

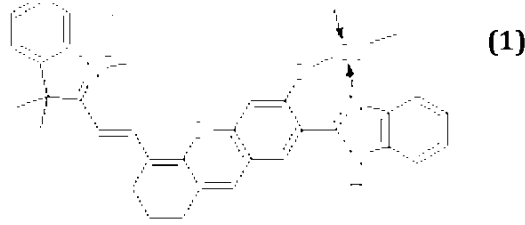
ÖZET**NİTRİK OKSİT TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YAKIN KIZILÖTESİ (NIR) FLORESAN PROB**

5 Mevcut buluş, yakın kızıl ötesi bölgede nitrik oksit tayini için kullanılabilen Formül (I)'e sahip bir floresan prob bileşiği ile ilgilidir. Mevcut buluşun konusu ayrıca bu floresan probun üretim metodu ve bu floresan probun kullanıldığı bir tayin yöntemine dayanmaktadır.

İSTEMLER

1. Formül (1) molekül yapısına sahip bir bileşik;

5



2. İstem 1'e göre sunulan bileşiğin üretimi için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir proses:

10

- a) 2,4-dihidroksibenzaldehitin (2) sentezlenmesi,
 b) a) adımından elde edilen ürünle 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazolün (4) sentezlenmesi,
 c) 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen siklohekzen (6) sentezlenmesi,
 d) 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodürün (10) sentezlenmesi,
 e) c) ve d) adımlarından elde edilen ürünlerle Cy7-Cl (11) sentezlenmesi,
 f) b) ve e) adımlarından elde edilen ürünlerle NIR-HBI'nın sentezlenmesi,
 g) f) adımında elde edilen molekül ile bir bakır bileşiğinin karıştırılması,
 h) Formül 1'e ait kompleksin elde edilmesi.

15

3. İstem 2'ye göre sunulan bir proses olup, özelliği f) adımın aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir.

20

- 1- istem 2'ye ait b) adımından elde edilen 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (4) ve potasyum karbonatın, asetonitril içerisinde karıştırılması,
 2- daha sonra, ayrı bir yerde asetonitril-diklormetan-metanol solvent karışımı içerisinde hazırlanmış e) adımında elde edilen Cy7-Cl (11) çözeltisinin adım 1'deki mevcut karışımın içerisine enjekte edilmesi,
 3- karışımın reflüks edilmesi,
 4- adım 3'teki ürünün süzülüp, solventin uzaklaştırılması,
 5- adım 4'te elde edilen maddenin saflaştırılması.

25

4. İstem 2'ye göre sunulan bir proses olup, özelliği g) adımın aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir.

1- belirli bir konsantrasyonda çözeltisi hazırlanan adım f)'den elde edilen formül (12)'nin, ekivalen miktarda konsantrasyon değerine sahip $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile PBS varlığında muamele edilmesi,

2- nihai kompleksin elde edilmesi.

5

5. Nitrik oksit tayini için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir yöntem:

- a) İstem 1'e ait Formül (1) bileşiğinin çözelti karışımına fosfat tampon (PBS) ilave edilmesi,
- b) üzerine inert ortamda muhafaza edilen bir nitrik oksit çözeltisinin ilave edilmesi,
- c) 15 dakika oda sıcaklığında ve azot gazı altında inkübasyonun sağlanması,
- d) floresans intensitesinde meydana gelen değişimin bir spektrofloreometrede ölçülmesi.

10

6. İstem 1'e göre sunulan Formül (1) bileşiğinin bir floresan prob olarak kullanımı.

7. İstem 6'ya göre sunulan kullanım olup, özelliği söz konusu kullanımın nitrik oksit tayini için olmasıdır.

15

8. İstem 7'ye göre sunulan kullanım olup, özelliği söz konusu nitrik oksit tayininin yakın kızılötesi bölgede ışımaya ihtiva etmesidir.

20

NİTRİK OKSİT TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YAKIN KIZILÖTESİ (NIR) FLORESAN PROB

Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

5 Mevcut buluş, yakın kızıl ötesi (near infrared, NIR) bölgede nitrik oksit tayini için kullanılan Formül (1)'e sahip bir floresan prob ile ilgilidir. Mevcut buluşun konusu ayrıca bu floresan probun üretim metodu ve bu floresan probun kullanıldığı nitrik oksit tayin yöntemine dayanmaktadır.

Tekniğin Bilinen Durumu

10 Nitrik Oksit ($\cdot\text{NO}$), yaygın olarak memeli, bitki, bakteri ve omurgasızların organizmalarında L-Arginin'in L-Sitrülin'e dönüşümü sırasında nitrik oksit sentazları tarafından endojen olarak sentezlenmektedir. Reaktif azot türlerinin (RNS) ilk örneğidir ve diğer azot merkezli serbest radikallerin başlangıç molekülüdür. Üç farklı izoformu mevcuttur. Molekül yapısını oluşturan azot atomu üzerinde ortaklanmamış elektron bulundurduğundan serbest radikal molekül sınıfı içerisinde yer almaktadır. Çeşitli metal içerikli protein ve serbest radikal türleri ile hızlı bir şekilde etkileşim 15 göstererek çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik etkiler meydana getirir.

Nitrik Oksit ($\cdot\text{NO}$), vücutta olağan miktarda sentezlendiğinde (nanomolar ve mikromolar mertebelerindeki oranlarda) antitümör ve antimikrobiyal etki gösterdiği, kalbi koruduğu, kan basıncını düzenlemeye ve çeşitli organlara yeterli düzeyde kan akışının sağlanmasına yardımcı 20 olduğu, düz kasların gevşemesini sağladığı, beyni uyardığı ve zararlı bakterilerin yok edilmesini sağladığı saptanmıştır. Ayrıca nörotransmitter madde merkezi sinir sisteminde düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Bağışıklık, kardiyovasküler ve sinir sistemi içerisinde sinyalizasyonu sağlayan ana kaynak olarak değerlendirilmektedir Organizmada yüksek veya biyolojik aktivite sağlayamayacak konsantrasyonlarda sentezlenmesi ve doğada uzun süre etkisine maruz kalınması 25 durumunda ise bir takım patofizyolojik etkilerin görülmesine sebep olmaktadır. Damar ve doku sertleşmesi, hipertansiyon, kanser, epilepsi, AIDS, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif rahatsızlıkların, ülser ve genç yaşta görülen diyabet gibi kronik hastalıkların meydana gelmesine, dolaylı olarak DNA parçalanmasına sebep olduğu, tekniğin bilinen durumunda yer alan çalışmalarda gösterilmiştir.

30

Dolayısıyla, biyolojik olarak birçok etkiye sahip olan bu molekülün düşük konsantrasyon değerlerinde bile doğrudan tespit edilebilmesi, fizyolojik sistemlerdeki rolünün daha detaylı olarak

incelenmesine ve sebep olduğu işlevsel bozuklukların ortaya çıkarılmasında büyük önem taşımaktadır.

Ancak, nitrik oksitin yarılanma ömrünün birkaç saniye (maksimum 10 saniye) ile sınırlı olması, gaz formunda sentezlenmesi ve çok reaktif bir serbest radikal molekül olması nedeniyle organizmada diğer radikallerle çok çabuk etkileşim göstermesi ve çeşitli yeni reaktif moleküllere dönüşmesinden dolayı doğrudan tespiti oldukça güçtür. Bu gibi zorlukların neticesinde, nitrik oksit tayini için uygulanacak olan metotlarda yüksek duyarlılık ve hassasiyet ön plana çıkmaktadır. Daha da önemlisi metodun, nitrik oksitin oksidasyon ürünlerine veya diğer reaktif oksijen/azot türlerine oranla nitrik oksit için daha seçici olması istenmektedir.

Bu nedenle tekniğin bilinen durumunda nitrik oksit tayini için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle de nitrik oksit sentezinin, etki mekanizmasının ve organizmadaki çok yönlü biyolojik etkilerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması için kemilüminesans, elektron spin rezonans (ESR), kolorimetri, elektrokimya ve florometri gibi çeşitli elektrokimyasal ve spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

Teknikte floresans esaslı problemlerin oldukça yoğun bir şekilde geliştirilmesi ve yapılan analizler sonucunda alınan verilerin değerlendirilmesiyle, nitrik oksitin tayini ve görüntülenmesinde bu metodun diğerlerine göre daha hassas bir test sistemi olduğu bilinmektedir. Hedef olarak tayin edilen biyoaktif bileşene özgü duyarlılık ve etkileşim gösteren ve etkileşim sonucu yapısında gözlenebilir derecede floresans değişimi meydana gelen floresans esaslı sentetik bileşikler "floresan prob" olarak tanımlanmaktadır. Floresan problemler ile gerçekleştirilen tayin ve görüntüleme teknikleri, modern biyolojide biyolojik olay ve bileşenleri görüntülemek için sıklıkla kullanılan bir araç haline gelmiştir.

Tekniğin bilinen durumunda, çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan çok sayıda floresan prob sentezlenmiştir. Fakat bu problemlerin çoğu elektromanyetik spektrumun UV-görünür bölge aralığında (400-650) eksitasyon (uyarılma) ve emisyon (absorpsiyon) değerlerine sahiptir. Organizmada bazı hormon ve proteinlerin sudaki dağılımı sırasında 200-650 nm dalga boyu değerlerinde birtakım ışık saçılmaları meydana gelmektedir. Ayrıca dokular, yapılarından kaynaklı olarak fotonlar saçarlar veya saçılan fotonları yansıtmaktadır. Yüksek doku hücrelerinin yapısından ve birtakım vücut içi emilimlerden kaynaklanan otofloresansın da aynı değerler arasında gerçekleşiyor olması nedeniyle bu problemlerin kullanımı zorlaşmakta veya kullanıldıklarında alınan ölçümlerin ve görüntüleme verilerinin doğruluğundan şüphe edilmektedir. Ayrıca bu dalga boylarındaki ışığa, özellikle su ve

hemoglobin gibi biyomoleküller tarafından çok iyi bir şekilde emilmektedir. Bu nedenle ışımının dokulara nüfuz etmesi tam anlamıyla gerçekleşmiş olmamaktadır.

5 Kullanılan ilk floresan prob 1,2-diaminonaftalen (DAN) bileşiğidir. ·NO'nun oksidasyon ürünü olan NO²⁻ iyonları ile etkileşim göstererek triazol sistemi oluşturur. Bu sayede floresans şiddetinde 100 kat kadar artış olduğu tespit edilmiştir. Minimum dedeksiyon limitinin (tayin edilebilirlik sınırı, LOD) 10 nM olduğu belirtilmiştir. Günümüzde hala ticari olarak satılmakta olup dolaylı yoldan ·NO ve NO²⁻ tayini için kullanılmaktadır. Ancak bu prob ile yapılan analizler asidik şartlar gerektirdiğinden ve ultraviyole (UV) bölgede olan λ_{em} : 375 nm'de gerçekleştirildiğinden hücrede hasara yol açtığı, 10 dolayısıyla probun sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir. ·NO tayini için kullanılan diğer bir floresan bileşik ise 2,7-diklorofloresein'dir. Başlangıçta herhangi bir floresans göstermeyen molekül, ·NO ile etkileşim gösterdiğinde okside olarak floresans göstermektedir. Ancak dedeksiyon limiti 10µM mertebesinde dir. Molekül üzerinde otoksidasyonun gerçekleştiği ve birçok reaktif oksijen/azot türü ile de etkileşim gösterdiği; dolayısıyla ·NO'ya spesifik olmadığı tespit edilmiştir.

15 Nitrik oksit tayin ve görüntülenmesi amacıyla geliştirilen çoğu floresan prob, molekül yapısı üzerinde o-diaminobenzen grubu bulundurmaktadır. Birbirine komşu olan ve elektronca zengin olan bu iki amin grubu, üzerinde bulunduğu benzen halkasından florofora aktarılan elektron miktarını artırarak PET mekanizması gereğince yapının floresansının sönmelenmesini sağlar. Ortama ·NO'nun 20 girmesiyle birlikte, elektronca zayıf olan triazol yapısı meydana gelir. Böylece PET mekanizması devre dışı kalır ve floresans ışımaya gerçekleşir. Bu mekanizmaya dayalı problemlerin en büyük dezavantajı olarak doğrudan ·NO üzerinden değil, ·NO'nun oksidasyon ürünlerine (NO²⁻, N₂O₃) bağlı veri alınmasıdır.

25 Teknikte, bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için bakır (Cu) metali kullanılmıştır. Florofor (ligand, L) – Metal(M) kompleksi şeklinde oluşturulan ·NO problemlerinde kullanılan geçiş metalleri arasında bakır (Cu), bu sistemin başarıya ulaştığı en iyi metal olarak belirlenmiştir. Genellikle florofor üzerindeki sekonder amin grubunun nitrozolanması ve iki değerlikteki bakır katyonunun, bir 30 değerlikli bakır katyonuna (Cu²⁺ → Cu¹⁺) indirgenmesine dayalı olan mekanizma etkin olmaktadır.

Literatürde, bu mekanizmanın etkin olduğu problemler ile yapılan çalışmalarda, diğer reaktif oksijen ve azot türlerinin yanı sıra, askorbik asit ve dehidroaskorbik asit ile de ciddi ölçüde herhangi bir girişim tespit edilmemiş; yöntemin sadece ·NO'ya seçici olduğu veriler doğrultusunda kanıtlanmıştır.

Buna yönelik tekniğin bilinen durumunda birçok çalışma yapılmıştır. CN101302425 numaralı patent başvurusunda nitrik oksit tayini için bakır kompleksi ve organik ligant olarak 2-(2-hidroksi fenil) benzimidazol türevi kullanılarak elde edilen floresan prob lar açıklanmıştır.

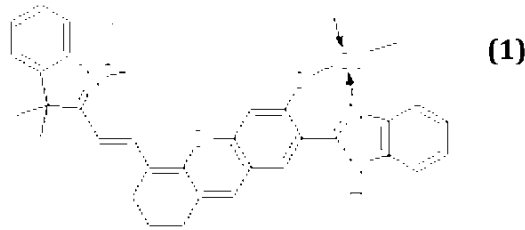
- 5 CN101270342 numaralı başvuruda ise tümör hedefli floresan prob olarak bakır kompleksi ve tiyol grubu ihtiva eden bir molekül açıklanmıştır.

10 Tekniğin bilinen durumunda yukarıda da görüleceği gibi nitrik oksit tayininde kullanılmak üzere geçiş metallerinin kullanıldığı veya herhangi bir metal kompleksi ihtiva etmeyen birçok floresan prob açıklanmıştır. Ancak iki değerlikli bakır (Cu^{2+}) kasyonu ile kompleks ihtiva eden ve yakın kızılötesi bölgede güvenilir nitrik oksit tayini gerçekleştiren bir floresan prob açıklanmamıştır.

15 Mevcut buluşta yukarıda yer alan tüm problemlerin çözümüne yönelik verilerin elde edildiği, yakın kızıl ötesi bölgede emisyonla sahip, güvenilir olarak nitrik oksit tayini sağlayan bir floresan prob ve bunun için bir üretim yöntemi açıklanmaktadır. Mevcut buluş ayrıca yakın kızıl ötesi bölgede güvenilir bir şekilde nitrik oksit tayini için bir yöntem de sunmaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması

- 20 Mevcut buluşun amaçlarını gerçekleştirmek üzere bir floresan prob olarak kullanılabilir Formül (1) molekül yapısına sahip bir bileşik sunulmaktadır;



25

Buluş, bir başka yönü ile yukarıdaki bileşiğin üretimi için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir proses ile ilgilidir:

- a) 2,4-dihidroksibenzaldehitin (2) sentezlenmesi,
 b) a) adımından elde edilen ürünle 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazolün (4) sentezlenmesi,
 30 c) 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen siklohekzen (6) sentezlenmesi,

- 5
- d) 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodürün (10) sentezlenmesi,
 - e) c) ve d) adımlarından elde edilen ürünlerle Cy7-Cl (11) sentezlenmesi,
 - f) b) ve e) adımlarından elde edilen ürünlerle NIR-HBI'nın sentezlenmesi,
 - g) f) adımında elde edilen molekül ile bir bakır bileşiğinin karıştırılması,
 - h) Formül 1'e ait kompleksin elde edilmesi.

Yukarıdaki proste yer alan f) adımı tercihen aşağıdaki adımları ihtiva etmektedir;

- 10
- 1- yukarıdaki b) adımından elde edilen 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (4) ve potasyum karbonatın, asetonitril içerisinde karıştırılması,
 - 2- daha sonra, ayrı bir yerde asetonitril-diklormetan-metanol solvent karışımı içerisinde hazırlanmış e) adımında elde edilen Cy7-Cl (11) çözeltisinin adım 1'deki mevcut karışımın içerisine enjekte edilmesi,
 - 3- karışımın reflüks edilmesi,
 - 4- ürünün süzülüp, solventin uzaklaştırılması,
 - 15 5- adım 4'teki maddenin saflaştırılması.

Buluşa ait prosesin g) adımı tercihen aşağıdaki adımları ihtiva etmektedir;

- 20
- 1- belirli bir konsantrasyonda çözeltisi hazırlanan adım f)'den elde edilen formül (12)'nin, ekivalen miktarda konsantrasyon değerine sahip $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile PBS varlığında muamele edilmesi,
 - 2- nihai kompleksin elde edilmesi.

Buluş bir başka yönü ile de nitrik oksit tayini için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir yöntem ile ilgilidir;

- 25
- a) Formül (1) bileşiğinin çözelti karışımına fosfat tampon (PBS) ilave edilmesi,
 - b) Üzerine inert ortamda muhafaza edilen bir nitrik oksit çözeltisinin ilave edilmesi,
 - c) 15 dakika oda sıcaklığında ve azot gazı altında inkübasyonun sağlanması,
 - d) Floresans intensitesinde meydana gelen değişimin bir spektrofloreometrede ölçülmesi.

30 Buluş, bir başka yönü ile yukarıda sunulan Formül (1) bileşiğinin bir floresan prob olarak kullanımı ile ilgilidir. Söz konusu kullanım nitrik oksit tayini için olabilmektedir ve ayrıca yakın kızılötesi bölgede ışımaya ile gerçekleştirilebilmektedir.

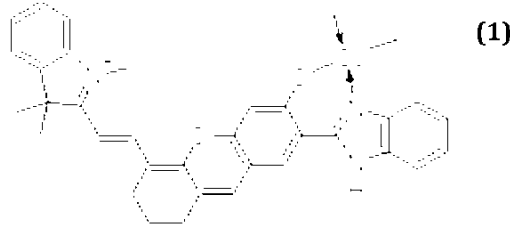
Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1, ·NO İlavesi (40 µM) sonucunda buluşa ait formül (1)'in floresans intensitesinde meydana gelen zamana bağlı (0-60 dk) değişimi göstermektedir.

- 5 Şekil 2, buluşa ait formül (1) bileşiğinin nitrik oksit konsantrasyonuna bağlı intensite değişim grafiklerini göstermektedir.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

- 10 Mevcut buluşun ana yapılanması yakın kızılötesi bölgede nitrik oksit tayini için Formül (1) molekül yapısına sahip bir floresan prob sunmaktadır. Buluşa ait molekülün kapalı molekül formülü $C_{33}H_{30}N_3O_2I$ şeklindedir. Teorik olarak hesaplanan molekül kütlesi $627.51 \text{ g.mol}^{-1}$ dır.

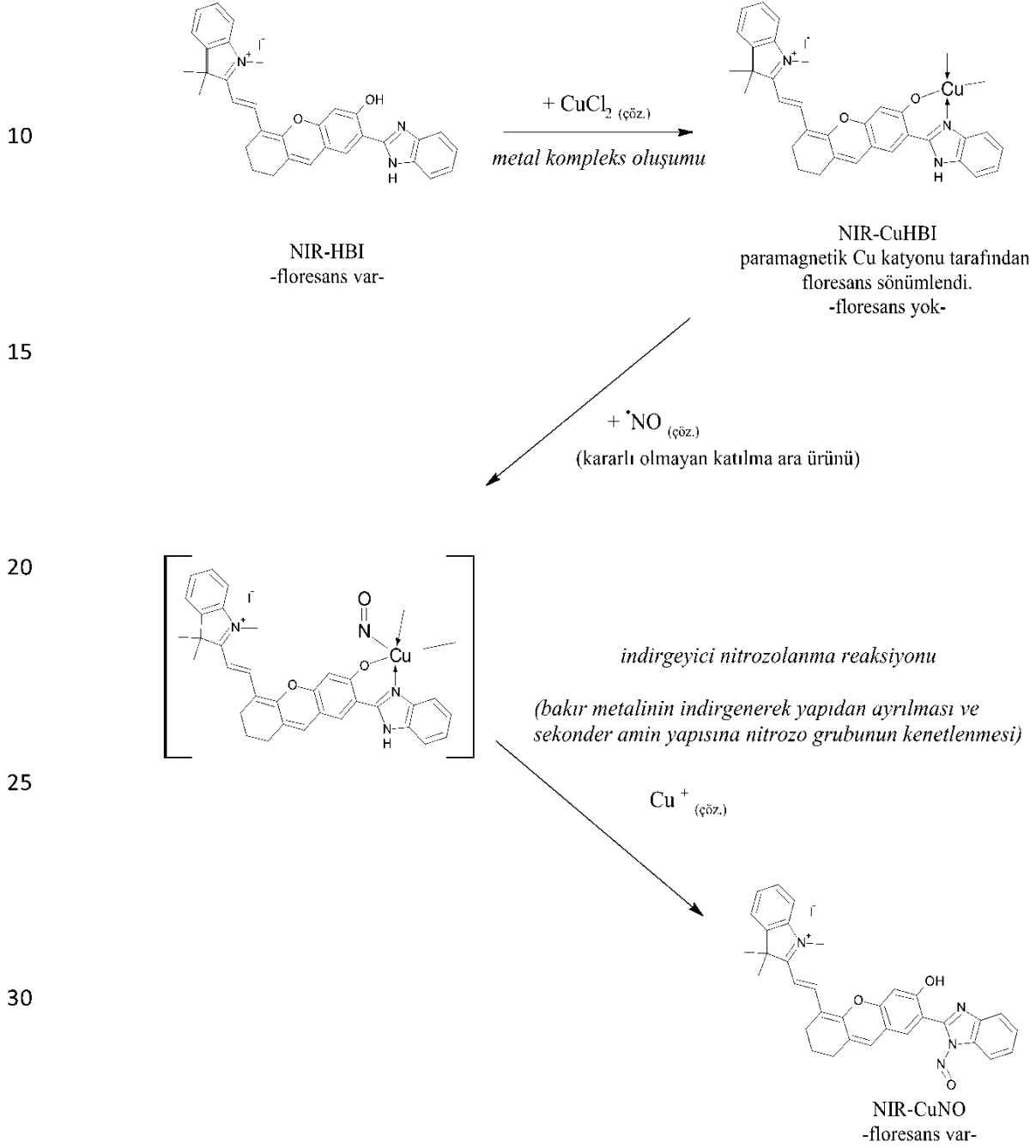


15

Mevcut buluşun bu yapılanmasında söz konusu yakın kızıl ötesi bölge 650-900 nm dalga boyları arasındadır.

- 20 Buluşa ait floresan prob hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmekte, düşük dedeksiyon limitlerinde seçici olmakta ve hiçbir yükseltgenme ürününe gereksinim duymaksızın doğrudan nitrik oksit tayini ve görüntülenmesini sağlamaktadır. Ayrıca gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda yüksek kararlılık göstermesi sebebiyle yakın kızılötesi bölgede nitrik oksit tayininde güvenilir ve hassas verilerin alınmasını sağlamaktadır. Buluşa ait floresan probun yakın kızılötesi emisyon dalgaboyuna
- 25 sahip siyanin boyasının yeni nesil türevi olmasının bir sonucu olarak yapısal kararlılık göstermesi çalışma ortam pH'sının geniş bir aralıkta bulunmasına, çeşitli matrislerde (örneğin kanser hücrelerinde) analizlerin gerçekleştirilmesine ve özellikle fizyolojik pH değeri olan 7.4'te güvenilir sonuçların alınmasına olanak sağlayacaktır.
- 30 Buluşa ait floresan probda yer alan bakır(II) kompleksi sayesinde nitrik oksit ile gerçekleştiği öngörülen reaksiyon mekanizması aşağıda (Şema 1) sunulmaktadır. Etki mekanizması, benzimidazol

molekülü üzerindeki tersiyer azot atomu ve hidroksil grubu arasında bakır kompleksinin gerçekleşmesine; nitrik oksitin ortama dâhil olmasıyla birlikte kompleksin bozulması sonucu iki değerlikli bakırın (Cu^{2+}) bir değerlikli bakır katyonuna (Cu^{1+}) indirgenip yapıdan ayrılarak çözelti ortamına geçmesine ve benzimidazol üzerinde bulunan sekonder amin yapısının nitrozolanmasına dayanmaktadır.



Şema 1 - NIR-CuHBI ve NO Arasında Gerçekleştiği Öngörülen Reaksiyon Mekanizması

Buluşun başka bir yönü itibarı ile yakın kızılötesi bölgede nitrik oksit tayini için kullanılan, formül (I) molekül yapısına sahip floresan probun üretimi için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir proses sunulmaktadır. Proses adımları ayrıca Şema 2'de de gösterilmiştir.

- a) 2,4-dihidroksibenzaldehitin (2) sentezlenmesi,
- 5 b) a) adımından elde edilen ürünle 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazolün (4) sentezlenmesi,
- c) 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen (6) sentezlenmesi,
- d) 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodürün (10) sentezlenmesi,
- e) c) ve d) adımlarından elde edilen ürünlerle Cy7-Cl (11) sentezlenmesi,
- f) b) ve e) adımlarından elde edilen ürünlerle NIR-HBI'nın sentezlenmesi,
- 10 g) f) adımında elde edilen molekül ile $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, PBS varlığında (fosfat tamponu, 20 mM, pH: 7.4) karıştırılması
- h) Kompleks oluşumunun spektrofloreometre ile gözlemlenmesi.



Şema 2 - Buluşa ait floresan probun üretim metodu adımları

Mevcut buluşa ait floresan probun üretim yöntemi kolay ve maliyeti düşüktür.

Mevcut buluşa ait proseste yer alan a) adımı örnek olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilebilir;

- 5 1- 250 mL'lik balon içerisinde soğutulan 60 mL asetonytril (ACN) ve 10 mL dimetilformamid (DMF) solvent karışımına, damlatma hunisi yardımıyla POCl_3 (110 mmol, 11 mL) ilave edilmesi,
- 2- adım 1'deki karışımın oda sıcaklığında ve azot atmosferinde yaklaşık olarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılması,
- 10 3- sarımsı renkli Haack Reaktifinin oluştuğu gözlemlenip, tekrar 0 °C'ye soğutulması,
- 4- adım 3'teki soğuk karışım üzerine 50 mL asetonytril içerisinde çözülen 1,3-dihidroksibenzen (rezorsin, 100 mmol, 11 g.) ilave edilmesi ve 5 °C'de 3 saat karıştırılması,
- 5- adım 4'teki beyaz renkli katının süzülüp, soğuk asetonytril ile yıkanması,
- 6- adım 5'teki karışımın 250 mL'lik beherde 60 °C'de 2 saat hidroliz edilip, soğumaya bırakıldıktan sonra beyaz renkli kristallerin gözlemlenmesi,
- 15 7- adım 6'daki kristallerin süzülerek alınması ve soğuk su ile yıkanması,
- 8- adım 7'de elde edilen kristallerin 50 °C'de kurutulması.

Mevcut buluşa ait proseste yer alan b) adımı örnek olarak aşağıda verilen şekilde gerçekleştirilebilir;

- 20 1- 2,4-dihidroksibenzaldehit (**2**; 50 mmol, 7 g) ve sodyum metabisülfid (NaHSO_3 , 50.5 mmol, 5.25 g) 100 mL içerisinde çözülen 1,2-diaminobenzen (**3**; 50 mmol, 5.4 g) yavaşça ilave edilmesi,
- 2- karışımın 2 saat reflüks edilmesi,
- 3- karışımın 500 mL buz-su karışımına dökülmesi ve yaklaşık olarak 12 saat boyunca soğukta bekletilmesi,
- 25 4- oluşan sarı renkli çökeltinin süzülmesi, su ile yıkanıp, kurutulması,
- 5- etanolde yeniden kristallendirilmesi.

Mevcut buluşa ait proseste yer alan c) adımı örnek olarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilebilir;

- 1- 250 mL'lik balon içerisinde soğutulan 20 mL diklorometan ve 15 mL dimetilformamid (DMF) solvent karışımına, damlatma hunisi yardımıyla POCl_3 (130 mmol, 12 mL) ilave edilmesi,
- 30 2- bu karışımın oda sıcaklığında ve azot atmosferinde yaklaşık olarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılması,
- 3- sarımsı renkli Haack Reaktifinin oluştuğu gözlemlendikten sonra tekrar 0 °C'ye soğutulması,

- 4- soğuk karışım üzerine sikloheksanon (**5**; 50 mmol, 5.2 mL) ilave edilmesi ve 4 saat boyunca reflüks edilmesi,
- 5- ardından sonunda, karışımın 500 mL buz-su karışımına dökülmesi, yaklaşık olarak 12 saat boyunca soğukta bekletilmesi, oluşan sarı renkli çökeltinin süzülmesi ve soğuk su ile yıkanıp kurutulması.

5

Mevcut buluşa ait proseste yer alan d) adımı örnek olarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilebilir;

- 1- 40 mL asetik asit içerisine fenil hidrazin (**7**, 74 mmol, 7.3 mL) ve 3-metil-2-bütanon (**8**; 74 mmol, 8 mL) ilave edilmesi ve 3 saat boyunca 100 °C'de reflüks edilmesi,
- 2- ardından su ve diklorometan ilave edilerek istenilen ürünün organik faza geçmesinin sağlanması,
- 3- ayırma hunisinden solvent fazının alınıp, solventin vakumda uzaklaştırılması,
- 4- 2,3,3-trimetil-3H-indol (**9**) bileşiğinin siyah renkli sıvı olarak elde edilmesi,
- 5- adım 4'teki maddenin üzerine 100 mL asetonitril ve yaklaşık 15 mL metil iyodür ilave edilmesi,
- 6- 55 °C'de 6 saat boyunca reflüks edilmesi, çökelti miktarının artması için soğutulması,
- 7- süzülerek ürünün alınıp, kurutulması.

15

Mevcut buluşa ait proseste yer alan e) adımı örnek olarak aşağıda gösterilen şekilde gerçekleştirilebilir;

20

- 1- 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen (**6**; 55 mmol, 9.75 g), 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür (**10**; 110 mmol, 33 g) ve sodyum asetatın (110 mmol, 10 g) tartılarak balon içerisindeki 150 mL asetik anhidrit üzerine ilave edilmesi,
- 2- azot gazı varlığında, 80 °C'de 1 saat reflüks edilmesi,
- 3- adım 2'de yer alan karışımın soğutulması ve çöktüğünün gözlenmesi,
- 4- çökeltinin süzülerek alınması, sırasıyla distile su, bikarbonatlı su ve eter ile yıkanması,
- 5- etüvde 50 °C'de bir gece boyunca kurutulması.

25

Mevcut buluşa ait proseste yer alan f) adımı örnek olarak aşağıda gösterilen şekilde gerçekleştirilebilir;

30

- 1- b) adımından elde edilen 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (**4**; 6 mmol, 1.35 g) ve potasyum karbonat (K_2CO_3 , 6 mmol, 850 mg) 25 mL asetonitril içerisinde, azot atmosferinde ve oda sıcaklığında 30 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırılması,
- 2- daha sonra, ayrı bir yerde asetonitril-diklormetan-metanol (3:1:1) solvent karışımı içerisinde hazırlanmış e) adımında elde edilen Cy7-Cl (**11**; 3 mmol, 1.85 g)'nın çözeltisinin adım 1'deki mevcut karışımın içerisine enjekte edilmesi,
- 3- 6 saat süreyle 50 °C'de manyetik karıştırıcıda ve azot atmosferinde reflüks edilmesi,
- 4- adım 3'teki ürünün süzülüp, solventin vakumdan uzaklaştırılması,
- 5- adım 4'te elde edilen maddenin kolon kromatografisi uygulanarak saflaştırılması.

10

Mevcut buluşa ait proseste yer alan g) adımı örnek olarak aşağıda gösterilen şekilde gerçekleştirilebilir;

- 1- belirli bir konsantrasyonda çözeltisi hazırlanan adım f)'den elde edilen formül (12)'nin, ekivalen miktarda konsantrasyon değerine sahip $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi ile PBS varlığında (fosfat tamponu, 20 mM, pH: 7.4) muamele edilmesi,
- 2- kompleks oluşumunun spektrofloreometre ile gözlemlenmesi.

15

Mevcut buluşun bir başka yönü itibarı ile nitrik oksit tayini için aşağıdaki adımları ihtiva eden bir yöntem sunulmaktadır;

- a) buluşa ait floresan probun (1) çözelti karışımına fosfat tampon (PBS) ilave edilmesi,
- b) üzerine inert ortamda muhafaza edilen nitrik oksit çözeltisinin ilave edilmesi,
- c) 15 dakika oda sıcaklığında ve azot gazı altında inkübasyonun sağlanması,
- d) floresans intensitesinde meydana gelen değişimin spektrofloreometrede ölçülmesi.

20

25 1 mL nitrit oksit tayinin sonucunda elde edilen intensite/ dalgaboyu grafiği Şekil 1'de sunulmaktadır. Böylece pH 7.4'te nitrit oksit ile buluşa ait floresans probun etkileşimi 745 nm'de florometrik olarak gözlemlenmektedir.

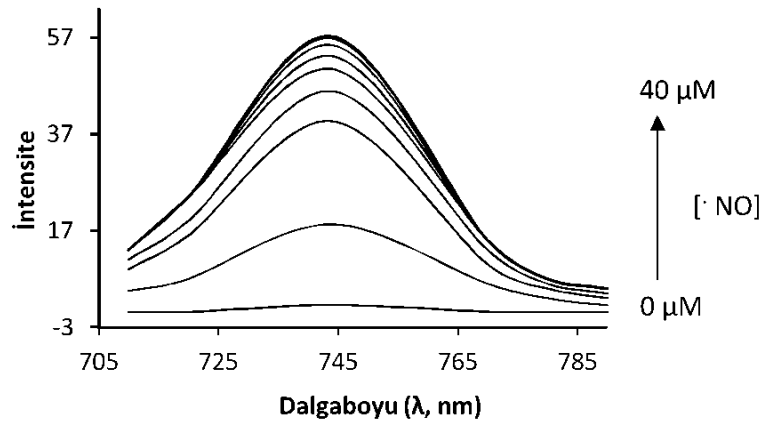
25

Buluşa ait yöntem ile uygulanan 0-40 μM aralığında değişen konsantrasyonlarda nitrit oksit çözeltilerinin analizi sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı intensite değişimi Şekil 2'de sunulmaktadır.

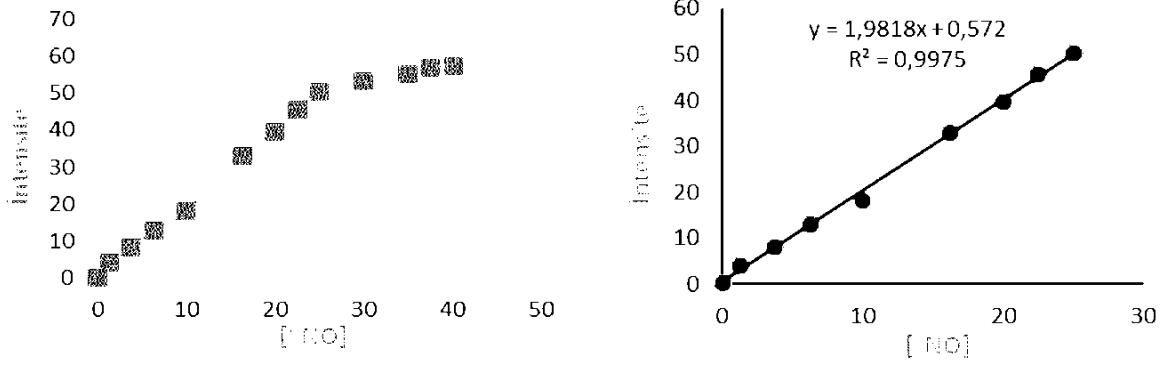
30

Mevcut buluş bu yönü itibarı ile güvenilir ve kolay uygulanabilen bir nitrik oksit tayin yöntemi sunmaktadır. Söz konusu buluşa ait tayin yöntemi sırasında oksijene gerek duyulmadığından dolayı organizmada oksijence fakir tümörleşmiş ve kanserleşmiş bölgelerde de tayinlerin güvenle yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca geliştirilen bu yöntemle çalışma ortam pH'sının geniş bir aralıkta bulunmasına, çeşitli matrislerde (örneğin kanser hücrelerinde) analizlerin gerçekleştirilmesine ve özellikle fizyolojik pH değeri olan 7.4'te güvenilir sonuçların alınmasına olanak sağlanmaktadır.

Buluşun diğer avantajlı yapıları ve varyasyonları ekte bulunan istemlerin kapsamından sapılmaksızın oluşturulabilecektir.



Şekil 1



Şekil 2