Çalışmaları

#### 3.3.3.1. Tekrar edilebilirlik

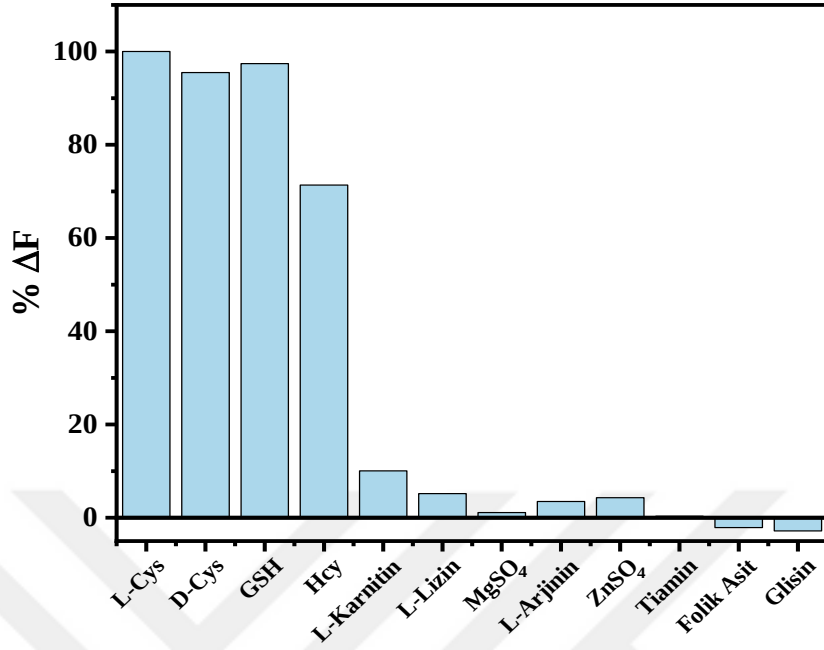
**Çizelge 3.1.** L-Cys ile yapılan gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n = 3)

|              | Derişim ( $\mu\text{M}$ ) | Bulunan Derişim ( $\mu\text{M}$ ) | Geri Kazanım (%) | BSS (%) |
|--------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|---------|
| Gün içi      | 30,00                     | 29,58                             | 98,60            | 1,24    |
|              | 40,00                     | 40,26                             | 100,66           | 1,02    |
|              | 50,00                     | 50,51                             | 101,02           | 1,67    |
| Günler arası | 30,00                     | 29,84                             | 99,48            | 1,64    |
|              | 40,00                     | 40,29                             | 100,73           | 1,20    |
|              | 50,00                     | 50,52                             | 101,04           | 1,67    |

Sensörün tekrar edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlar seçilmiştir. Gün içi ve günler arası (3 gün) geri kazanım değerleri ile bağlı standart sapma sonuçları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

#### 3.3.3.2. Seçicilik

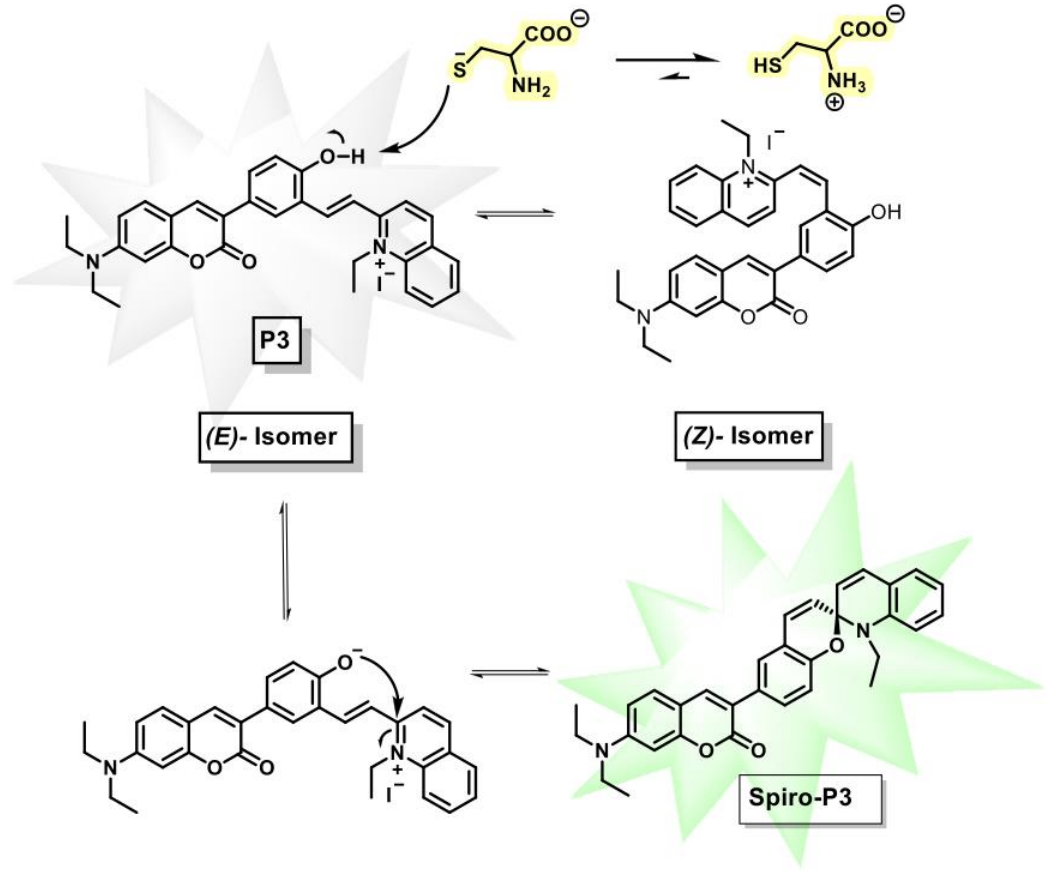
Sensörün güvenilirliği için temel gerekliliklerden biri hedef analite karşı yüksek seçicilik göstermesidir. Çalışmada sentezlenen P3 molekülünün serbest tiyol grubu içeren analitlerle tercihi etkileşim gösterdiği belirlenmiştir. Bu kapsamda plazma örneklerinde veya besin takviyelerinde yaygın olarak bulunan karnitin, lizin, arjinin, folik asit, glisin, tiamin,  $\text{ZnSO}_4$  ve  $\text{MgSO}_4$  gibi bileşikler test edilmiştir. Elde edilen veriler şekil 3.20’de gösterilmiştir.



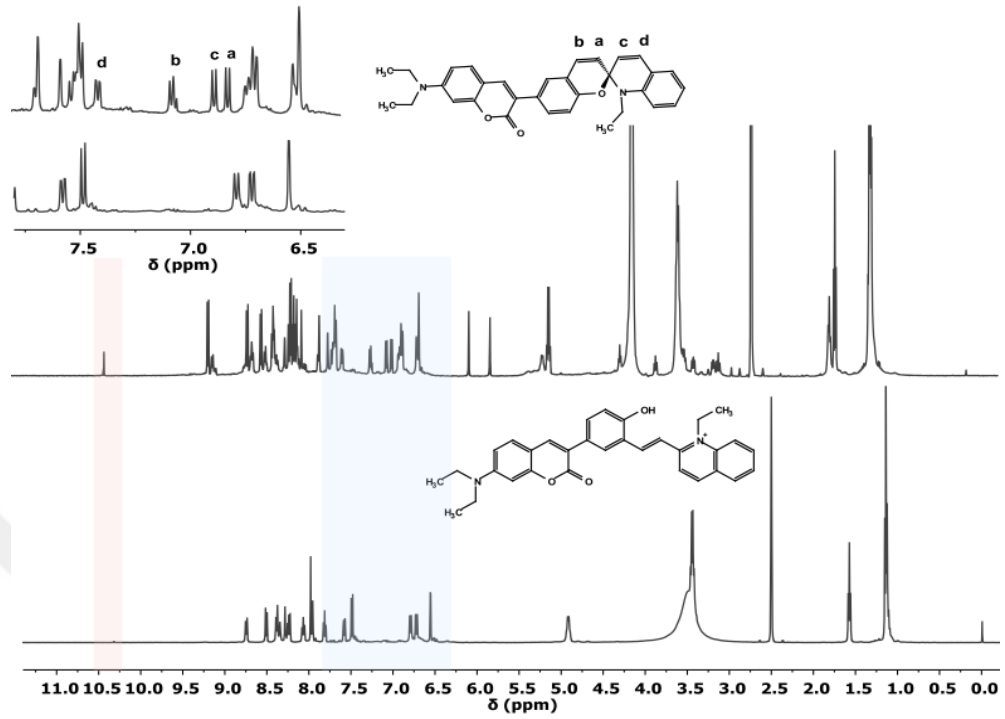
Şekil 3.20. P3 molekülünün serbest tiyollere ve diğer amino asitler ile bileşiklere verdiği yanıt

### 3.4. P3'ün Serbest Tiyollere Karşı Algılama Mekanizması

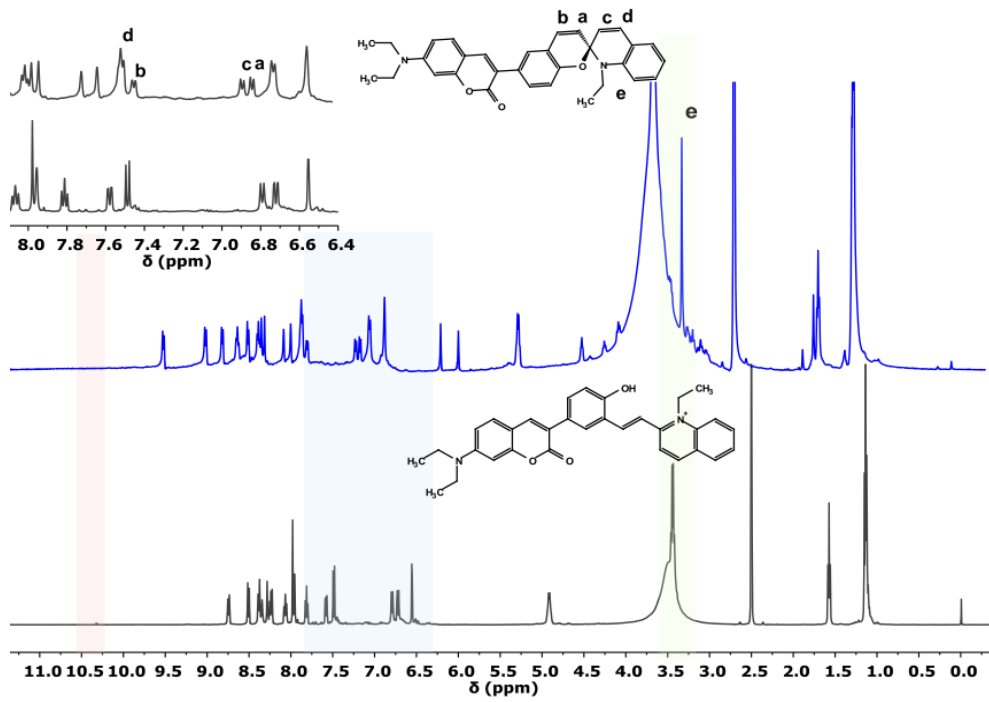
Önerilen bağlanma mekanizması Şekil 3.21'de sunulmuştur. ST ile P3 molekülü arasındaki etkileşimler NMR spektroskopisi kullanılarak ayrıntılı biçimde incelenmiştir. Şekil 3.22'de P3'ün L-Cys yokluğunda ve varlığında DMSO-H<sub>2</sub>O ortamındaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumları gösterilmiştir. Şekil 3.23'te aynı koşullar d<sub>6</sub>-DMSO ortamında değerlendirilmiş, Şekil 3.24'te ise P3'ün L-Cys varlığındaki <sup>1</sup>HMBC spektrumu sunulmuştur.



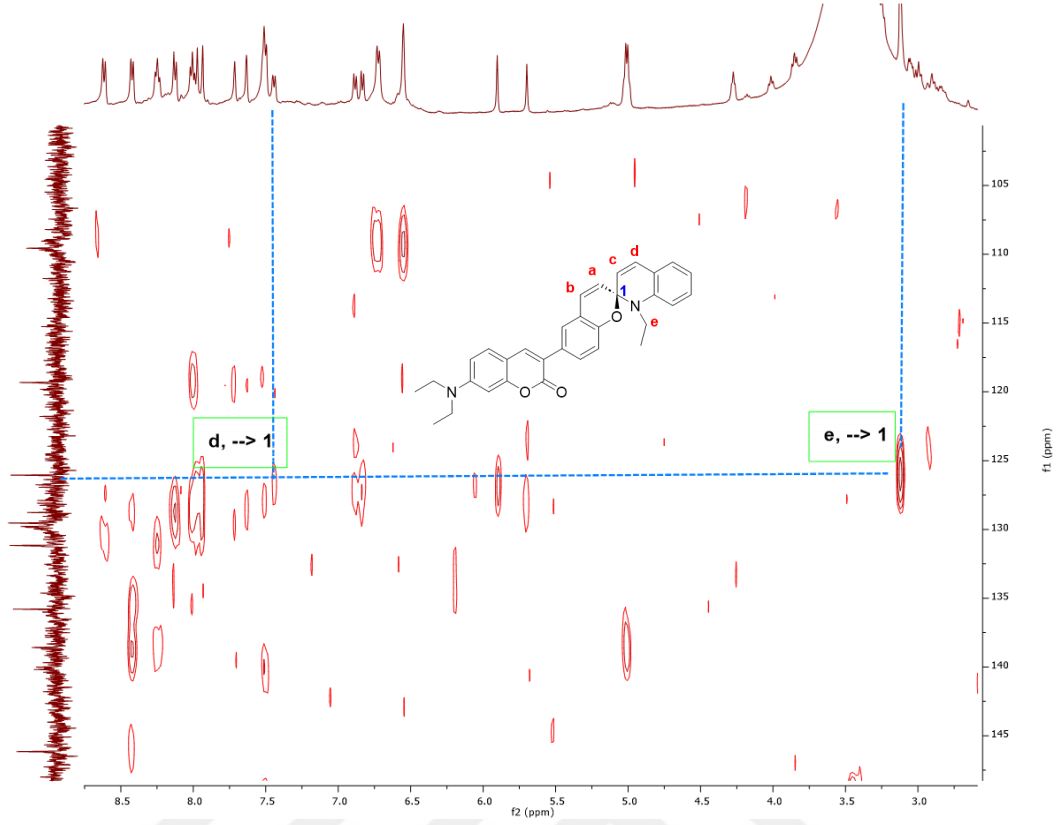
**Şekil 3.21.** Biyotiyollerin tespitinde P3 molekülü için önerilen reaksiyon mekanizması. Mekanizma adımlarında temsil molekül olarak Cys seçilmiştir



Şekil 3.22. P3 molekülünün DMSO içinde ve (3 eq) L-Cys varlığında (DMSO/H<sub>2</sub>O, v/v 7:3) <sup>1</sup>H-NMR spektrumları



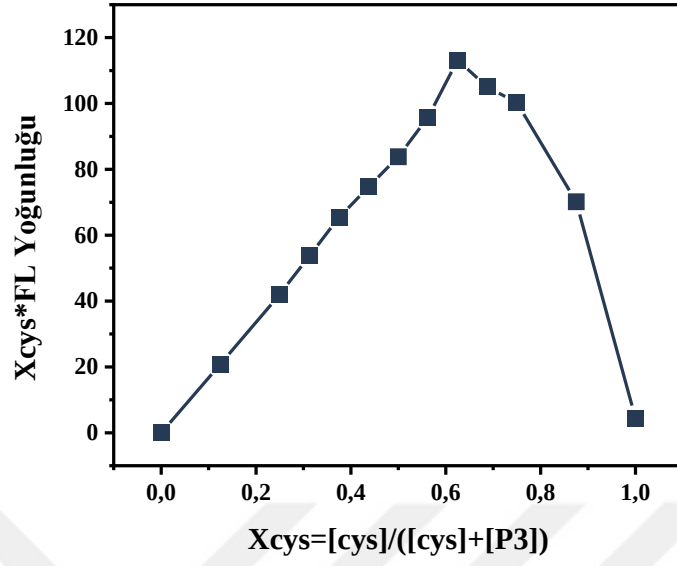
Şekil 3.23. P3 molekülünün <sup>1</sup>H-NMR spektrumları; L-Cys yokluğunda ve (3 eq) L-Cys varlığında (d<sub>6</sub>-DMSO)



Şekil 3.24. P3 molekülünün HMBC spektrumları; (3 eq) L-Cys varlığında (d<sub>6</sub>-DMSO)

### 3.5. Bağlanma Stokiyometrisi

P3 molekülünün tiyol analitlerle bağlanma stokiyometrisi, Job's plot yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.25'de sunulan veriler, prob ile Cys arasındaki bağlanma oranını belirlenmiştir.

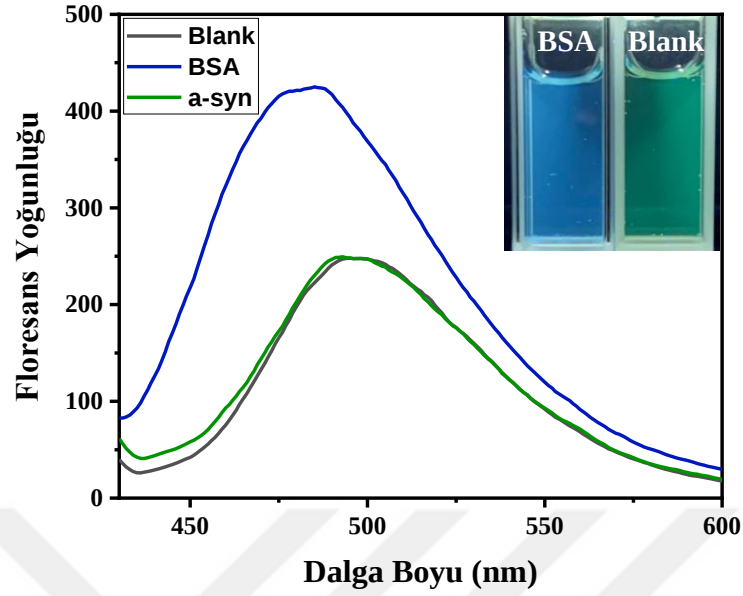


Şekil 3.25. P3-Cys etkileşimi için Job's plot grafiği

### 3.6. Disülfid-Serbest Tiyoil Tayini ve Uygulamaları

#### 3.6.1. Proteinlerin Üçüncül Yapılarının Karakterizasyonu için ST Tayini

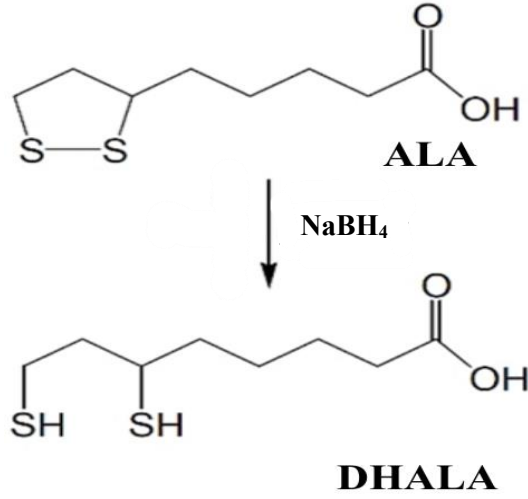
Bu çalışmada geliştirilen sensörün proteinlerde serbest tiyoil gruplarını tespit etme potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla, serbest tiyoil grubu içermeyen  $\alpha$ -sinüklein ve serbest tiyoil grubu içeren BSA proteini sensör çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.26'de sunulmuştur.  $\alpha$ -sinüklein için herhangi bir sinyal artışı gözlenmezken, serbest tiyoil içeren BSA için sinyal yükselişinin yanı sıra hipsokromik kayma da gözlenmiştir.



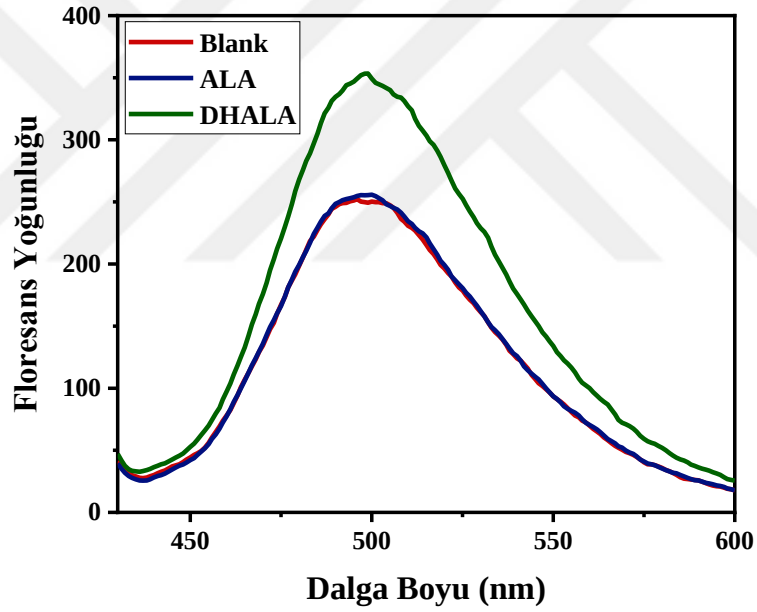
Şekil 3.26. Sensörün proteinlere ve disülfid içeren moleküllere verdiği floresans yanıtı,  $\alpha$ -sinüklein ve BSA ile etkileşim sonrası gözlenen floresans değişimleri

### 3.6.2. ALA Disülfid-ST Tayini

Floresans probun, disülfid bağı-serbest tiyol tespitinde kullanımına yönelik bir başka uygulama olarak küçük molekül olan ALA üzerinde test edilmiştir. Disülfid bağı içeren ALA'ya molekülün indirgenmesi ve disülfid bağının kırılması amacıyla sodyum borhidrür ilavesi yapılmış, bu işlem sonucunda disülfid bağı koparılarak iki tane serbest tiyol içeren dihidrolipoik asit (DHALA) oluşmuştur (Şekil 3.27). Bu iki molekülün floresans prob ile etkileşiminden elde edilen sinyal değişimi Şekil 3.28'de sunulmuştur.



Şekil 3.27. ALA ve sodyum borhidrür ile indirgenmiş DHALA molekülü



Şekil 3.28. Sensörün ALA ve sodyum borhidrür ile indirgenmiş DHALA karşısındaki floresans yanıtı

### 3.6.3. Gıda Takviyelerinde ST Tayini

Bu çalışmada geliştirilen sensör, ticari bir besin takviyesinin analizinde uygulanmıştır (Çizelge 3.2.). Yöntemin doğruluk ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla elde edilen sonuçlar, standart Ellman reaktifi yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler (t-testi) Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.2.** Ellman ve P3 yöntemleri ile bir adet kapsülde bulunan Cys miktarı

| Ellman testi (mg) | P3 testi (mg) |
|-------------------|---------------|
| 87,31297621       | 87,26452719   |
| 87,41487815       | 87,17704485   |
| 87,4318618        | 87,42184913   |
| 87,46582912       | 87,46961279   |
| 87,46582912       | 87,6716622    |
| 87,48281277       | 87,52404841   |
| 87,48281277       | 87,72492269   |
| 87,46582912       | 87,1340906    |
| 87,48281277       | 87,20226775   |
| 87,51678008       | 87,36787906   |
| 87,5507474        | 87,27632303   |
| 87,53376374       | 87,42277986   |
| 87,51678008       | 87,31297827   |
| 87,53376374       | 87,33516461   |
| 87,49979643       | 87,51440707   |

**Çizelge 3.3.** Gıda takviyesi analizinde uygulanan t-testi sonuçları

|                  | Ellman testi | P3 testi   |
|------------------|--------------|------------|
| Ortalama         | 87,4771516   | 87,3879705 |
| Varyans          | 0,00348881   | 0,02982111 |
| Örnek Sayısı     | 15           | 15         |
| t İstatistik     | 1,98904938   |            |
| P(T<=t) two-tail | 0,06660321   |            |

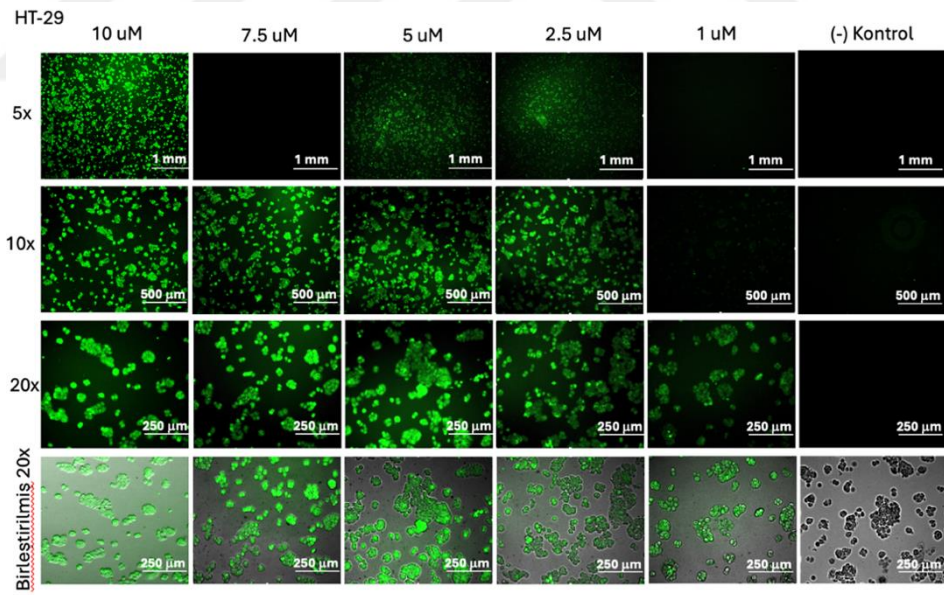
**Çizelge 3.3. Devam**

|                   |             |            |
|-------------------|-------------|------------|
| t Kritik two-tail | 2,14478669  |            |
| BSS %             | 0,067521762 | 0,19761062 |

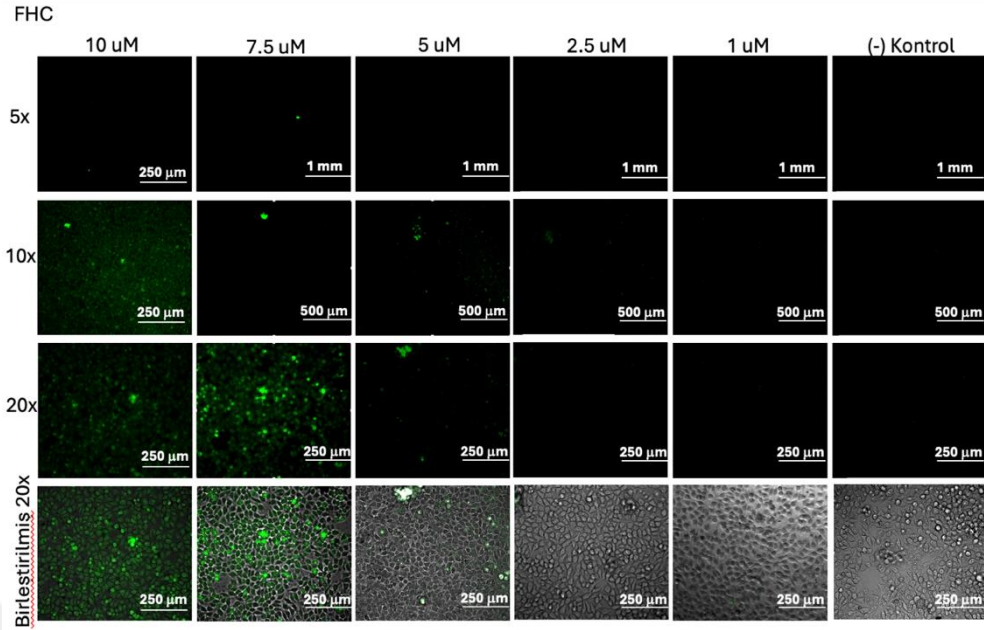
### 3.7. Hücre Görüntüleme Tekniği

Geliştirilen P3 probu kullanılarak kanserli ve sağlıklı hücrelerin görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kolon kanseri hücreleri (HT29) Şekil 3.29'da, sağlıklı kolon epitelyal hücreleri (FHC) Şekil 3.30'da, akciğer kanseri hücreleri (A549) Şekil 3.31'de ve sağlıklı akciğer epitelyal hücreleri (BEAS2-B) ise Şekil 3.32'de sunulmuştur.

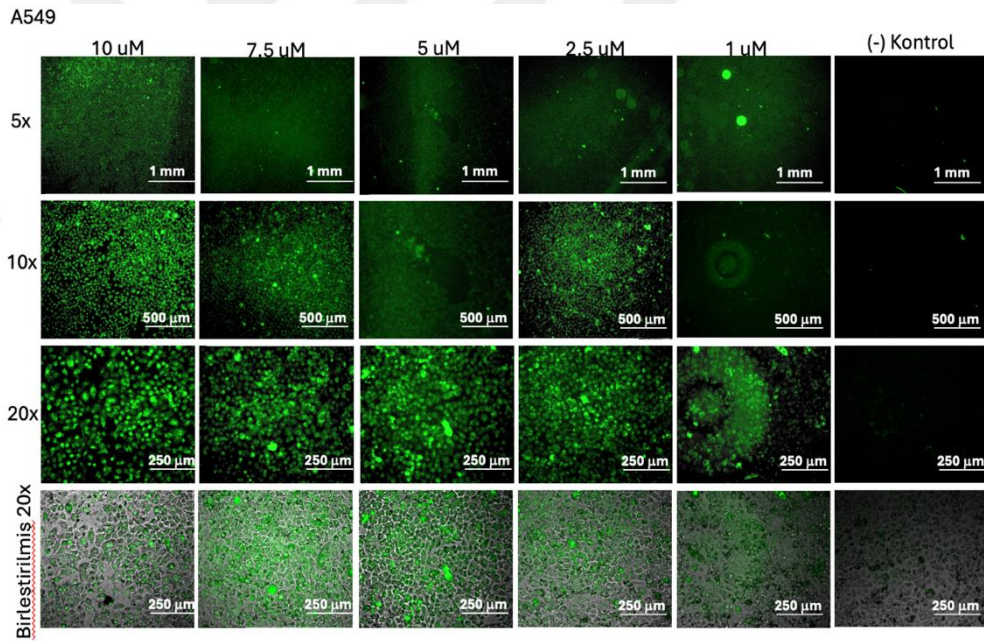
Seçilen optimum koşullar altında, kanserli ve sağlıklı hücreler arasındaki en belirgin ayrımı gösteren görüntüler Şekil 3.33'te sunulmuştur. Kolon hücreleri için 5  $\mu$ M konsantrasyon ve 20x büyütme optimum şart olarak belirlenirken, akciğer hücreleri için 2,5  $\mu$ M konsantrasyon ve 20x büyütme tercih edilmiştir.



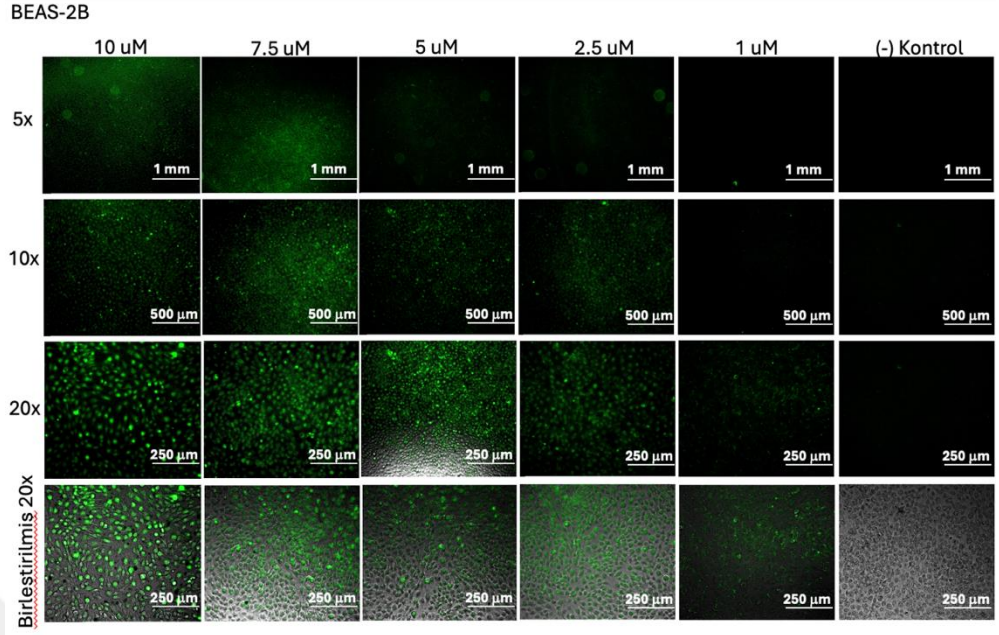
**Şekil 3.27.** P3 ile muamele edilmiş kanserli akciğer hücreleri (HT-29) floresans mikroskobu görüntüsü



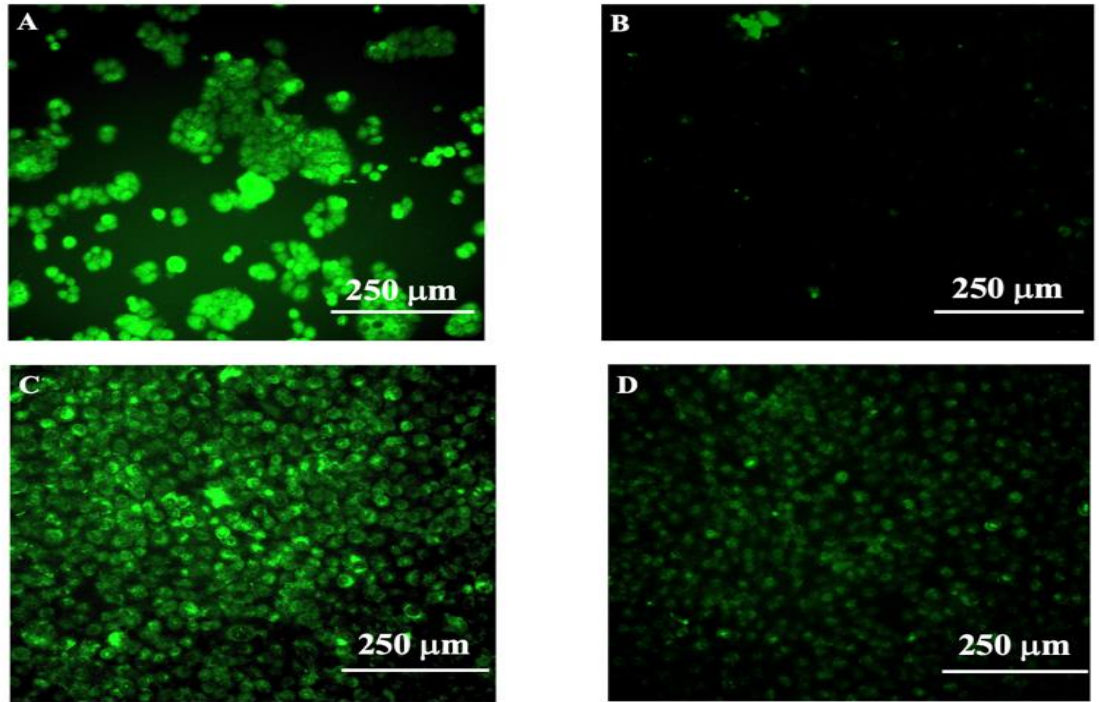
Şekil 3.28. P3 ile muamele edilmiş sağlıklı akciğer hücreleri (FHC) floresans mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.29. P3 ile muamele edilmiş kanserli kolon hücreleri (A549) floresans mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.30. P3 ile muamele edilmiş sağlıklı kolon hücreleri (BEAS-2B) floresans mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.31. Hücrelerin 20x büyütmede floresans mikroskopi görüntüleri: (A) 5  $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş kanserli akciğer hücreleri (HT-29), (B) 5  $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş sağlıklı akciğer hücreleri (FHC), (C) 2,5  $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş kanserli kolon hücreleri (A549), (D) 2,5  $\mu$ M P3 ile muamele edilmiş sağlıklı kolon hücreleri (BEAS-2B)

## 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında geliştirilen kumarin-tabanlı P3 prob, serbest tiyol grubu içeren moleküllerin tayininde yüksek duyarlılık ve seçicilik sergilemiştir. Literatürde mevcut yöntemlerle karşılaştırıldığında, P3 probunun suda çözünür olması ve biyotiyollerle etkileştiğinde floresans sinyal artışı göstermesi önemli avantajlar olarak öne çıkmaktadır. Bu özellikler, probun serbest tiyollerin kantitatif ve kalitatif analizlerde kullanılabilmesinin yanında hücre görüntülemeleri gibi biyokimyasal analizlerde de kullanılabileceğini göstermektedir.

Sentezlenen P3 probu kimyasal sentez basamakları, yapısal doğrulaması ve optik özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Şekil 2.1’de gösterilen sentez yolu, literatürde bilinen klasik organik reaksiyonların verimli bir şekilde birleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta 4-(dietilamino) salisilaldehit ve p-hidroksifenilasetik asit kullanılarak Perkin reaksiyonu ile P1 bileşiği elde edilmiştir. Bu basamak, aromatik aldehitlerin etkin şekilde türevlenmesine olanak sağlamış ve sonraki adımlar için uygun bir başlangıç noktası oluşturmuştur. Ardından Duff formilasyonu ile P1’in hekzametilentetramin (HMTA) kullanılarak asetik asit ortamında formillenmesi sonucunda P2 ara ürünü elde edilmiştir. Bu ara ürün, sentezin kilit aldehit bileşiği olarak literatürde yeni bir katkı sunmaktadır. Son aşamada ise P2’nin 1-etil-2-metilkinolinyum iyodür ile bazik koşullarda etanol ortamında kondenzasyon reaksiyonuna sokulmasıyla hedef molekül P3 başarıyla sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. (Şekil 2.1.).

Yapısal doğrulama çalışmaları, sentezlenen bileşiklerin kimyasal bütünlüğünü ve saflığını güçlü biçimde desteklemiştir. P3 probunun <sup>1</sup>H NMR spektrumunda aromatik ve alifatik bölgelerde gözlenen karakteristik sinyaller, molekülün beklenen yapıya uygun olduğunu ve saf olarak elde edildiğini göstermiştir (Şekil 3.7.). <sup>13</sup>C NMR spektrumunda karbonil, aromatik ve alifatik karbonlara ait sinyallerin açıkça gözlenmesi, yapısal doğrulamayı pekiştirmiştir (Şekil 3.8.). Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) analizleri ise hesaplanan ve gözlenen değerler arasında mükemmel uyum olduğunu ortaya koymuş, molekülün doğru formüle sahip olduğunu kesin olarak doğrulamıştır (Şekil 3.9.). Bu veriler, sentezin başarıyla gerçekleştirildiğini ve hedef molekülün yüksek saflıkta elde edildiğini göstermektedir.

P3’ün optik karakterizasyonu, özgün ve güçlü bir floresans probu sentezlendiğini göstermektedir. UV-vis spektroskopisi ile 407 nm dalga boyunda gözlenen absorpsiyon bandı,

$\pi$ - $\pi^*$  geçişine atfedilmiştir (Şekil 3.11.). Sentezlenen probun molar absorptivite değerinin 31,400 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> olarak belirlenmesi, probun ışık soğurma kapasitesinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 3.10’da gösterildiği gibi, bu dalga boyunda uyarıldığında P3 probunun 497 nm civarında belirgin bir emisyon verdiği görülmüştür. Bu durum yaklaşık 90 nm’lik geniş bir Stokes kaymasına işaret etmektedir. Stokes kaymasının bu denli büyük olması, floresans sensör uygulamalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır; çünkü kendi absorpsiyonuna bağlı emisyon sinyal kayıplarını azaltmakta ve ölçüm çözünürlüğünü artırmaktadır. Ayrıca emisyonun yeşil bölgede olması, probun biyolojik örneklerde gerçekleşen otofloresans sorunundan etkilenmeyeceğini ve hücre görüntülemesi ve biyolojik numunelerde tayinler gibi uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu bulgular ışığında, P3 probunun hem kimyasal sentez açısından özgün bir katkı sunduğu hem de optik özellikleri bakımından güçlü bir floresans sensör adayı olduğu sonucuna varılabilir. Özellikle geniş Stokes kayması ve yüksek sinyal çözünürlüğü, probun biyolojik sistemlerde ve analitik uygulamalarda güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Literatürde yer alan benzer kumarin-tabanlı problemlerle karşılaştırıldığında, P3, sentez kolaylığı, suda çözünürlüğü ve üstün optik performansı ile belirgin avantajlar sunmaktadır.

P3 probun floresans özellikleri, Şekil 3.12’de gösterildiği gibi çözücü polaritesi ve hidrojen bağlama kapasitesine bağlı olarak değişim göstermiştir. Özellikle düşük polariteli çözücülerde (etanol, DMF ve asetonitril) 475 nm civarında gözlenen emisyon maksimumu, probun temel floresans karakterini yansıtmaktadır. Buna karşın yüksek polariteli aprotik çözücü olan DMSO’da emisyon maksimumunun 480 nm’ye kayması, ortam polaritesinin uyarılmış durumun enerjisini stabilize ettiğini göstermektedir.

Daha dikkat çekici bulgu ise, karışık sulu ortamda (su içinde %5 DMSO, v/v) gözlenen belirgin batokromik kaymadır. Bu ortamda emisyon bandı 497 nm’ye kaymış ve yaklaşık 20 nm’lik bir kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Bu kayma, P3 probunun uyarılmış durumunun polar ve hidrojen bağlayıcı ortamlar tarafından stabilize edilmesiyle açıklanabilir. Enerji seviyeleri arasındaki farkın azalması, emisyonun daha uzun dalga boyuna kaymasına neden olmuştur. Bu davranış, literatürde “pozitif solvatokromizm” olarak tanımlanan olgu ile uyumludur ve probun intramoleküler yük transferi (ICT) karakterini açıkça ortaya koymaktadır. Kumarin türevi moleküllerin bu özellikleri gösterdikleri bilinmektedir (Zhang vd., 2021).

Pozitif solvatokromik yanıt, P3 probunun yalnızca çözücü polaritesine değil, aynı zamanda hidrojen bağlama kapasitesine de duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu özellik,

biyolojik sistemlerdeki mikroçevre farklılıklarının incelenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Hücre içi ortamda polarite ve hidrojen bağlama özellikleri sürekli değişkenlik gösterdiğinden, P3 gibi duyarlı probalar bu değişimlerin izlenmesinde güçlü araçlar olarak kullanılabilir. Özellikle proteinlerin katlanma süreçleri, membran yapılarındaki polarite farklılıkları ve hücrel redoks dengesizlikleri gibi biyolojik fenomenlerin araştırılmasında P3 probunun uygulanabilirliği dikkat çekicidir.

Geliştirilen P3 probunun optimum duyarlılık ve seçicilik performansını elde edebilmek için çeşitli deneysel parametreler değerlendirilmiştir. Model analit olarak L-Cys kullanılmış ve sensör yanıtı floresans artışı ( $\Delta F = F - F_0$ ) ( $F_0$  analit eklenmeden önceki floresans şiddetini,  $F$  ise analit eklendikten sonraki floresans şiddetini ifade etmektedir) üzerinden kantitatif olarak incelenmiştir. Bu yaklaşım, probun tiyol grupları ile etkileşim mekanizmasını daha net ortaya koymuş ve analitik performansın güvenilir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

İlk olarak pH'ın sensör performansı üzerindeki etkisi Britton-Robinson tampon sistemi kullanılarak 2-12 aralığında incelenmiştir (Şekil 3.13.). Elde edilen veriler, floresans artışının pH'a güçlü biçimde bağlı olduğunu göstermiştir. Maksimum  $\Delta F$  değerinin fizyolojik koşullara karşılık gelen pH 7'de elde edilmesi, sensörün biyolojik ortamlarda kullanılabilirliğini destekleyen önemli bir bulgudur. Hem asidik hem de bazik koşullarda floresans artışının azalması, prob-tiyol etkileşiminin protonasyon ve deprotonasyon süreçlerinden etkilendiğini göstermektedir. Bu durum, tiyol gruplarının iyonizasyon durumunun prob ile etkileşim verimini doğrudan etkilediğini göstermektedir.

Bir diğer parametre olarak etkileşim süresinin sensör yanıtı üzerindeki etkisi araştırılmış, elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'te verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda 5 dakikalık aralıklarla, floresans artışının 10. dakikada maksimum seviyeye ulaştığı ve sonrasında plato çizdiği gözlenmiştir. Bu bulgu prob-tiyol etkileşiminin 10 dakika içerisinde tamamlandığını ve daha uzun inkübasyon sürelerinin ek bir avantaj sağlamadığını göstermektedir. Dolayısıyla, 10 dakikalık etkileşim süresi ile sinyal farkı arttığı için sensör için hassasiyetin en yüksek olduğu en düşük süre olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, sensörün güvenilir ve hızlı yanıt verme kapasitesini artırıp biyolojik uygulamalarda zaman açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. Genel olarak, etkileşim süresi ve ortamın pH'ını optimize ederek sistemin analitik performansını artırılmıştır. Ayrıca, bu parametrelerin belirlenmesi, sensörün rutin kullanımda daha öngörülebilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesini sağlanmış, aynı zamanda uygulamalarda dikkat edilmesi gereken parametreler belirlenmiştir.

Optimizasyon sonrası P3 probunun analitik performansı, L-Cys ve GSH gibi biyolojik açıdan kritik tiyol bileşikleri üzerinde sistematik olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.15'te gösterildiği gibi, optimum koşullar altında yapılan floresans ölçümleri, L-Cys derişiminin artışıyla birlikte floresans şiddetinde belirgin bir artış meydana geldiğini göstermiştir. Bu bulgu, probun tiyol gruplarına karşı duyarlı olduğunu ve sensör-analit etkileşiminin gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrisi Şekil 3.16'da verilmiş, 10-60  $\mu\text{M}$  aralığında yüksek tayin katsayısı ( $R^2 \approx 0,99$ ) ile doğrulanmış, aşağıda belirtilen formül ile hesaplanan 5,32  $\mu\text{M}$ 'lik düşük teşhis sınırı (TS) değeri ise sensörün hassasiyetini göstermiştir (Ozkan vd., 2015).

$$\text{TS} = (3 \times \text{Başlangıç ordinatının standart sapması}) / \text{Doğrunun Eğimi}$$

Floresans verilerini destekleyen UV-Vis absorbans çalışmaları, L-Cys ilavesiyle absorbans şiddetinde konsantrasyona bağlı bir azalma meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 3.17). Bu sonuç, prob-tiyol etkileşiminin kuvvetli olduğunu ve floresans verilerinin güvenilirliğini pekiştirdiğini göstermektedir. Ayrıca gün içi ve günler arası yapılan geri kazanım testlerinde %98-102 aralığında elde edilen değerler, sensörün yüksek doğruluk ve tekrar edilebilirlik sergilediğini doğrulamaktadır. Bu bulgular, P3 probunun rutin L-Cys tayini için güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde GSH için yapılan çalışmalar, probun farklı tiyol bileşikleri için de yüksek duyarlılık ve seçicilik sergilediğini ortaya koymuştur. Şekil 3.18'de verilen floresans spektrumlarına göre GSH derişiminin artışıyla floresans şiddetinde orantılı bir artış gözlenmiş, 10-50  $\mu\text{M}$  aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.19.). Hesaplanan 5,94  $\mu\text{M}$ 'lik TS değeri, P3 probunun düşük mikromolar seviyelerde bile doğru ölçüm yapabildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, sensörün yalnızca L-Cys değil, aynı zamanda GSH gibi biyolojik açıdan önemli tiyollerin tayininde de kullanılabileceğini ve geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Sensörün tekrar edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla seçilen 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  L-Cys konsantrasyonlarda yapılan analizler, sistemin güvenilirliğini güçlü biçimde ortaya koymuştur. Çizelge 3.1'de verilen gün içi ve günler arası geri kazanım değerlerinin %100'e yakın olması, yöntemin doğruluğunu ve ölçüm güvenilirliğini desteklemektedir. Ayrıca BSS değerlerinin %2'nin altında bulunması, sensörün yüksek derecede tekrar edilebilirlik sergilediğini göstermektedir. Bu bulgular, geliştirilen P3 probunun rutin analizlerde kullanılabilir bir yöntem olduğunu doğrulamaktadır.

Sensörlerin güvenilirliği açısından en kritik gerekliliklerden biri, hedef analite karşı yüksek seçicilik göstermesidir. Bu çalışmada geliştirilen P3 probunun seçiciliği optimize edilmiş koşullar altında sistematik olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar probun serbest tiyol grubu içeren aminoasitlere karşı belirgin bir tercih gösterdiğini ortaya koymuştur. Şekil 3.20’de gösterildiği gibi L- Cys ve GSH gibi tiyol içeren analitlerde floresans sinyal farkı ( $\Delta F$ ) çok yüksek iken, tiyol içermeyen aminoasitler ve plazmada yaygın olarak bulunan diğer bileşiklerde  $\Delta F$  değerinin %10’un altında kalması, sensörün yüksek özgüllük sergilediğini güçlü biçimde doğrulamaktadır. Serbest tiyol içeren bir başka molekül olan Hcy molekülüne karşı ise bir yanıt elde edilmiş olmakla birlikte, sinyal farkının Cys ve GSH ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüştür; bu durum, Hcy’nin yapısal farklılıklarından kaynaklanan etkileşim verimindeki azalmaya bağlanmaktadır.

Bu bulgular, P3 probunun yalnızca tiyol gruplarına karşı seçici yanıt verdiğini ve olası girişim yapabilecek maddelere karşı anlamlı bir sinyal üretmediğini göstermektedir. Böylece probun kompleks matrislerde kullanılabilme potansiyelinin olduğu değerlendirilmiştir.

P3 probunun biyotiyollerle etkileşim mekanizması Şekil 3.21’de açıklanmış ve NMR spektroskopisi ile ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sensörün yalnızca -SH grubu içeren aminoasitlerle anlamlı etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur. Cys ilavesiyle 6,85 ppm’deki proton sinyalinin kaybolması ve 6,80-7,55 ppm aralığında yeni piklerin ortaya çıkması, P3’ün spiro formuna dönüşümünü güçlü biçimde desteklemektedir. Bu bulgu, merosiyanin türevlerinin çevresel koşullara bağlı olarak spiropiran formlarına geçiş yapabileceğini gösteren literatürle uyumludur ve P3’ün biyotiyollerle etkileşiminde benzer bir dönüşüm mekanizmasının gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Şekil 3.22. ve Şekil 3.23.) (Kazachkova vd., 2023)

Cys ilavesiyle 10,3 ppm’deki -OH sinyalinin kaybolması ve 3,1 ppm’de yeni bir sinyalin ortaya çıkması, spiro-P3 yapısındaki N-CH<sub>2</sub> protonlarına (kuaternize N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>’ten-->N-CH<sub>2</sub>) atfedilmiştir. Şekil 3.24’te verilen HMBC spektrumunda bu protonların Hd protonu ile aynı karbon üzerinde korelasyon göstermesi, spiro türevinin oluşumunu doğrulayan bir başka veridir. Bu yapısal dönüşüm, probun biyotiyollerle etkileşiminde kooperatif bir mekanizmanın varlığını işaret etmekte ve floresans yanıtındaki belirgin artışı açıklamaktadır.

DMSO-su karışımında gözlenen proton rezonanslarının çiftlenmesi ise E/Z izomerizmine bağlanmış, aynı ortamda floresans spektrumunda kaydedilen hafif batokromik kayma da spiro dönüşümünü destekleyen ek bir kanıt olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, P3 probunun biyotiyollerle etkileşiminde yalnızca floresans yanıtı değil, aynı zamanda yapısal

dönüşüm mekanizmasıyla da özgün bir davranış sergilediğini göstermektedir. Dolayısıyla, P3'ün biyotiyol tayininde yüksek seçicilik ve duyarlılık sunmasının yanı sıra, literatüre moleküler düzeyde mekanistik bir katkı sağladığı sonucuna varılabilir (Kortekaas vd., 2018; Mandal vd., 2022; Seiler vd., 2018).

Job's plot yöntemiyle yapılan bağlanma stokiyometrisi çalışmaları, P3 probunun tiyol analitlerle 2:1 oranında etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur. Şekil 3.25'te gösterilen grafiğe göre maksimum floresans yanıtının mol fraksiyonu 0,67'de elde edilmesi, iki P3 molekülünün bir tiyol molekülü ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu bulgu, sensörün mekanizmasına dair önemli bilgiler sunmakta ve olası kooperatif etkileşimlerin floresans yanıtını güçlendirdiğini düşündürmektedir (Maity vd., 2026).

Proteinlerin yapısal bütünlüğü ve biyolojik fonksiyonlarının korunmasında serbest tiyol (-SH) grupları kritik bir rol oynamaktadır. Disülfid bağlarının oluşumu ve indirgenmesi doğrudan bu gruplar aracılığıyla gerçekleştiğinden, serbest tiyollerin kantitatif tayini proteinlerin üçüncül yapısının değerlendirilmesinde önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Katlanma, açılma veya denatürasyon gibi yapısal değişiklikler serbest tiyol gruplarının erişilebilirliğini ve sayısını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, tiyollerin hassas ve seçici tayini proteinlerin konformasyonel durumlarının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada geliştirilen sensörün proteinlerde serbest tiyol gruplarını tespit etme potansiyeli incelenmiştir. Şekil 3.26'da gösterildiği gibi ilk olarak tiyol grubu içermeyen model protein  $\alpha$ -sinüklein sensör çözeltisine eklenmiş ve floresans şiddetinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgu, sensörün tiyol gruplarına karşı yüksek seçicilik sergilediğini ve diğer fonksiyonel gruplardan kaynaklanan sinyallere duyarsız olduğunu göstermektedir. Buna karşın, serbest Cys içeren BSA proteininin eklenmesiyle belirgin bir floresans artışı kaydedilmiş ve emisyon spektrumunda yeşilden maviye kayma şeklinde bir renk değişimi gözlenmiştir. Bu kayma, probun tiyol gruplarına bağlanmasıyla çözücü etkilerinden korunarak daha rijit bir mikroçevreye geçiş yapmasıyla açıklanabilir. BSA, küçük molekülleri genellikle hidrofobik bağlanma ceplerine (Sudlow site I ve site II) bağlar ve bu bölge sulu çözeltiye göre daha düşük polariteye sahiptir (Mavani vd., 2023; Wang vd., 2025). Solvatokromizm deneylerinin sonuçlarına göre (Şekil 3.12.), polaritedeki düşüşün solvatokromik P3'ün floresansını maviye kaydırması beklenmektedir. Dolayısıyla, BSA'daki serbest tiyol ile etkileşim ile gerçekleşen floresans artışı yanında, mikroçevredeki olası polarite azalışı ve molekülün rijit bir şekilde çevrelenmesi dolayısıyla dönme hareketlerinin sınırlandırılması hipsokromik kaymaya da sebep olduğu düşünülmektedir. Böylece sensörün yalnızca proteinlerdeki serbest tiyollerle etkileşerek üçüncül yapısıyla ilgili bilgi vermekle

kalmayıp, aynı zamanda proteinlerin mikroçevre değişimlerine de duyarlı olduğu ortaya konulmuştur (Maag vd., 2021; Putzu vd., 2018). Rekombinant proteinlerin üçüncül yapılarının karakterizasyonları için kullanılan yöntemlerden biri de serbest tiyol miktarının kitler kullanılarak ölçülmesidir. Bunun için çeşitli ticari kitler bulunmaktadır. P3 probunun da bu amaçla kullanılabilme potansiyeli olduğu gösterilmiştir.

Sensörün küçük moleküller üzerindeki performansı da ayrıca değerlendirilmiştir. Şekil 3.28’de verilen spektrumlardan anlaşıldığı gibi disülfid bağı içeren ALA molekülü sensör ortamına eklendiğinde anlamlı bir floresans yanıtı meydana gelmemiştir. Ancak indirgeme ajanı olarak sodyum borhidrür ilavesiyle disülfid bağlarının kırılması ve ALA’nın DHALA formuna dönüşmesi sonucunda belirgin bir floresans artışı kaydedilmiştir. Bu bulgu, geliştirilen probun proteinler dışında küçük moleküllerdeki disülfid bağı- serbest tiyol grupları hakkında bilgi verebileceğini ve indirgenme süreçlerinin karakterizasyonu için kullanılabileceğini göstermektedir.

Genel olarak elde edilen sonuçlar, geliştirilen sensörün hem proteinlerde hem de küçük moleküllerde serbest tiyol gruplarını seçici ve hassas biçimde tespit edebildiğini ortaya koymaktadır. Daha da önemlisi, sensörün mikroçevre değişimlerine karşı gösterdiği duyarlılık, proteinlerin üçüncül yapısının ve konformasyonel değişimlerinin incelenmesinde analitik bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

L-Cys kullanımının gıda takviyelerinde yaygın olduğu ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin literatürde güçlü biçimde desteklendiği bilinmektedir. Bu çalışmada geliştirilen sensörün pratik uygulanabilirliği, ticari bir gıda takviyesi üzerinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, sensörün gerçek numunelerde güvenilir şekilde kullanılabileceğini ve biyolojik açıdan önemli tiyol gruplarının tayininde yüksek doğruluk sergilediğini göstermiştir. Yöntemin doğruluk ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla elde edilen veriler, standart Ellman reaktifi yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen Cys miktarları mg cinsinden Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler (t-testi), iki yöntemden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir (Çizelge 3.3). Geliştirilen sensörün doğruluk açısından yerleşik yöntemlerle karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini ve rutin kalite kontrol uygulamalarında kullanılabilecek bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Genel olarak, bu çalışma geliştirilen sensörün yalnızca laboratuvar ortamında değil, aynı zamanda ticari ürünlerin kalite kontrolünde de güvenle kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Sensörün yüksek doğruluk, tekrar edilebilirlik ve pratik uygulanabilirliği, gıda

takviyelerinin rutin analizlerinde ayırma yöntemlerine alternatif olarak kolay ve uygulanabilir bir yaklaşım sunduğunu desteklemektedir.

Tasarlanan P3 probunun en dikkat çekici avantajlarından biri, kanserli ve sağlıklı hücreleri serbest tiyol seviyelerindeki farklılıklar üzerinden ayırt edebilme kapasitesidir. Kanser hücreleri genellikle yüksek konsantrasyonlarda GSH bulundurması, P3'ün seçici ve floresans artışına dayanan yanıt verme özelliğini hücreSEL görüntüleme açısından son derece etkili kılmaktadır. Sitotoksik etkileri en aza indirmek amacıyla düşük oranlarda organik çözücü (DMSO) kullanılmış ve deneyler boyunca hücre canlılığı yüksek düzeyde korunmuştur. P3 ile inkübasyon sonrasında kanser hücrelerinde belirgin floresans sinyali gözlenirken, aynı koşullardaki sağlıklı hücrelerde yalnızca ihmal edilebilir düzeyde floresans kaydedilmiştir.

Şekil 3.29-3.32'te açıkça görüldüğü üzere, kanserli ve normal hücre hatları arasındaki kontrast oldukça belirgindir. Kolon kanseri hücreleri (HT29) güçlü yeşil floresans sergilerken, sağlıklı kolon epitelyal hücreleri (FHC) neredeyse floresans vermemiştir. Benzer şekilde, akciğer kanseri hücrelerinde (A549) yoğun floresans sinyali kaydedilmiş, buna karşılık sağlıklı akciğer epitelyal hücrelerinde (BEAS2-B) çok zayıf floresans gözlenmiştir. Bu sonuçlar, P3 probunun malign ve benign hücreleri GSH içeriklerine bağlı olarak etkin biçimde ayırt edebildiğini güçlü bir şekilde göstermektedir.

Ayrıca bu ayırt edebilme özelliğinin farklı konsantrasyon ve büyütme koşullarında tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir. Her hücre hattı için optimum koşullar belirlenmiş; örneğin A549 hücrelerinde 5  $\mu$ M P3 ile 20x büyütmede, HT29 hücrelerinde ise 2,5  $\mu$ M P3 ile 20x büyütmede en uygun sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.33). Genel olarak, P3 probunun canlı hücre görüntülemesinde sergilediği üstün performans, onun yalnızca tiyol tayini için analitik bir prob değil, aynı zamanda kanser hücrelerindeki redoks dengesizliklerini görselleştirmede güçlü bir tanısal araç olabileceğini göstermektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yeni bir kumarin-tabanlı floresans prob (P3) başarıyla sentezlenmiş ve spektrofotometrik yöntemlerle yüksek saflıkta karakterize edilmiştir. Ara bileşik P2'nin özgün yapısı, literatürde ilk kez rapor edilmiş olup, tek adımda sentezlenebilmesi sayesinde sentetik kimya açısından önemli bir katkı sunmaktadır. Bu durum, P2'nin gelecekte farklı türevlerin geliştirilmesinde değerli bir ara ürün olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Yöntemin geleneksel kolorimetrik ölçüme dayanan Ellman reaktifi gibi standart tekniklere kıyasla floresans şiddetinde artışa neden olduğu için sunduğu yüksek hassasiyet avantajı dikkat çekicidir. Ayırma yöntemleriyle karşılaştırıldığında ise P3 probu ile gerçekleştirilen analizler; hızlı ölçüm süresi, yüksek duyarlılık, düşük maliyet ve çözücü olarak su kullanılması gibi avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar, probun, serbest tiyollerin tayinlerinde varolan metotlara alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Geliştirilen P3 floresans probu, Cys ve GSH gibi serbest tiyol grubu içeren biyomoleküllere karşı güçlü ve seçici bağlanma göstermiş, bu etkileşimler sonucunda floresans şiddetinde belirgin artışlar kaydedilmiştir. Seçicilik deneyleri, probun yüksek özgüllük ve güvenilirliğini doğrulamış; plazma numunelerinde yaygın olarak bulunan aminoasitler ve vitaminlerle yapılan karşılaştırmalar, P3'ün yalnızca tiyol gruplarına yanıt verdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmaları sensörün doğruluk, doğrusalılık, kesinlik ve hassasiyet açısından üstün performans sergilediğini göstermiştir. Kalibrasyon çalışmaları geniş bir konsantrasyon aralığında güçlü korelasyon ve düşük algılama sınırı ile probun hassasiyetini ortaya koyarken, seçicilik testleri biyolojik sistemlerde kullanılabilirliğini desteklemiştir. Bu bulgular, P3 probunun biyolojik örneklerde güvenilir tayinler için uygun bir sensör olduğunu ve gelecekte klinik, gıda ve farmasötik analizlerde potansiyel kullanım alanlarına sahip olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen prob P3'ün floresansı tiyollerle etkileşim sonrası artış göstermektedir. Bu floresans problemleri için sinyal sönümlenmesine göre tercih edilen bir özelliktir. Bu özellik hücre görüntülemeleri için oldukça kullanışlıdır. Bu sayede, kanserli hücrelerde ve sağlıklı hücrelere nazaran artan GSH miktarına bağlı olarak P3'ün floresansındaki yükselme kanserli hücrelerin teşhisinde kullanılmıştır. Kolon ve akciğer kanseri hücrelerinde görüntülenen yüksek yeşil floresans, sağlıklı hücrelerde gözlenen düşük sinyallerle karşılaştırıldığında, probun malign ve benign hücreleri ayırt etme kapasitesini açıkça ortaya konmuştur. Bu özellik, P3'ün yalnızca

küçük moleküllerin tayininde değil, aynı zamanda görüntüleme ajanı olarak kanser tanısında da değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Geliştirilen P3 probu, proteinlerde serbest tiyol gruplarını yüksek seçicilikle tespit edebilmiştir.  $\alpha$ -sinüklein ile floresans değişimi gözlenmemesi probun özgülüğünü, BSA ile belirgin floresans artışı ise tiyol etkileşimine duyarlılığını göstermektedir. Bu bulgular, probun hem serbest tiyol miktarını belirlemede hem de proteinlerin konformasyonel durumlarını değerlendirmede kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Sensör, küçük moleküllerde disülfid bağlarının indirgenmesiyle oluşan serbest tiyol gruplarına duyarlı olduğunu göstermiştir. ALA ile floresans yanıtı gözlenmemesi, ancak indirgeme sonrası DHALA formunda belirgin artış kaydedilmesi, probun indirgenme süreçlerinin karakterizasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Ayrıca, ticari gıda takviyesinde serbest tiyol gruplarını güvenilir şekilde tespit etmiş ve Ellman yöntemiyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir. Bu bulgular, yöntemin doğruluk açısından yerleşik yöntemlerle uyumlu olduğunu ve rutin kalite kontrol uygulamalarında kullanılabilecek pratik bir alternatif sunduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma serbest tiyol tayini için yüksek hassasiyet ve seçicilik sunan yeni bir kumarin-tabanlı floresans prob (P3) geliştirmiştir. Prob, hızlı analiz süresi, düşük maliyet ve su bazlı çözücü kullanımıyla geleneksel yöntemlere güçlü bir alternatif oluştururken hücre görüntüleme uygulamalarında da başarılı sonuçlar vermiştir. Kanserli hücrelerde artan GSH seviyelerine duyarlı floresans artışı, probun tanısız görüntüleme ajanı olarak potansiyelini ortaya koymuştur. Ayrıca, indirgenme süreçlerinde doğruluk ve gıda takviyelerinde yerleşik yöntemlerle uyumlu bulunması, P3'ün klinik, gıda ve farmasötik analizlerde çok yönlü bir sensör olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Akunal, C. & Alisik, M. (2024). Deteriorated thiol-disulphide and oxidized-reduced glutathione status in blood in Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, 133-134. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2024.110817>
- Al-Temimi, A. A., Al-Mossawi, A. E. B., Al-Hilifi, S. A., Korma, S. A., Esatbeyoglu, T., Rocha, J. M. & Agarwal, V. (2023). Glutathione for Food and Health Applications with Emphasis on Extraction, Identification, and Quantification Methods: A Review. İçinde *Metabolites* (C. 13, Sayı 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo13040465>
- Balendiran, G. K., Dabur, R. & Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct*, 22, 343-352. <https://doi.org/10.1027/cbf.1149>
- Calvo-Marzal, P., Chumbimuni-Torres, K. Y., Höehr, N. F. & Kubota, L. T. (2006). Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte with amperometric sensor based on TTF-TCNQ. *Clinica Chimica Acta*, 371(1-2), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.006>
- Chen, W., Zhao, Y., Seefeldt, T. & Guan, X. (2008). Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(5), 1375-1380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.08.033>
- Chen, Y., Qin, X., Yuan, C. & Wang, Y. (2020). Switch on fluorescence mode for determination of l-cysteine with carbon quantum dots and Au nanoparticles as a probe. *Royal Society of Chemistry Advances*, 10(4), 1989-1994. <https://doi.org/10.1039/c9ra09019c>
- Coşkun, C., Öztürk Emre, H., Gümüş, A., Uzun, S., Karadağ, S., Behlül, A., Düz, M. E., Koldaş, M. & Öztürk, S. (2016). *Diyabetik ve Diyabetik Olmayan Kronik Böbrek Yetmezliğinde Dinamik Tiyol Disülfid Homeostazi ve İleri Protein Oksidasyon Ürünleri (AOPPs)[#312386]-303074*.
- Cruz, C. F., Martins, M., Egipto, J., Osório, H., Ribeiro, A. & Cavaco-Paulo, A. (2017). Changing the shape of hair with keratin peptides. *Royal Society of Chemistry Advances*, 7(81), 51581-51592. <https://doi.org/10.1039/c7ra10461h>
- Erel, Ö. & Erdoğan, S. (2020). Thiol-disulfide homeostasis: An integrated approach with biochemical and clinical aspects. İçinde *Turkish Journal of Medical Sciences* (C. 50, Sayı SI-2, ss. 1728-1738). Türkiye Klinikleri. <https://doi.org/10.3906/sag-2003-64>
- Feige, M. J., Braakman, I. & Hendershot, L. M. (2018a). *Chapter 1.1. Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability* (ss. 1-33). <https://doi.org/10.1039/9781788013253-00001>
- Feige, M. J., Braakman, I. & Hendershot, L. M. (2018b). *Section I Principles and Analysis of Disulfide Bond Formation*. [www.rsc.org](http://www.rsc.org)
- Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. İçinde *Molecular Aspects of Medicine* (C. 30, Sayı 1-2, ss. 1-12). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

- Gai, F., Li, L., Yu, Y., Han, Z., Jin, L., Ao, Y., Liu, Y. & Huo, Q. (2018). Multiple dye-doped silica cross-linked micellar nanoparticles for colour-tuneable sensing of cysteine in an aqueous media and living cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 529, 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.06.060>
- Galano, A. & Alvarez-Idaboy, J. R. (2011). Glutathione: Mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *Royal Society of Chemistry Advances*, 1(9), 1763-1771. <https://doi.org/10.1039/c1ra00474c>
- Gao, L., Wang, W., Wang, X., Yang, F., Xie, L., Shen, J., Brimble, M. A., Xiao, Q. & Yao, S. Q. (2021). Fluorescent probes for bioimaging of potential biomarkers in Parkinson's disease. İçinde *Chemical Society Reviews* (C. 50, Sayı 2, ss. 1219-1250). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00115e>
- Gao, Y., Zhu, Y., Awakawa, T. & Abe, I. (2024). Unusual cysteine modifications in natural product biosynthesis. İçinde *Royal Society of Chemistry Chemical Biology* (C. 5, Sayı 4, ss. 293-311). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d4cb00020j>
- Garrido Ruiz, D., Sandoval-Perez, A., Rangarajan, A. V., Gunderson, E. L. & Jacobson, M. P. (2022). Cysteine Oxidation in Proteins: Structure, Biophysics, and Simulation. İçinde *Biochemistry* (C. 61, Sayı 20, ss. 2165-2176). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00349>
- Ghanizadeh, A., Akhondzadeh, S., Hormozi, M., Makarem, A., Abotorabi-Zarchi, M. & Firoozabadi, A. (2012). Glutathione-Related Factors and Oxidative Stress in Autism, A Review. İçinde *Current Medicinal Chemistry* (C. 19).
- Ghobadloo, P. A., Keles, G., Yarman, A., Hamidi, S. & Kurbanoglu, S. (2024). Determination of amino acids and other clinically significant molecules at surfactant-based electrochemical sensors and biosensors. İçinde *Surfactant Based Electrochemical Sensors and Biosensors* (ss. 315-342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15493-5.00002-6>
- Green, M. J., Ge, H., Flower, S. E., Pourzand, C., Botchway, S. W., Wang, H. C., Kuganathan, N., Kociok-Köhn, G., Li, M., Xu, S., James, T. D. & Pascu, S. I. (2023). Fluorescent naphthalimide boronates as theranostics: structural investigations, confocal fluorescence and multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Royal Society of Chemistry Chemical Biology*, 4(12), 1082-1095. <https://doi.org/10.1039/d3cb00112a>
- Grover, K., Waseem, M. T., Guo, H. & New, E. J. (2025). Quantitative Analysis of Fluorescent Sensor Arrays. İçinde *Analysis and Sensing*. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/anse.202500052>
- Haseena, P. A., Diwakar, L. & Ravindranath, V. (2022). Protein Glutathionylation and Glutaredoxin: Role in Neurodegenerative Diseases. İçinde *Antioxidants* (C. 11, Sayı 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11122334>
- Hu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Huang, Y., Zhang, H., Wu, J. & Liu, C. (2023). Combination of hydrophilic quinolinium group and ortho-aldehyde group accelerated thiolysis of dinitrophenyl ether: A colorimetric and turn-on fluorescent probes for the detection of hydrogen sulfide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 445. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.115082>
- Hyslop, P. A., Boggs, L. N. & Chaney, M. O. (2023). Origin of Elevated S-Glutathionylated GAPDH in Chronic Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065529>

- Kalinichev, A. V., Zieger, S. E. & Koren, K. (2023). Optical sensors (optodes) for multiparameter chemical imaging: classification, challenges, and prospects. İçinde *Analyst* (C. 149, Sayı 1, ss. 29-45). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d3an01661g>
- Kazachkova, V. I., Nguen, S. T., Bulanov, A. O., Tsaturyan, A. A., Chan, L. D. & Shcherbakov, I. N. (2023). Interrelation Between the Spiropyran-Merocyanine Isomerism and the Metal Coordination in 3d Metal Complexes of a Functionalized Spiropyran of the 2-Oxaindane Series. *Journal of Structural Chemistry*, 64(8), 1492-1503. <https://doi.org/10.1134/S0022476623080139>
- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E. & Cuperlovic-culf, M. (2020). Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. İçinde *Biomolecules* (C. 10, Sayı 10, ss. 1-27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>
- Kerksick, C. & Willoughby, D. (2005). The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2(2). <https://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>
- Khan, D. & Shaily. (2023). Coumarin-based fluorescent sensors. İçinde *Applied Organometallic Chemistry* (C. 37, Sayı 7). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/aoc.7138>
- Khani, S. & Rezaei, P. (2024). Optical sensors based on plasmonic nano-structures: A review. İçinde *Heliyon* (C. 10, Sayı 24). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40923>
- Kortekaas, L., Chen, J., Jacquemin, D. & Browne, W. R. (2018). Proton-Stabilized Photochemically Reversible E/ Z Isomerization of Spiropyrans. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(24), 6423-6430. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b03528>
- Kumar, K., Braunstein, T. H., Hernandez-Varas, P., Liisberg, M. B. & Laursen, B. W. (2025). A water-soluble, long fluorescent lifetime DNA probe for real-time dynamic visualization of mitosis in live cells and applicability for FLIM/time-gated imaging. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/d5tb00404g>
- Lai, Y. T., Ganguly, A., Chen, L. C. & Chen, K. H. (2010). Direct voltammetric sensing of l-Cysteine at pristine GaN nanowires electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1688-1691. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.005>
- Li, H., Wang, X., Liu, Y., Zhang, P., Chen, F., Zhang, N., Zhao, B. & Guo, Y. D. (2024). Cysteine Thiol-Based Oxidative Post-Translational Modifications Fine-Tune Protein Functions in Plants. İçinde *Agronomy* (C. 14, Sayı 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agronomy14122757>
- Ling, Y. Y., Yin, X. F. & Fang, Z. L. (2005). Simultaneous determination of glutathione and reactive oxygen species in individual cells by microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 26(24), 4759-4766. <https://doi.org/10.1002/elps.200500232>
- Ma, Q., Yang, X. & Zhao, Y. (2025). Development of a Coumarin-Based Schiff Base Fluorescent Probe and its Application in Detection of Cu<sup>2+</sup>. *Journal of Fluorescence*. <https://doi.org/10.1007/s10895-024-04114-9>

- Maag, D., Putzu, M., Gómez-Flores, C. L., Gräter, F., Elstner, M. & Kubař, T. (2021). Electrostatic interactions contribute to the control of intramolecular thiol-disulfide isomerization in a protein. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23(46), 26366-26375. <https://doi.org/10.1039/d1cp03129e>
- Maity, M. B., Sahoo, P., Bairy, G., Nandi, S. K., Ghosh, C. K. & Sinha, C. (2026). Credentials of chromone based probe as colorimetric sensor for the detection of Cu<sup>2+</sup> ion: design of test paper kit and potential anticancer activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 344. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126638>
- Majhi, A., Venkateswarlu, K. & Sasikumar, P. (2024). Coumarin Based Fluorescent Probe for Detecting Heavy Metal Ions. İçinde *Journal of Fluorescence* (C. 34, Sayı 4, ss. 1453-1483). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03372-3>
- Mandal, M., Banik, D., Karak, A., Manna, S. K. & Mahapatra, A. K. (2022). Spiropyran-Merocyanine Based Photochromic Fluorescent Probes: Design, Synthesis, and Applications. İçinde *ACS Omega* (C. 7, Sayı 42, ss. 36988-37007). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04969>
- Mavani, A., Ray, D., Aswal, V. K. & Bhattacharyya, J. (2023). Understanding the molecular interaction of BSA protein with antibiotic sulfa molecule(s) for novel drug development. *Journal of Molecular Structure*, 1287. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135697>
- Mazzetti, A. P., Fiorile, M. C., Primavera, A. & Lo Bello, M. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. İçinde *Neurochemistry International* (C. 82, ss. 10-18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.01.008>
- McCarty, M. F. & DiNicolantonio, J. J. (2015). An increased need for dietary cysteine in support of glutathione synthesis may underlie the increased risk for mortality associated with low protein intake in the elderly. *Age*, 37(5). <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9823-8>
- Mousavi, Z., Ghasemi, J. B., Mohammadi Ziarani, G., Rahimi, S. & Badiei, A. (2024). Coumarin derivative-functionalized nanoporous silica as an on-off fluorescent sensor for detecting Fe<sup>3+</sup> and Hg<sup>2+</sup> ions: a circuit logic gate. *Discover Nano*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-024-04013-9>
- Nezamzadeh-Ejhi, A. & Hashemi, H. S. (2012). Voltammetric determination of cysteine using carbon paste electrode modified with Co(II)-Y zeolite. *Talanta*, 88, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.032>
- Ozkan, S. A., Zuman, P. & Kauffmann, J.-M. (2015). S.A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, P. Zuman, Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences, Springer (2015), <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8>. İçinde *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences* (ss. 11-26).
- Paul, B. D., Sbodio, J. I. & Snyder, S. H. (2018). Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. İçinde *Trends in Pharmacological Sciences* (C. 39, Sayı 5, ss. 513-524). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.007>
- Paulsen, C. E. & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. İçinde *Chemical Reviews* (C. 113, Sayı 7, ss. 4633-4679). <https://doi.org/10.1021/cr300163e>
- Putzu, M., Gräter, F., Elstner, M. & Kubař, T. (2018). On the mechanism of spontaneous thiol-disulfide exchange in proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(23), 16222-16230. <https://doi.org/10.1039/c8cp01325j>

- Radzinski, M., Oppenheim, T., Metanis, N. & Reichmann, D. (2021). The cys sense: Thiol redox switches mediate life cycles of cellular proteins. İçinde *Biomolecules* (C. 11, Sayı 3, ss. 1-28). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom11030469>
- Rasheed, P. A., Pandey, R. P., Jabbar, K. A., Ponraj, J. & Mahmoud, K. A. (2019). Sensitive electrochemical detection of l-cysteine based on a highly stable Pd@Ti3C2T:X(MXene) nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Analytical Methods*, 11(30), 3851-3856. <https://doi.org/10.1039/c9ay00912d>
- Riemer, J., Schwarzländer, M., Conrad, M. & Herrmann, J. M. (2015). Thiol switches in mitochondria: Operation and physiological relevance. İçinde *Biological Chemistry* (C. 396, Sayı 5, ss. 465-482). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0293>
- Riener, C. K., Kada, G. & Gruber, H. J. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(4-5), 266-276. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
- Safavi, A., Ahmadi, R. & Mahyari, F. A. (2014). Simultaneous electrochemical determination of l-cysteine and l-cysteine disulfide at carbon ionic liquid electrode. *Amino Acids*, 46(4), 1079-1085. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1668-4>
- Schoonheydt, R. A. (2010). UV-VIS-NIR spectroscopy and microscopy of heterogeneous catalysts. *Chemical Society Reviews*, 39(12), 5051-5066. <https://doi.org/10.1039/c0cs00080a>
- Seiler, V. K., Callebaut, K., Robeyns, K., Tumanov, N., Wouters, J., Champagne, B. & Leyssens, T. (2018). Acidochromic spiropyran-merocyanine stabilisation in the solid state. *CrystEngComm*, 20(24), 3318-3327. <https://doi.org/10.1039/c8ce00291f>
- Semenovich, D. S., Plotnikov, E. Y., Titko, O. V., Lukiyyenko, E. P. & Kanunnikova, N. P. (2021). Effects of panthenol and n-acetylcysteine on changes in the redox state of brain mitochondria under oxidative stress in vitro. *Antioxidants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/antiox10111699>
- Shcherbatykh, A. A., Chernov'yants, M. S. & Popov, L. D. (2022). Determination of low molecular thiols and protein sulfhydryl groups using heterocyclic disulfides. *Amino Acids*, 54(3), 469-479. <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03132-w>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th bs). Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Solak, I., Guney, I., Mercan, S., Erel, O., Neselioglu, S., Cetinkaya, C. & Eryilmaz, M. (2020). Changes in thiol/disulfide homeostasis in patients with chronic kidney disease. *Medicine Science | International Medical Journal*, 9(1), 201. <https://doi.org/10.5455/medscience.2019.08.9168>
- Sun, X. Y., Liu, T., Sun, J. & Wang, X. J. (2020). Synthesis and application of coumarin fluorescence probes. İçinde *Royal Society of Chemistry Advances* (C. 10, Sayı 18, ss. 10826-10847). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9ra10290f>
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A. & Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: Implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>

- Tan, L., Lin, W., Zhu, S., Yuan, L. & Zheng, K. (2014). A coumarin-quinolinium-based fluorescent probe for ratiometric sensing of sulfite in living cells. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12(26), 4637-4643. <https://doi.org/10.1039/c4ob00132j>
- Tian, Y., Li, P., Wang, L., Ye, X., Qu, Z., Mou, J., Yang, S. & Wu, H. (2024). Glutathione-triggered release of SO<sub>2</sub> gas to augment oxidative stress for enhanced chemodynamic and sonodynamic therapy. *Biomaterials Science*, 12(9), 2341-2355. <https://doi.org/10.1039/d3bm02027d>
- Valenti, G. E., Tasso, B., Traverso, N., Domenicotti, C. & Marengo, B. (2023). Glutathione in cancer progression and chemoresistance: an update. İçinde *Redox Experimental Medicine* (C. 2023, Sayı 1). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/REM-22-0023>
- Wang, Hong, Zhang, P., Zhang, C., Chen, S., Zeng, R., Cui, J. & Chen, J. (2020). A rational design of a cancer-specific and lysosome-targeted fluorescence nanoprobe for glutathione imaging in living cells. *Materials Advances*, 1(6), 1739-1744. <https://doi.org/10.1039/d0ma00124d>
- Wang, Huilin, Zhou, G., Gai, H. & Zhou, X. (2012). A fluorescein-based probe with high selectivity to cysteine over homocysteine and glutathione. *Chemical Communications*, 48(67), 8341-8343. <https://doi.org/10.1039/c2cc33932c>
- Wang, J., Yin, C. & Huo, F. (2024). Recent advances in glutathione fluorescent probes based on small organic molecules and their bioimaging. İçinde *Analyst* (C. 150, Sayı 2, ss. 220-239). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d4an01373e>
- Wang, P., Wang, Q., Huang, J., Li, N. & Gu, Y. (2017). A dual-site fluorescent probe for direct and highly selective detection of cysteine and its application in living cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 583-588. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.056>
- Wang, Y., Li, J., Li, X., Gao, B., Chen, J. & Song, Y. (2025). Spectroscopic and molecular docking studies on binding interactions of camptothecin drugs with bovine serum albumin. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92607-3>
- Waseem, A., Yaqoob, M. & Nabi, A. (2008). Flow-injection determination of cysteine in pharmaceuticals based on luminol-persulphate chemiluminescence detection. *Luminescence*, 23(3), 144-149. <https://doi.org/10.1002/bio.1024>
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. (2004). *Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1*.
- Xiong, Y., Xiao, C., Li, Z. & Yang, X. (2021). Engineering nanomedicine for glutathione depletion-augmented cancer therapy. İçinde *Chemical Society Reviews* (C. 50, Sayı 10, ss. 6013-6041). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00718h>
- Xu, K., Zhang, Y., Tang, B., Laskin, J., Roach, P. J. & Chen, H. (2010). Study of highly selective and efficient thiol derivatization using selenium reagents by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(16), 6926-6932. <https://doi.org/10.1021/ac1011602>
- Yıldır, N. & Meriç Koç, M. (2018). *Kronik Hepatit B Hastalarında Tiyo-Disülfid Homeostazı ve İskemi Modifiye Albümin Düzeylerinin Değerlendirilmesi*. (Uzmanlık Tezi) Bezmialem Vakıf Üniversitesi.

- Zhang, K., Shu, J., Chu, W., Liu, X., Xu, B. & Jiang, W. (2021). Rational design of coumarin fluorophore with solvatochromism, AIE and mechanofluorochromic enhancement properties. *Dyes and Pigments*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108898>
- Zhang, L., Xu, C., Liu, C. & Li, B. (2014). Visual chiral recognition of tryptophan enantiomers using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probes. *Analytica Chimica Acta*, 809, 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.043>
- Zhang, X., Li, G., Pan, W., Li, N., Li, Y. & Tang, B. (2024). Fluorescent Probes for Cysteine and Cysteine Oxidation Imaging. İçinde *Chemical Research in Chinese Universities* (C. 40, Sayı 2, ss. 225-236). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40242-024-3290-7>
- Zhu, B., Guo, B., Zhao, Y., Zhang, B. & Du, B. (2014). A highly sensitive ratiometric fluorescent probe with a large emission shift for imaging endogenous cysteine in living cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 72-75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.068>

