

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**İLAÇ OLMA POTANSİYELİ TAŞIYAN 2,3-DİARİL-BENZOTİYOFEN  
TÜREVLERİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE  
GST- $\alpha$  İZOZİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Doğan ÇETİN  
DANIŞMAN: Doç. Dr. Metin KONUŞ

VAN-2018



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**İLAÇ OLMA POTANSİYELİ TAŞIYAN 2,3-DİARİL-BENZOTİYOFEN  
TÜREVLERİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE  
GST- $\alpha$  İZOZİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Doğan ÇETİN

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2018-6798  
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2018



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Metin KONUŞ danışmanlığında, Doğan ÇETİN tarafından sunulan "İlaç Olma Potansiyeli Taşıyan 2,3-Diaril-Benzotiyofen Türevlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve GST- $\alpha$  İzozimine Etkilerinin Araştırılması" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 27.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile başarılı bulunmuş ve ~~Yüksek Lisans~~ tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin ÖZDOĞAN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Metin KONUŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04.10.2019 tarih ve 2019/1-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza  
Enstitü Müdürü



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Doğan ÇETİN





## ÖZET

### İLAÇ OLMA POTANSİYELİ TAŞIYAN 2,3-DİARİL-BENZOTİYOFEN TÜREVLERİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE GST- $\alpha$ İZOZİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÇETİN, Doğan

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin KONUŞ

Aralık 2018, 71 sayfa

Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir. Bu moleküller elektron açıklarını kapatmak için elektron ararlar ve diğer moleküllerden elektron alarak kararlı hale geçmeye çalışırlar. Bunu yaparken DNA hasarı, protein modifikasyonları ve lipit peroksidasyonu gibi istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına neden olarak hücreye zarar verirler. Serbest radikallerin bu zararlı etkilerini ortadan kaldıran vücudun savunma sistemine antioksidanlar denmektedir. Antioksidan moleküller GST'ler gibi enzimatik ya da askorbik asit gibi enzimatik olmayan moleküller olabilirler.

Bu tez çalışmasında ilaç olma potansiyeli taşıyan yeni sentezlenmiş iki farklı 2,3-Diaril-Benzotiyofen türevinin (3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol ve 3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol) antioksidan kapasiteleri 5 farklı (DPPH, ABTS, Galvinoxil, Fosfomolibden ve FRAP metodu) antioksidan kapasite metoduyla belirlendi ve ayrıca bu maddelerin GST A1-1 izozimi üzerinde inhibisyon ya da aktivasyon özellikleri araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda en yüksek antioksidan kapasite yüksekten düşüğe doğru fosfomolibden, FRAP ve ABTS metotlarında görüldü. DPPH ve galvinoxil metotlarında ise antioksidan aktivite belirlenemedi. GST A1-1 izozimiyle yapılan çalışmada ise her iki maddeninde hem aktivasyon (madde 1 (1, 10 ve 25  $\mu$ M) ve madde 2 (1, 5 ve 10  $\mu$ M)) hemde inhibisyon (madde 1 (25, 50 ve 100  $\mu$ M) ve madde 2 (25, 100 ve 250  $\mu$ M)) özellik gösterdiği görüldü.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, Antioksidan kapasite, Benzotiyofentürevleri, GST A1-1.



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITIES OF 2,3-DIARYL-BENZOTHIOPHENE DERIVATIVES THAT MIGHT HAVE DRUG POTENTIAL AND ANALYSE THEIR EFFECTS ON GST- $\alpha$ ISOZYME

ÇETİN, Doğan

M.Sc. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin KONUŞ

December 2018, 71 pages

Free radicals are molecules that contain one or more unconjugated electrons in their last orbitals. These molecules try to get the electron by taking electrons from other molecules to reach stable state. In doing so, the DNA damages the cell by causing unwanted oxidation reactions, such as protein modifications and lipid peroxidation. A defense system of the body that eliminates these harmful effects of free radicals is called antioxidant. Antioxidant molecules may be enzymatic, such as GSTs, or non-enzymatic such as ascorbic acid.

In this thesis, two new 2,3-Diaryl-Benzothiophene derivatives, (3- (5-Bromothiophen-2yl) -1-ethyl-2-phenyl-1H-indole and 3- [2,2 ' ] bithiophenyl-5-yl-1-ethyl-phenyl-1H-indole), antioxidant capacities were determined by 5 different (DPPH, ABTS, Galvinoxyl, Phosphomolybdenum and FRAP method) antioxidant capacities method. Furthermore, their effects on GST A1-1 isozyme were investigated, as well.

As a result of the study, antioxidant capacities of tested derivatives were seen from high to low in phosphomolybdenum, FRAP and ABTS methods, reciprocally. However, it was not determined any antioxidant activity by DPPH and galvinoxyl methods. In addition, both tested derivatives caused inhibition (compound 1 (25, 50 and 100  $\mu$ M) and compound 2 (25, 100 and 250  $\mu$ M)) and activation (compound 1 (1, 10 and 25  $\mu$ M) ve compound 2 (1, 5 and 10  $\mu$ M)) on GST A1-1 isozyme according to the applied concentrations.

**Keywords:** Antioxidant, Antioxidant capacity, Benzothiophene derivatives, GST A1-1.



## ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Metin KONUŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca, yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteğinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ'a, jüri üyesi olarak tezime bilimsel katkılarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin Özdoğan'a, bu tez çalışmasında test edilen benzotiyofen türevlerinin sentezini ve teminini sağlayan Prof. Dr. Arif KIVRAK'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyip her zaman yanımda olan değerli aileme ve manevi desteğiyle yanımda olan Ceylan FİDAN ve Şükrü GÜLER'e; bu çalışmayı FYL-2018-6798 No'lu proje ile destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına (BAPB) teşekkürlerimi sunarım.

2018

Doğan ÇETİN



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
EKLER DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Benzotiyofen Türevleri .....	1
1.2. Serbest Radikaller .....	3
1.2.1. Reaktif oksijen türleri.....	4
1.2.2. Serbest radikallerin makromoleküller üzerindeki etkileri.....	6
1.3. Antioksidanlar.....	7
1.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	9
1.3.1.1. Enzimatik antioksidanlar .....	9
1.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar .....	11
1.4. Antioksidan Kapasite Ölçüm Metotları ve Literatür Derlemesi.....	13
1.4.1. Antioksidan mekanizmaları.....	13
1.4.2. Antioksidan kapasite metotları.....	14
1.4.2.1. DPPH metodu .....	14
1.4.2.2. ABTS (TEAC) metodu.....	15
1.4.2.3. Galvinoxil metodu .....	16

	<b>Sayfa</b>
1.4.2.4. Fosfomolibden metodu .....	17
1.4.2.5. FRAP metodu .....	18
1.5. Glutasyon S-Transferazlar.....	19
1.5.1. Genel bilgi.....	19
1.5.1.1. Biyolojik detoksifikasyon.....	20
1.5.1.2. Glutasyon .....	21
1.5.2. Sitolik Glutasyon S-transferazlar .....	22
1.5.2.1. Sitolik Glutasyon S-transferazların sınıflandırılmaları .....	22
1.5.2.2. Yapıları .....	22
1.6. Enzim inhibisyonu .....	23
1.6.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon.....	24
1.6.2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon.....	25
1.6.3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon.....	25
1.7. Tezin Amacı.....	26
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal .....	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu.....	29
3.2.2. ABTS (2,2-azino bis (3-etil benzothiazolin-6-sülfonik asit)) metodu .....	30
3.2.3. Galvinoxil metodu .....	31
3.2.4. Fosfomolibden metodu.....	32
3.2.5. FRAP (Demir iyonu indirgenme antioksidan kapasite) metodu .....	32
3.2.6. GST A1-1 izozimi spesifik aktivite tayini.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35



	<b>Sayfa</b>
4.1. DPPH Metodu Sonuçları .....	35
4.2. ABTS Metodu Sonuçları .....	37
4.3. Galvinoxil Metodu Sonuçları .....	40
4.4. Fosfomolibden Metodu Sonuçları .....	42
4.5. FRAP Metodu Sonuçları.....	44
4.6. GST A1-1 İzozimi Spesifik Aktivite Tayini Sonuçları .....	47
4.6.1. GST A1-1 izoziminin aktivasyon sonuçları .....	47
4.6.2. GST A1-1 izoziminin inhibisyon sonuçları .....	50
4.7. Tartışma ve Deney Sonuçlarının Karşılaştırılması .....	54
KAYNAKLAR.....	59
EKLER .....	65
ÖZ GEÇMİŞ.....	71



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Tezde kullanılan benzotiyofen türevlerinin özellik tablosu .....	3
Çizelge 1.2. Oksijenin indirgenmesi.....	5
Çizelge 1.3. Bazı oksidanlar ve bu oksidanlara karşı etkili olan antioksidan savunma sistemleri.....	7
Çizelge 1.4. İnsan sitoplazmik glutatyon transferazların sınıflandırılması .....	20
Çizelge 4.1. ABTS metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin % RSA değerleri ve bu maddelerin troloks ile askorbik asit standartlarıyla karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.2. Fosfomolibden metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması.....	44
Çizelge 4.3. FRAP metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması .....	46
Çizelge 4.4. Madde 1'in 1, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim Aktivasyon Kinetiği Sonuçları .....	48
Çizelge 4.5. Madde 2'nin 1, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim Aktivasyon Kinetiği Sonuçları .....	50
Çizelge 4.6. Madde 1'in 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim İnhibisyon Kinetiği Sonuçları.....	52
Çizelge 4.7. Madde 2'in 25, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim İnhibisyon Kinetiği Sonuçları.....	53
Çizelge 4.8. Tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevlerinin enzim etki tipi ve kullanılan en yüksek konsantrasyona göre troloks ve askorbik asit eşdeğerleri.....	57



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Benzotiyofenin genel moleküler yapısı. ....	1
Şekil 1.2. Raloksifen (1), Zileton (2) ve Sertaconazol (3)'ün yapıları. ....	2
Şekil 1.3. Tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevleri. ....	2
Şekil 1.4. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre hasarı. ....	4
Şekil 1.5. Moleküler oksijenin bir elektron alması. ....	5
Şekil 1.6. SOD enzimi tarafından hidrojen peroksidin oluşumu. ....	5
Şekil 1.7. Suyun iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla hidroksil radikalinin oluşumu. ....	6
Şekil 1.8. Hidrojen peroksit radikalinin UV ışığına maruz kalmasıyla hidroksil radikalinin meydana gelmesi. ....	6
Şekil 1.9. Süperoksit radikalinden, hidroperoksit radikalinin oluşumu. ....	6
Şekil 1.10. Serbest radikal eşlenmemiş elektrona sahip reaktif bir maddedir. Bu reaktif madde bir antioksidan(A) tarafından daha kararlı bir moleküle (B) dönüştürülür. ....	8
Şekil 1.11. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon. ....	9
Şekil 1.12. Glutatyon Peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon. ....	10
Şekil 1.13. Glutatyon Redüktaz tarafından okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşüm reaksiyonu. ....	10
Şekil 1.14. Glutatyon S-Transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon. ....	10
Şekil 1.15. Vitamin E'nin moleküler yapısı. ....	11
Şekil 1.16. Askorbik asit'in dehidro askorbik asite dönüşüm mekanizması. ....	11
Şekil 1.17. $\beta$ -karoten'in yapısı. ....	12
Şekil 1.18. Melatonin hormonunun yapısı. ....	12

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.19. HAT temelli antioksidan kapasite yöntemlerinin serbest radikallerle tepkimesinin mekanizması. ....	13
Şekil 1.20. ET temelli antioksidan kapasite yöntemlerinin serbest radikallerle tepkimesinin mekanizması .....	14
Şekil 1.21. DPPH radikalın yapısı .....	15
Şekil 1.22. ABTS radikal katyonunun (ABTS <sup>•+</sup> ) absorpsiyon spektrumu .....	16
Şekil 1.23. Galvinoxil radikalının antioksidan molekül ile tepkimesi .....	16
Şekil 1.24. Galvinoxil radikalının kimyasal yapısı .....	17
Şekil 1.25. Yeşil renkli fosfomolibden kompleksinin UV spektrumu .....	18
Şekil 1.26. FRAP reaksiyonu. ....	18
Şekil 1.27. Karaciğer detoksifikasyon yolları ve destekleyici besinler .....	21
Şekil 1.28. Glutatyonun ( $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) yapısı .....	21
Şekil 1.29. GST alfa, mu, teta, pi ve sigma enzimlerinin üç boyutlu yapıları .....	23
Şekil 1.30. Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu. ....	24
Şekil 1.31. Yarışmalı enzim inhibisyonu .....	24
Şekil 1.32. Yarışmasız inhibisyon .....	25
Şekil 1.33. Yarı yarışmalı inhibisyon .....	25
Şekil 4.1. DPPH metodunda askorbik asit'in 517 nm'deki standart eğrisi. ....	35
Şekil 4.2. DPPH metodunda troloks'un 517 nm'deki standart eğrisi .....	35
Şekil 4.3. DPPH metodunda madde 1'in 517 nm'deki % RSA grafiği .....	36
Şekil 4.4. DPPH metodunda madde 2'nin 517 nm'deki % RSA grafiği .....	36
Şekil 4.5. ABTS metodunda troloks'un 734 nm'deki standart eğrisi .....	38
Şekil 4.6. ABTS metodunda madde 1'in 734 nm'deki % RSA grafiği .....	38
Şekil 4.7. ABTS metodunda madde 2'nin 734 nm'deki % RSA grafiği .....	39

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.8. ABTS metodunda kuersetin'in 734 nm'deki standart eğrisi. ....	40
Şekil 4.9. Galvinoxil metodunda troloks'un 428 nm'deki standart eğrisi. ....	41
Şekil 4.10. Galvinoxil metodunda madde 1'in 428 nm'deki % RSA grafiği. ....	41
Şekil 4.11. Galvinoxil metodunda madde 2'in 428 nm'deki % RSA grafiği. ....	41
Şekil 4.12. Fosfomolibden metodunda askorbik asit'in 695 nm'deki standart eğrisi. ...	42
Şekil 4.13. Fosfomolibden metodunda troloks'un 695 nm'deki standart eğrisi.....	42
Şekil 4.14. Fosfomolibden metodunda madde 1'in 695 nm'deki grafiği.....	43
Şekil 4.15. Fosfomolibden metodunda madde 2'nin 695 nm'deki grafiği.....	43
Şekil 4.16. FRAP metodunda askorbik asit'in 593 nm'deki standart eğrisi. ....	44
Şekil 4.17. FRAP metodunda troloks' un 593 nm'deki standart eğrisi. ....	45
Şekil 4.18. FRAP metodunda madde 1'in 593 nm'deki grafiği. ....	45
Şekil 4.19. FRAP metodunda madde 2'nin 593 nm'deki grafiği. ....	46
Şekil 4.20. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.....	47
Şekil 4.21. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 4.22. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği. ....	48
Şekil 4.23. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.....	49
Şekil 4.24. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.25. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği. ....	49
Şekil 4.26. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.....	50

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.27. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100 $\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği. ....	51
Şekil 4.28. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100 $\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği. ....	51
Şekil 4.29. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250 $\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği. ....	52
Şekil 4.30. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250 $\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği. ....	52
Şekil 4.31. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250 $\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği. ....	53



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Br</b>	Brom
<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>dH<sub>2</sub></b>	Distile Su
<b>Dk</b>	Dakika
<b>Fe<sup>+3</sup></b>	Demir İyonu
<b>H<sup>+</sup></b>	Hidrojen İyonu
<b>G</b>	Gram
<b>HO<sup>·</sup></b>	Hidroksil Radikali
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Su Molekülü
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>EC<sub>50</sub></b>	%50 inhibisyon Konsantrasyonu
<b>LOO<sup>·</sup></b>	Lipit Peroksit Radikali
<b>LOOH</b>	Lipit Peroksit Molekülü
<b>M</b>	Molarite
<b>Ma</b>	Moleküler Ağırlık
<b>Mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mo(VI)</b>	Molibden (VI)
<b>Mo (V)</b>	Molibden (V)

<b>Mol</b>	Mol
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodyum İyonu
<b>Nm</b>	Nanometre
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen Molekülü
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit Anyonu
<b>pH</b>	Hidrojen İyon Gücü (Asitlik-Bazlık Derecesi)
<b>A</b>	Alfa
<b>B</b>	Beta
<b>Γ</b>	Lamda
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>%</b>	Yüzde
<b>±</b>	ArtıEksi

### **Kısaltmalar**

### **Açıklama**

<b>Abs</b>	Absorbas
<b>ABTS</b>	2,2-azino bis-3-etil Benzotiazolin-6-sülfonik Asit
<b>AOC</b>	Antioksidan Kapasitesi
<b>Ark</b>	Arkadaşları
<b>CAT</b>	Katalaz Enzimi
<b>CDNB</b>	1-klor-2,4-dinitrobenzen
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

<b>EC</b>	Enzim Numarası
<b>ET</b>	Elektron Transferi
<b>FRAP</b>	Demir İyonu İndirgenmesine Bağlı Antioksidan Kapasitesi Metodu
<b>GR</b>	Glutasyon Redüktaz
<b>GSH</b>	İndirgenmiş Glutasyon
<b>GSH-PX</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>GSSG</b>	Oksitlenmiş Glutasyon
<b>GST</b>	Glutasyon S transferaz
<b>HAT</b>	Hidrojen atom transferi
<b>PUFAH</b>	Poliansature yağ asitleri
<b>Ss</b>	Standart Sapma
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismütaz
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RSA</b>	Radikal Yakalama Aktivitesi
<b>TEAC</b>	Troloks'a Denk Antioksidan Kapasitesi
<b>UV</b>	Ultraviöle (morötesi)
<b>YYÜ</b>	Yüzüncü Yıl Üniversitesi



## EKLER DİZİNİ

<b>Ekler</b>	<b>Sayfa</b>
Ek 1. DPPH metodu için grafik verileri.....	65
Ek 2. ABTS metodu için grafik verileri.....	66
Ek 3. Galvinoxil metodu için grafik verileri.....	67
Ek 4. Fosfomolibden metodu için grafik verileri.....	69
Ek 5. FRAP metodu için grafik verileri.....	70





## 1. GİRİŞ

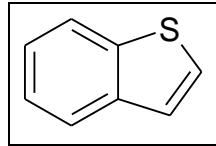
Halkalı aromatik bileşikler sahip oldukları biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı yeni ilaçların geliştirilmesinde büyük öneme sahiptirler (Brasholz ve ark., 2009). Bu bileşikler yıllardır antiparazitik (Coa ve ark., 2015), antibakteriyel (Shakdofa ve ark., 2014), antifungal (Pathak ve ark., 2012) ve antiinflamatuvar (Kazemizadeh ve ark., 2016) ilaçlar olarak da kullanılmaktadırlar. Ayrıca, antikanser ve antioksidan özellikleride bulunmaktadır (El Bialy ve Gouda, 2011).

Bunlara ek olarak, lipit peroksidasyonu'nun (Williams ve ark., 2004), potasyum kanal açıcıların (Edwards ve Weston, 1993), topoizomeraz inhibitörleri'nin (Pommier, 2006) ve L1210 fare lösemi hücre seçicileri'nin (Grynyuk ve ark., 2016) güçlü inhibitörleri olarak da bilinmektedirler.

### 1.1. Benzotiyofen Türevleri

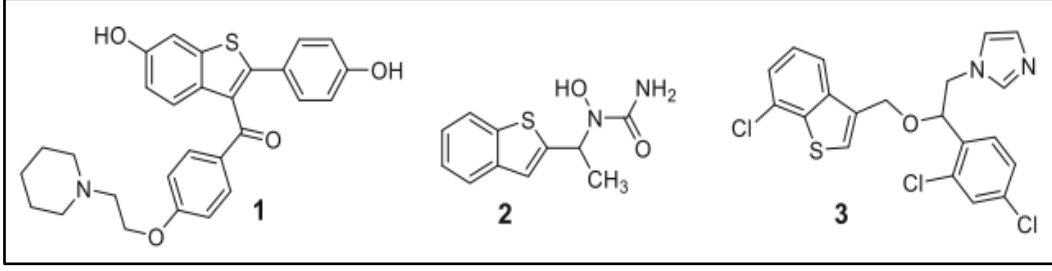
$C_8H_6S$  (Şekil 1.1) molekül formülüne sahip benzotiyofen ilaç kimyası ve sentez kimyasında önemli bir moleküldür. Benzotiyofenler ve türevleri organik yapıda olduklarından nispeten kararlıdır ve bu bileşiklerin malzeme kimyasında geniş bir alanda kullanılmalarına olanak sağlar (Cava ve Lakshmikantham, 1975).

Yapılan çalışmalarda benzotiyofen içeren bileşiklerin antitümör ve antikanser özellikleri olduğu bildirilmiştir (El Bialy ve Gouda, 2011).



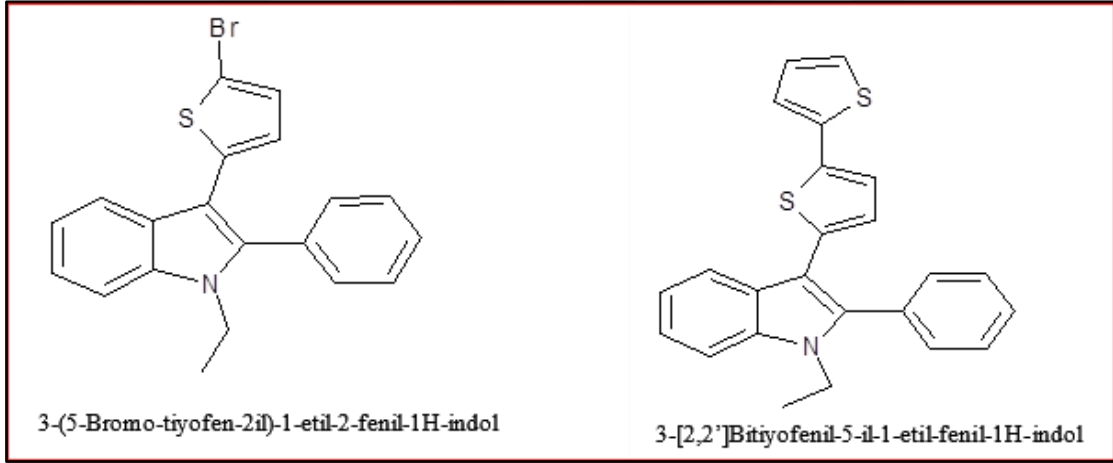
Şekil 1.1. Benzotiyofenin genel moleküler yapısı.

Ayrıca Şekil 1.2'de verilen “Raloxifene”, “Zileuton” ve “Sertaconazole” gibi ilaç olarak kullanılan benzotiyofen türevleri de mevcuttur (Algo ve ark., 2018).



Şekil 1.2. Raloksifen (1), Zileton (2) ve Sertaconazol (3)'ün yapıları.

Bu tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevlerinin yapıları Şekil 1.3'te ve maddelerin bazı özellikleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevleri.

Biyolojik testlerle bir molekülün ilaç olma potansiyeli belirlenmektedir. Fakat biyolojik testlerin öncesinde kullanılacak molekülün Christopher A. Lipinski (1997) tarafından oluşturulmuş kurallara uyup uymadığına bakılmaktadır.

İlaç olabilecek bir molekülün Lipinski kurallarına göre taşınması gereken başlıca özellikler aşağıda belirtilmiştir;

- 500 daltondan küçük molekül ağırlığına sahip olmalı,
- Lipofilite katsayısı 5'ten küçük olmalı,
- 5 veya 5'ten az hidrojen bağı oluşturur atomu sahip olmalı,
- 10'dan fazla hidrojen bağı oluşturma potansiyeline sahip atom olmamalıdır (Lipinski ve ark., 1997).



Ancak, şunu da belirtmek gerekir ki bir molekülün Lipinski kurallarına uyması onun bir ilaç olmasını ya da bir molekülün bu kurallara uymaması onun bir ilaç olamayacağını garantilememektedir (Lipinski, 2004).

Çizelge 1.1. Tezde kullanılan benzotiyofen türevlerinin özellik tablosu

Özellikler	3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol	3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol
Basit formülü	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> BrNS	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NS <sub>2</sub>
Moleküler ağırlığı	382,33 gr/mol	385,55 gr/mol
Tiyofen halka sayısı	1	2
Halojen grup sayısı (Br)	1	0

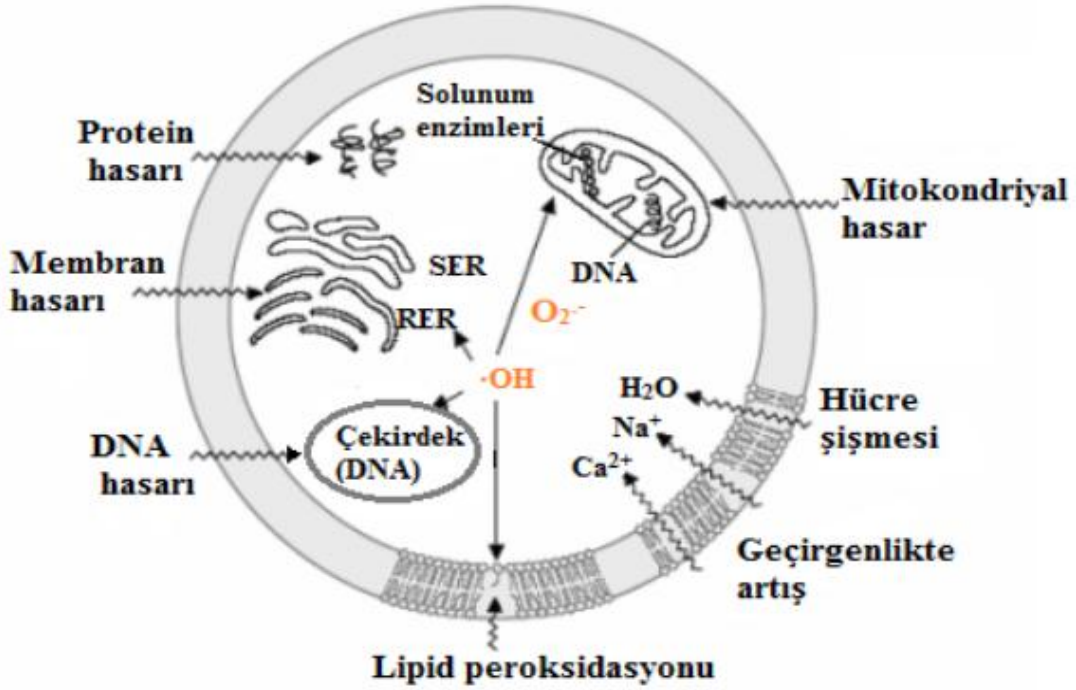
## 1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, son yörüngesinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan yüksek oranda reaktif molekül veya atomlardır (Sohal, 1993). Bu ortaklaşmamış elektronlar serbest radikallere büyük ölçüde reaktivite kazandırmaktadır. Küçük moleküller olan serbest radikaller düşük aktivasyon enerjisine sahiptirler ve kısa ömürlüdürler (Jensen, 2003).

Serbest radikaller kararsız moleküller olduklarından diğer moleküllerden elektron alarak ya da elektron vererek kararlı hale geçmeye çalışırlar. Bu şekilde, organizmada indirgeyici ya da yükseltgeyici olarak davranabilmektedirler (Çaylak, 2011).

Biyolojik önemi olan birçok atomda eşlenmemiş elektron bulunabilmektedir. Bir başka deyişle, oksijen, karbon, sülfür, nitrojen veya hidrojen kaynaklı radikaller bulunabilmektedir. Yaşam için çok önemli bir molekül olan oksijenin hücresel solunumda kullanılması sonucunda vücuda zarar verme potansiyeli bulunan reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelebilmektedir. Bundan dolayı, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin önemli bir kısmı oksijenden kaynaklanmaktadır (Delibaş ve Özçankaya, 1995). Ayrıca, serbest radikaller nötral, negatif yüklü ve pozitif yüklüde olabilirler (Jesberger ve Richardson, 1991).

Serbest radikallerin zararlarının yanısıra faydaları da olabilmektedir. Örneğin, nötrofiller ve makrofajlar aktive olduklarında NADPH oksidaz kompleksi ile hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerini üretebilirler. Dolayısıyla, bu şekilde vücudun savunmasına yardımcı olmaktadır (Tabakoğlu ve Durgut, 2013). Ancak, serbest radikallerin fazla üretilmeleri organizmada birçok hasara neden olmaktadır (Şekil 1.4). Bunlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerdeki bozukluklar, membran bütünlüğünün bozulması, genetik mutasyonlar ve proteinlerdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler şeklindedir (Memişoğulları, 2005).



Şekil 1.4. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre hasarı (Ugar, 2016).

### 1.2.1. Reaktif oksijen türleri

Oksijenli solunum yapan canlıların normal metabolizmaları sırasında besinler oksijen yardımıyla enerjiye dönüştürüldüğünde oksijen molekülü indirgenir ve çeşitli yan ürünler meydana gelmektedir. Bunlar, süperoksit, hidroksil, lipit peroksit gibi serbest radikaller ve reaktif oksijen türleridir (Tabakoğlu ve Durgut, 2013).

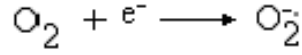
Çizelge 1.2'de oksijenin indirgenmesiyle meydana gelen bazı reaktif oksijen türleri görülmektedir.

Çizelge 1.2. Oksijenin indirgenmesi

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\cdot} \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot}$	Süperoksit radikali
$O_2^{\cdot} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Hidroksil radikali
$\cdot OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	Su molekülü

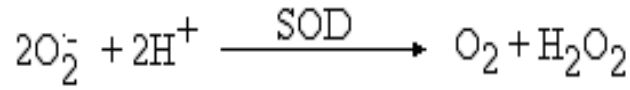
Reaktif oksijen türleri, serbest radikallerin dış yörüngesinde oksijen atomu ve paylaşılmamış bir elektronun bulunmasıyla meydana gelmektedir (Flora, 2007). Aşağıda en önemli reaktif oksijen türleri açıklanmaktadır.

**Süperoksit ( $O_2^{\cdot}$ ) radikali:** Şekil 1.5'te görüldüğü gibi moleküler oksijene bir elektronun eklenmesiyle oluşmaktadır.



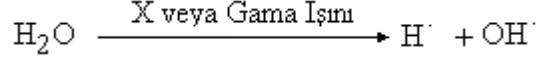
Şekil 1.5. Moleküler oksijenin bir elektron alması.

**Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ):** Süperoksit ( $O_2^{\cdot}$ ) radikaline süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle bir elektron transferiyle ya da moleküler oksijene iki elektronun eklenmesiyle (Şekil 1.6) meydana gelmektedir.

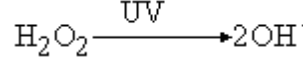


Şekil 1.6. SOD enzimi tarafından hidrojen peroksidin oluşumu.

**Hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) radikali:** Hidroksil radikali birçok şekilde meydana gelebilmektedir.  $O_2$ 'ye üç elektronun eklenmesiyle, suyun iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla (Şekil 1.7) ya da hidrojen peroksidin UV ışığına maruz kalması (Şekil 1.8) sonucu hidroksil radikali oluşabilmektedir.

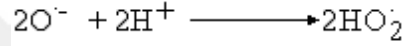


Şekil 1.7. Suyun iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla hidroksil radikalinin oluşumu.



Şekil 1.8. Hidrojen peroksit radikalinin UV ışığına maruz kalmasıyla hidroksil radikalinin meydana gelmesi.

**Hidroperoksil radikali (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>):** O<sub>2</sub><sup>-</sup>radikalinin düşük pH'da protonlanmasıyla (Şekil 1.9) oluşmaktadır (Çaylak, 2011).



Şekil 1.9. Süperoksit radikalinden, hidroperoksit radikalinin oluşumu.

### 1.2.2. Serbest radikallerin makromoleküller üzerindeki etkileri

Serbest radikaller eşlenmemiş elektronlara sahip olduklarından kararlı hale geçmek için diğer moleküllerden elektron alma veya verme eğilimindedirler. Bunun sonucu olarak diğer moleküller zarar görmekte ve kararsız hale geçmektedirler. Normal şartlarda serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan sistemi tarafından engellenmektedir. Ancak, bazı durumlarda serbest radikallerin bir kısmı antioksidan savunmadan kaçmakta ve vücutta protein modifikasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olabilmektedirler (Berger, 2005; Ekici ve Sağdıç, 2008).

DNA hasarında özellikle hidroksil (HO<sup>·</sup>) radikali oldukça önemlidir. Hidroksil radikali DNA'daki deoksiriboz-fosfatlar ve heterosiklik bazlarla tepkimeye girerek onların yapısını değiştirir ve riboz-fosfat zincirlerini kırmaktadır (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Proteinler serbest radikallerden etkilenen makromoleküller'dir. Bu etkilenme düzeyi aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağlar ve -SH grupları içeren tirozin ve metiyonin gibi aminoasitler serbest radikallere karşı oldukça hassastır (Van der Vliet ve ark., 1994).

Serbest radikaller lipitlerin doymamış bağlarıyla tepkimeye girerek lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Peroksidasyon esnasında poliansature yağ asitleri (PUFAH) hidrojenlerini kaybedip moleküler oksijenle tepkimeye girmektedirler. Meydana gelen lipit peroksitler reaktif oksijen türleri gibi hücre bileşenleri üzerinde etki göstermektedirler (Kavas, 1989).

### 1.3. Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşmasını engelleyen ya da radikalleri süpürerek (Şekil 1.4.) hücrenin hasar görmesini engelleyen ve genellikle yapısında fenolik grup taşıyan moleküllere antioksidan denmektedir (Kahkönen ve ark., 1999).

Antioksidanlar sağlık üzerindeki etkileri ile toplumda popülerliği artan bir kavram olup oksidasyonu engelleyen bir madde olarak tanımlanmaktadır (Huang ve ark., 2005).

Düşük konsantrasyonda bulunduğu bile okside olabilen bir substrata kıyasla o maddenin oksidasyonunu önleyen yada önemli oranda geciktiren maddelere de antioksidan denmektedir (Leonarduzzi ve ark., 2012).

Çizelge 1.3'te bazı oksidanlar ve bunlara karşı etkili olan antioksidan savunma sistemleri görülmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003).

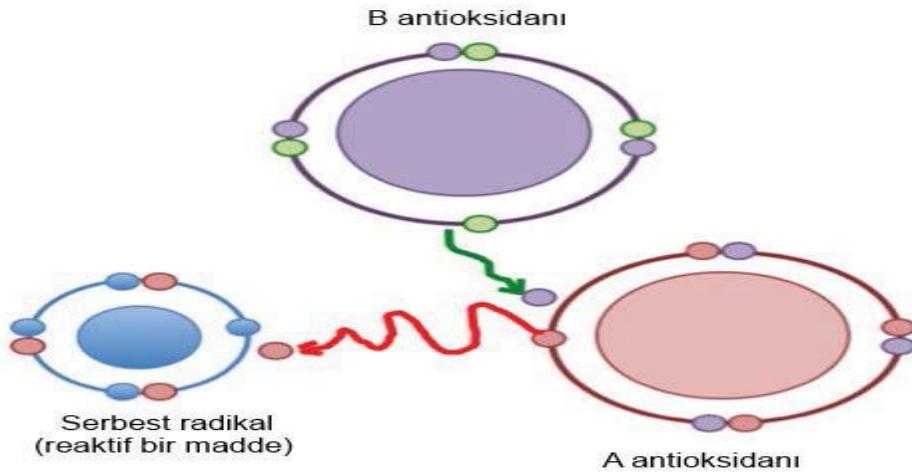
Çizelge 1.3. Bazı oksidanlar ve bu oksidanlara karşı etkili olan antioksidan savunma sistemleri

Oksidan	Antioksidan Savunma Sistemi
Egzersiz	$\beta$ - karoten ve diğer karotenoidler
Karsinojenler	Katalaz
Radyasyon	C vitamini
İskemi	Ubikinon
Çevre kirleticiler	Süperoksit dismutaz
Ateşli hastalıklar	Selenyum
Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	Glutatiyon peroksidaz
Sigara dumanı	Glutatiyon
	Ürik asit
	E vitamini

Antioksidanlar hücreleri karsinojenlerin, ilaçların ve radikal reaksiyonlarının kötü etkilerine karşı (Şekil 1.10) korumaktadırlar. Bu kontrol mekanizmasının temel amacı serbest radikallerinin aşırı çoğalmasını önlemektir. Antioksidanlar endojen veya eksojen mevcut radikalleri etkisiz hale getiren ya da oluşmasını engelleyen, enzimatik ya da enzimatik olmayan şekilde sınıflandırılabilir (Aydın, 2011). Aşağıda antioksidanların oksidantlara karşı etki şekilleri belirtilmiştir.

Oksidantlar, antioksidanlar tarafından başlıca 4 yolla zararsız hale getirilmektedir (Gökpınar ve ark., 2006).

1. Süpürme etkisi: Oksidantlar daha zayıf bir moleküle dönüştürülerek etkisizleştirilmektedir. Mikromoleküller ve antioksidan enzimler bu şekilde etki etmektedir.
2. Söndürme etkisi: Oksidantlara bir hidrojen aktararak inaktive edilmesine denmektedir. Flavonoidler, vitaminler, mannitol ve timetazidin bu şekilde etki etmektedir.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Serüloplazmin, hemoglobin ve ağır mineraller oksidantları kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp inaktive etmektedir.
4. Onarma etkisi: Oksidatif zarar görmüş biyomolekülü onarmaktadır.



Şekil 1.10. Serbest radikal eşlenmemiş elektrona sahip reaktif bir maddedir. Bu reaktif madde bir antioksidan (A) tarafından daha kararlı bir moleküle (B) dönüştürülür (Villanueva ve Kross, 2012).

### 1.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar eksojen kaynaklı ve endojen kaynaklı antioksidanlar olarak ayrıldığı gibi mevcut radikali etkisiz hale getiren ya da radikalin oluşmasını engelleyen antioksidanlar olarak da ayrılabilir. Ayrıca, antioksidanlar enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (Akkuş, 1995).

#### 1.3.1.1. Enzimatik antioksidanlar

**Süperoksit Dismutaz (SOD):** Bu enzim süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünde (Bkz. Şekil 1.6) görevlidir ve serbest radikallere karşı hücredeki ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Aydın, 2011).

**Katalaz (CAT):** Çoğunlukla peroksizomlarda az miktarda sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunan bu enzim hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalamaktadır (Şekil 1.11). Bu enzim büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine etki etmemektedir (Akkuş, 1995).



Şekil 1.11. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

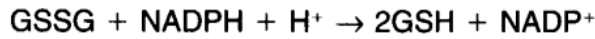
**Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):** Bu enzim hücrenin sitozolüne yerleşmiştir ve 4 selenyum atomu içerir. Glutasyon peroksidaz elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda (Şekil 1.12) görev alır. İki alt birimi vardır. Bunlardan birinin aktif bölgesinde selenyum atomu olan selenyuma bağımlı glutasyon peroksidazdır. Diğerinin ise aktif bölgesinde selenyum atomu olmadığından selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz olarak adlandırılır. Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz, lipid hidroperoksitleri ve hidrojen peroksit detoksifikasyonunda görev alır. Selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz ise daha çok lipid hidroperoksitlerini metabolize etmekte görev alır. En fazla karaciğerde bulunan bu

enzim kalp, akciğer, beyin ve kaslarda da bulunmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016; Özenç, 2011).



Şekil 1.12. Glutatyon Peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

**Glutatyon Redüktaz (GSH-Red):** Glutatyon peroksidaz aktivitesinden sonra meydana gelen oksitlenmiş glutatyonun tekrar redükte glutatyona çevrilmesinde (Şekil 1.13) görev almaktadır. Birçok memeli hücresinde milimolar konsantrasyon düzeylerinde bulunmaktadır (Halliwell, 1994).



Şekil 1.13. Glutatyon Redüktaz tarafından okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşüm reaksiyonu.

**Glutatyon S-Transferaz (GST):** GST'ler (E.C. 2.5.1.18), ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda faz II enzimi olarak görev alan bir enzim ailesidir. Bu enzim, glutatyon ile ekzojen ve endojen hidrofobik ve elektrofilik bileşiklerin bağlanmasını sağlayan çok işlevli bir enzimdir (Şekil 1.14). Glutatyon S-transferaz'ların genellikle mutajenler, karsinojenler ve diğer zararlı kimyasal maddelerinin hücre içi detoksikasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Mannervik ve ark., 1988; Arı ve Dere, 2003).



Şekil 1.14. Glutatyon S-Transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

Ayrıca süperoksidi detoksifiye eden mitokondriyal sitokrom oksidaz ve membran fosfolipid hidroperoksitleri alkollere indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidazda (PLGSH-Px) bulunmaktadır (Aydın, 2011).



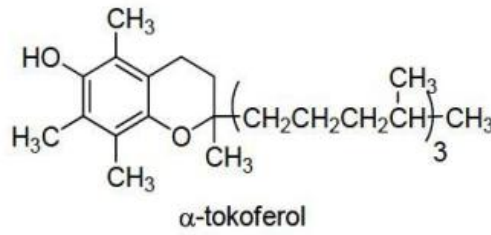
### 1.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

#### Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH); glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan bir tripeptit'tir (Bkz. Şekil 1.28). Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan'dır. Oksidasyon ile redüksiyon dengesini kurup hücreleri eksojen ve endojen oksidantlara karşı korumaktadır (Konukoğlu ve Akçay, 1995).

#### Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)

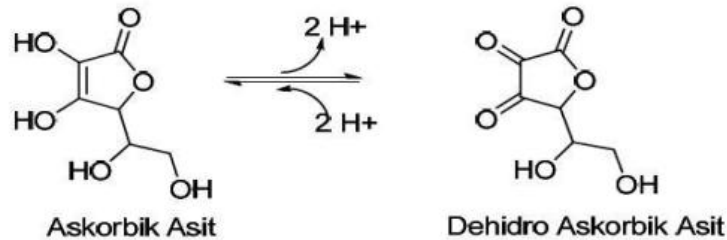
Yağda çözünen bir vitamin olan vitamin E (Şekil 1.15) vücutta çok az miktarlarda bulunmaktadır. Hücre membranında bulunan fosfolipidlerin doymamış yağ asitlerini radikallerden korumaktadırlar. Ayrıca okside olduktan sonra glutatyon ve askorbik asit'le tekrar indirgenebilmektedir (Aydın, 2011; Tekeli, 2012).



Şekil 1.15. Vitamin E'nin moleküler yapısı.

#### Vitamin C (Askorbik asit)

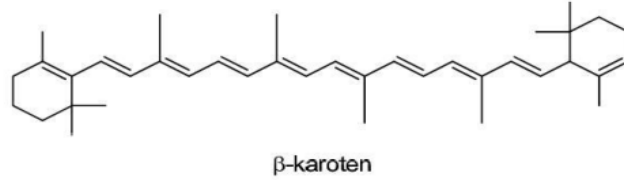
C vitamini bir monosakkarit türevidir. İndirgeyici özelliğinden dolayı süperoksit radikali ve hidroksil radikaliyle tepkimeye giren güçlü bir antioksidan'dır (Aydın, 2011). Şekil 1.16'da askorbik asit'in dehidro askorbik asite dönüşümü gösterilmektedir.



Şekil 1. 16. Askorbik asit'in dehidro askorbik asite dönüşüm mekanizması.

## Karotenoidler

Bitkilerde doğal renk pigmentleri olarak bulunan karotenoidlerin en çok bilineni vitamin A'nın öncüsü olan  $\beta$ -karoten'dir (Şekil 1.17). Karotenoidler hücreleri serbest radikallerden koruyarak antioksidan görevi görmektedir (Aydın, 2011).



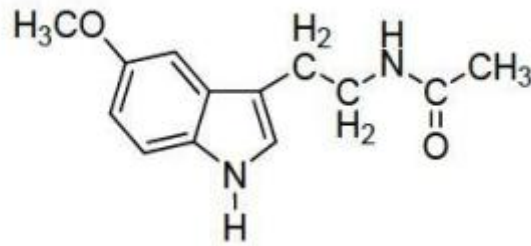
Şekil 1.17.  $\beta$ -karoten'in yapısı.

## Flavonoidler

Bitkilerin sekonder metabolitleri olan flavonoidler 3'-4'dihidroksi konfigürasyonuna sahip olduklarından antioksidan aktiviteye sahiptirler (Avcı, 2001; Aydın, 2011).

## Melatonin

Karanlık ortamda pineal bezinden sentezlenen bu hormon vücutta uyku, üreme, immünite gibi birçok farklı fonksiyondan sorumludur. Hidroksil radikalini inhibe eder ve güçlü bir antioksidan'dır (Yazıcı ve Köse, 2004). Şekil 1.18'de melatonin molekülünün yapısı görülmektedir.



Şekil 1.18. Melatonin hormonunun yapısı.

Ayrıca ürat, bilirubin, albümin, seruloplazmin ve sistein gibi antioksidan molekülleri de mevcuttur.

## 1.4. Antioksidan Kapasite Ölçüm Metotları ve Literatür Derlemesi

Gıdaların ve biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için farklı metotlar kullanılmaktadır.

Antioksidan kapasite kavramı ilk olarak kimya alanından doğmuş olup, daha sonra biyoloji, tıp ve epidemiyoloji gibi alanlara uyarlanmıştır (Floegel ve ark., 2011).

### 1.4.1. Antioksidan mekanizmaları

Antioksidan kapasite farklı oksidan kaynaklarına göre farklı sonuçlanabilmektedir (Karadağ ve ark., 2009). Hiçbir analiz karmaşık bir sistemdeki tüm radikal kaynakların veya tüm antioksidanların etki mekanizmasını doğru olarak yansıtamamaktadır (Prior ve ark., 2005). Bu yüzden antioksidan kapasiteyi belirlemek için farklı metotların kullanılması gerekmektedir.

Antioksidan kapasite yöntemleri genellikle iki kategoriye ayrılmıştır: (1) hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonuna ve (2) elektron transferi (ET) reaksiyonuna dayalı yöntemler (Karadağ ve ark., 2009).

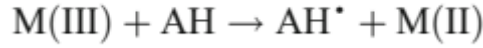
HAT temelli yöntemler, bir antioksidanın, serbest radikalleri, stabil bağlar oluşturmak için hidrojen bağıışı ile süpürme becerilerini ölçmektedir. Bu prensip antioksidan molekülden radikale hidrojen geçişi (Şekil 1.19) şeklindedir (Prior ve ark., 2005).



Şekil 1.19. HAT temelli antioksidan kapasite yöntemlerinin serbest radikallerle tepkimesinin mekanizması.

HAT temelli reaksiyonlar, çözücü ve pH'a bağımlıdır ve genellikle oldukça hızlı gerçekleşmektedir (Karadağ ve ark., 2009).

ET temelli yöntemler, potansiyel bir antioksidanın, bir elektronu herhangi bir bileşiği azaltmak üzere transfer etme (Şekil 1.20) yeteneğini saptar. ET yöntemlerinde, reaktivite reaktif fonksiyonel grubun proton giderme ve iyonizasyon potansiyeline dayandığından ET reaksiyonları pH'a bağlıdır (Prior ve ark., 2005).



Şekil 1.20. ET temelli antioksidan kapasite yöntemlerinin serbest radikallerle tepkimesinin mekanizması.

#### 1.4.2. Antioksidan kapasite metotları

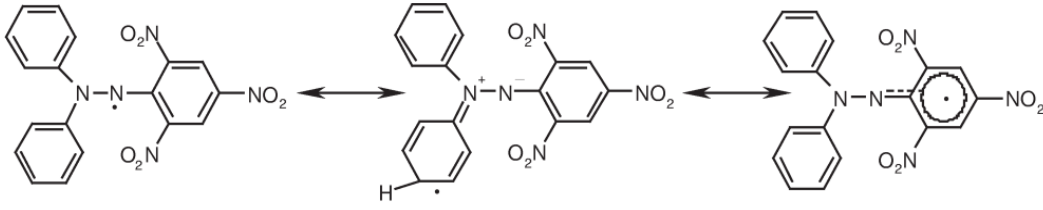
Birçok antioksidan kapasite tayin metodu mevcuttur. Bunların bazıları HAT temelli bazıları da ET temellidir. Toplam antioksidan kapasite değeri, hem hidrojen atomu transferi hem de elektron transfer mekanizmasının benzerliği ve farklılıkları bakımından, hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilen yöntemleri içermelidir (Karadağ ve ark., 2009).

Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi belirlemek için DPPH, ABTS, galvinoxil, fosfomolibden ve FRAP metotları kullanıldı.

##### 1.4.2.1. DPPH metodu

Blois (1958) tarafından gerçekleştirilen bu yöntem en yaygın kullanılan antioksidan kapasite belirleme yöntemlerinden birisidir. Hidrojen atomu verebilen antioksidanlarla tepkimeye giren DPPH radikali (Şekil 1.21) 517 nm'de en yüksek absorban değerini vermektedir (Yavaşer, 2011).

DPPH radikalinin 517 nm'de absorbanı 30 dakikadan fazla sürmektedir. Ancak, pH ve ışık gibi faktörlerin etkisiyle absorbansta düşüş meydana gelebilmektedir (Aydemir, 2018).



Şekil 1.21. DPPH radikalın yapısı (Ionita, 2005).

Başlangıçta mor renkli olan DPPH radikali antioksidan molekülü ile tepkimesinde indirgenip ve açık sarı bir renk almaktadır (Karadağ ve ark., 2009).

Kalan DPPH yüzdesini bulmak için "Eş.1.1"örneğindeki formül kullanılır.

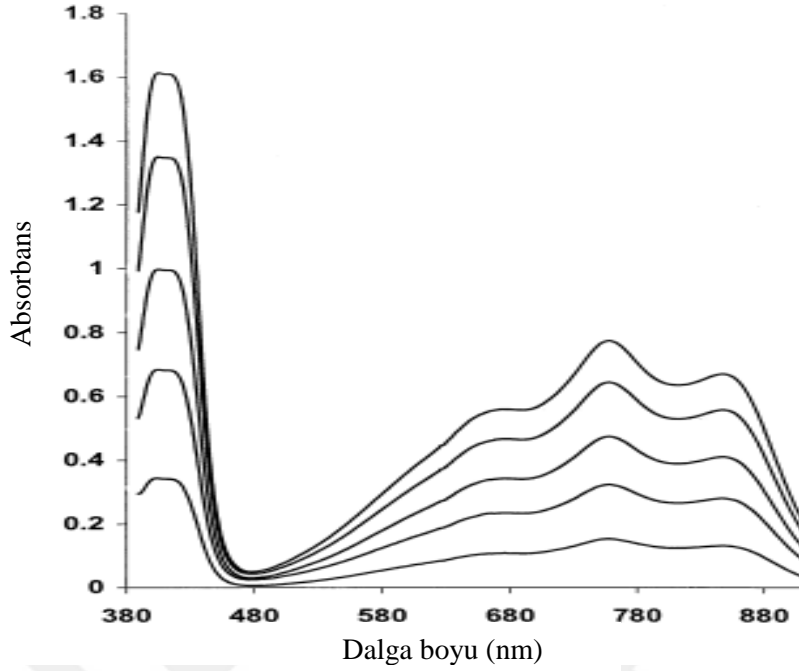
$$\% \text{ DPPH}_{\text{kalan}} = 100 \times [\text{DPPH}]_{\text{kalan}} / [\text{DPPH}]_{t=0} \quad (1.1)$$

Yüzde  $\text{DPPH}_{\text{kalan}}$  çözeltide bulunan antioksidan konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Önemli bir parametre  $\text{EC}_{50}$  değeridir.  $\text{EC}_{50}$  değeri DPPH konsantrasyonunu %50 düşürmek için gerekli olan antioksidan konsantrasyonunu ifade etmektedir (Prior ve ark., 2005).

#### 1.4.2.2. ABTS (TEAC) metodu

ABTS metodu ilk olarak Miller ve arkadaşları (1993) tarafından gıda örneklerinde antioksidan kapasiteyi test etmek için kullanılmıştır. Daha sonra ise Re ve arkadaşları (1998) tarafından geliştirilmiştir. ABTS'nin antioksidan testlerde kullanılabilmesi için öncelikle oksitlenip radikal katyonu ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) formuna dönüşmesi gerekir.  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radikali mavi/yeşil renktedir ve 600-750 nm dalga boyu arasında güçlü bir absorbansa (Şekil 1.22) sahiptir (Karadağ ve ark., 2009; Selçuk, 2012).

ABTS'yi radikal katyonu formuna çevirmek için enzimatik (peroksidaz) ya da kimyasal reaksiyonlar (manganez dioksit, potasyum persülfat) kullanılmaktadır. Enzimatik reaksiyonlar daha hızlı gerçekleşirken kimyasal reaksiyonlar daha uzun süre (potasyum persülfat ile reaksiyon 16 saate kadar sürebilir) gerektirebilir (Karadağ ve ark., 2009).

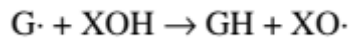


Şekil 1.22. ABTS radikal kationunun ( $ABTS^{\bullet+}$ ) absorpsiyon spektrumu (Re ve ark., 1998).

Bu metodun temel prensibi mavi/yeşil olan ABTS radikalinin antioksidanla tepkimesinde bu rengin kaybolmasına dayanmaktadır. Meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede ölçülerek örneklerin antioksidan kapasitesi troloks ile karşılaştırılmaktadır (Prior ve ark., 2005).

#### 1.4.2.3. Galvinoksil metodu

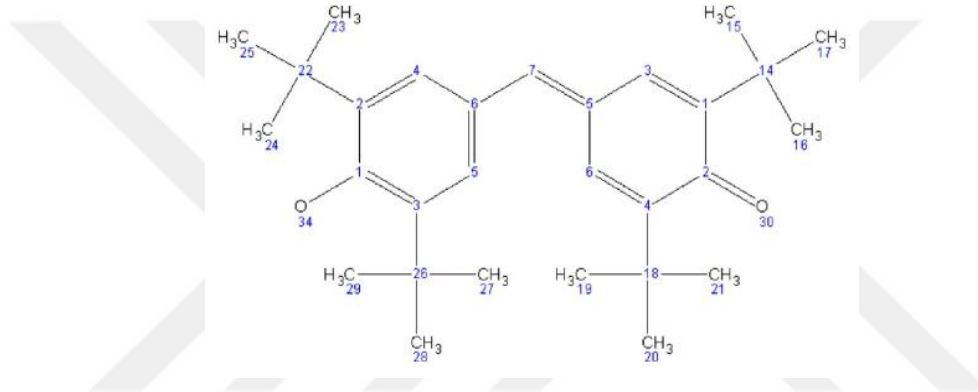
Shi ve Niki (1998) *Ginko biloba* bitkisinin ekstratlarıyla yaptıkları antioksidan aktivite çalışmasında galvinoksil radikalini kullanmışlardır. Yaptıkları stokiyometrik çalışmalarda stabil bir fenoksil radikali olan gavinoksilin etanol içinde 428 nm'de güçlü bir absorbansı olduğu görülmüştür. Galvinoksilin bir hidrojen veren antioksidan ile reaksiyonu Şekil 1.23'te görülmektedir (Shi ve Niki, 1998).



Şekil 1.23. Galvinoksil radikalinin antioksidan molekül ile tepkimesi.

- G, galvinoksil radikalini,
- XOH, hidrojen veren serbest radikal toplayıcıyı,
- GH, indirgenmiş galvinoksili,
- XO, XOH'dan türetilen radikali temsil etmektedir.

Bu yöntemin temeli, bir galvinoksil molekülünün (Şekil 1.23) bir aktif hidroksil grubu ile reaksiyona girmesi ve tepkime çözeltisinde galvinoksilin absorbandsının azalması ile galvinoksil ile reaksiyondaki aktif fenolik hidrojenlerin miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır (Shi ve Niki, 1998).



Şekil 1.24. Galvinoksil radikalinin kimyasal yapısı (Niermann ve ark., 2006).

Galvinoksil radikali (Şekil 1.24) antioksidanların reaksiyonlarını incelemek için bir prob olarak kullanılmaktadır. Serbest radikallere karşı son derece etkili olan askorbik asit ve E vitamininin galvinoksil radikaliyle tepkimesi hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu yüzden birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2000).

#### 1.4.2.4. Fosfomolibden metodu

Prieto ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen bir antioksidan kapasite belirleme metodu'dur. Bu yöntemin temel prensibi antioksidan molekül tarafından Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesi reaksiyonuna dayanmaktadır (Özden ve Özden, 2014). İndirgenmiş olan Mo (V) yeşil bir renk meydana getirmektedir ve bu yeşil renk UV spektrofotometresinde bakıldığında 695 nm dalga boyunda maksimum absorbands (Şekil 1.25) vermektedir (Prieto ve ark., 1999).





Bu yöntem ferrik indirgenme gücünü ölçmektedir. Düşük pH'ta, bir ferrik-tri-piridridiazin (FeIII-TPTZ) kompleksi, demir (FeII) formuna indirgendiğinde (Şekil 1.26), 593 nm'de maksimum bir absorpsiyona sahip yoğun mavi bir renk oluşmaktadır (Benzie ve Strain, 1996).

Aşağıda FRAP metodunun çeşitli avantajları ve dezavantajları belirtilmiştir (Prior ve ark., 2005).

- Test edilen maddeye göre reaksiyon süresi daha uzun ya da daha kısa olabilmektedir. Örneğin, demiri bağlayan ve hızlı bir şekilde reaksiyona giren fenollerle 4 dakikalık reaksiyon süresi gerektiriyor iken bazı polifenoller için bu süre 30 dakikaya kadar uzayabilmektedir,
- FRAP testi, glutatyon gibi tiyol antioksidanların ölçümünü yapamamaktadır,
- Yalnızca ferrik demir iyonunun indirgenme kapasitesini ölçmektedir,
- Bu yöntem basit, ucuz ve uygulanması kolaydır.

## **1.5. Glutatyon S-Transferazlar**

### **1.5.1. Genel bilgi**

Glutatyon S-transferazlar genellikle mutajenler, karsinojenler ve diğer zararlı kimyasal maddelerin hücre içi detoksikasyonunda görev alan bir enzim ailesidir (Mannervik ve ark., 1988; Arı ve Dere, 2003).

GST kuşlarda, memelilerde, böceklerde ve birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. En fazla karaciğerde bulunan bu enzim, ince bağırsak, akciğer, plasenta, kas ve kalın bağırsak gibi birçok organın sitozolünde ve membranında bulunmaktadır (Arı ve Dere, 2003).

GST'ler mikrozomal, mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere üç formda bulunmaktadır (Jakobsson ve ark., 1999). Sitolozolik GST'ler (Çizelge 1.4) memelilerde, aminoasit dizilişi, kimyasal özellikler ve immünolojik özelliklerine göre pi ( $\pi$ ), teta ( $\theta$ ), mü ( $\mu$ ), zeta ( $\zeta$ ), sigma ( $\sigma$ ), omega ( $\omega$ ) ve alfa ( $\alpha$ ) olarak 7 ayrı gruba ayrılmaktadır (Tozkoparan ve Aytaç, 2007).

Çizelge 1.4. İnsan sitoplazmik glutatyon transferazların sınıflandırılması (Mannervik ve ark., 2005)

<b>Enzim</b>	<b>Sınıf</b>	<b>Gen</b>	<b>Kromozom bandı</b>
GST A1-1	Alfa	GSTA1	6p12
GST A2-2	Alfa	GSTA2	6p12
GST A3-3	Alfa	GSTA3	6p12
GST A4-4	Alfa	GSTA4	6p12
GST A5-5	Alfa	GSTA5	6p12
GST M1-1	Mu	GSTM1	1p13
GST M2-2	Mu	GSTM2	1p13
GST M3-3	Mu	GSTM3	1p13
GST M4-4	Mu	GSTM4	1p13
GST M5-5	Mu	GS M5	1p13
GST P1-1	Pi	GSTP1	11q13
GST T1-1	Teta	GSTT1	22q11.2
GST T2-2	Teta	GSTT2	22q11.2
GST Z1-1	Zeta	GSTZ1	14q24.3
GST O1-1	Omega	GSTO1	10q24.3
GST O2-2	Omega	GSTO2	10q24.3
PGD2/GST S1-1	Sigma	PGD2	4q22.3

#### 1.5.1.1. Biyolojik detoksifikasyon

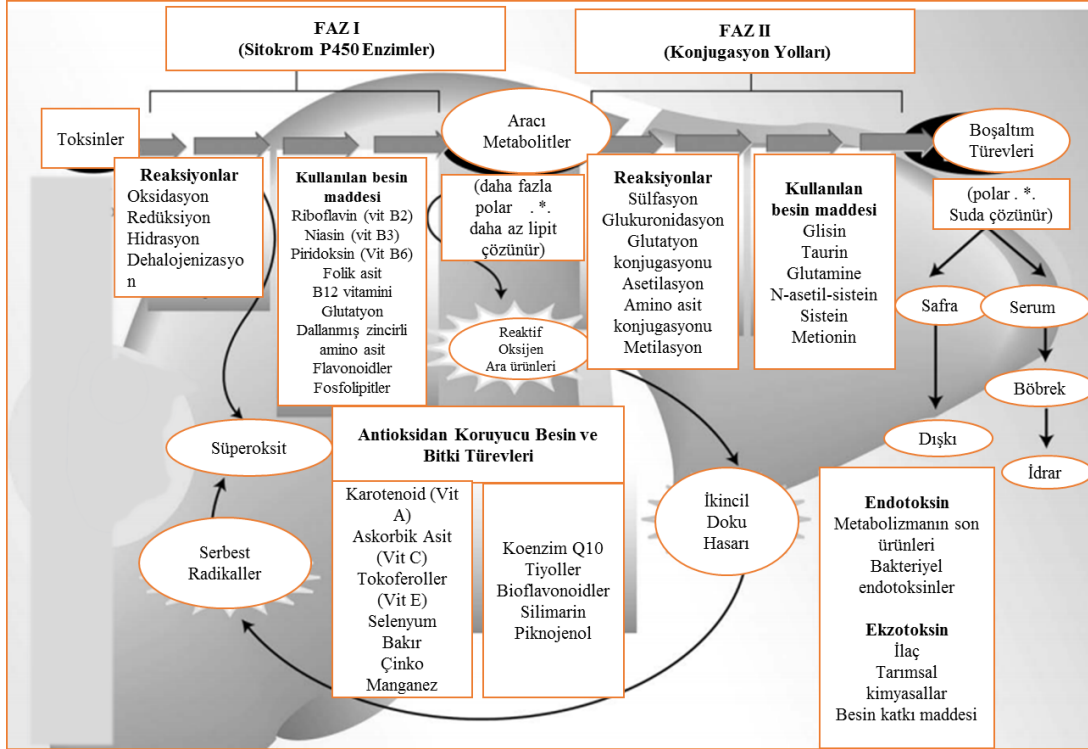
Canlılar günlük yaşamlarında çeşitli zararlı kimyasallara maruz kalmaktadır. Bu maddeler canlının normal metabolizmasında üretilen endojen kaynaklı ya da herbisit, kirli hava, pestisitler gibi eksojen kaynaklı kimyasallar da olabilmektedir. Bu zararlı kimyasalları uzaklaştırmak için canlılar detoksifikasyon sistemlerine sahiptirler.

1947'de Roger Williams tarafından detoksifikasyon için iki mekanizma açıklanmıştır.

Bunlar arasında, faz I mekanizması, bir oksijen atomu kullanılarak detoksifiye edilecek molekülde reaktif bir grubun ortaya çıkması şeklindedir.

Karaciğerde yüksek konsantrasyonlara sahip olan sitokrom P450 sistemi, faz I'in ana reaksiyonları arasındadır. Faz II reaksiyonları konjugasyon reaksiyonları olarak adlandırılır ve genellikle faz I reaksiyonlarından sonra gerçekleşmektedir. Bu aşamada, toksik maddeye glukuronidasyon, hidrosilasyon, sülfasyon ve glutatyonilasyon reaksiyonları ile suda çözünebilir bir grup eklenerek toksik madde vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Glutatyon S-transferazlar faz II reaksiyonlarında rol oynayan

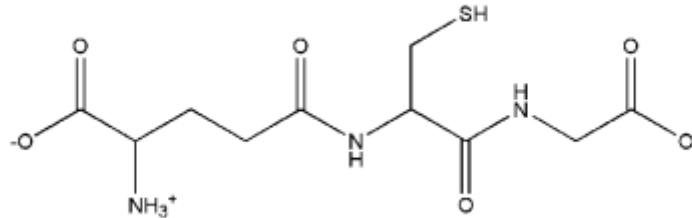
önemli bir enzim ailesidir ve konjugasyon için glutasyonu kullanmaktadırlar (Liska ve ark., 2006). Şekil 1.27’de faz I ve faz II detoksifikasyon mekanizmaları görülmektedir.



Şekil 1.27. Karaciğer detoksifikasyon yolları ve destekleyici besinler (Liska ark., 2006).

### 1.5.1.2. Glutasyon

Glutasyon (GSH), glutasyon-S-transferazlar aracılığıyla ksenobiyotiklerin konjugasyon tepkimelerinde rol oynayan (Estrela ve ark., 2006) glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan bir tripeptit’dir (Şekil 1.28).



Şekil 1. 28. Glutasyonun ( $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) yapısı (Muşdal, 2012).

GSH hücrede, savunma ve metabolizmada olmak üzere pek çok görev almasının yanısıra kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesinde ve amino asit taşınımında da rol oynamaktadır (Estrela ve ark., 2006).

## **1.5.2. Sitozolik Glutatyon S-transferazlar**

### **1.5.2.1. Sitozolik Glutatyon S-transferazların sınıflandırılmaları**

Memelilerde sitozolik GST'ler alfa, mu, pi, sigma, zeta, omega ve teta olmak üzere yedi farklı izomere ayrılmaktadır. Bunlar GST enzim ailesinin çözünür formları olup her bir form kendi arasında alt birimlere ayrılmaktadır (Çizelge 1.3.) (Mannervik ve ark., 2005).

### **1.5.2.2. Yapıları**

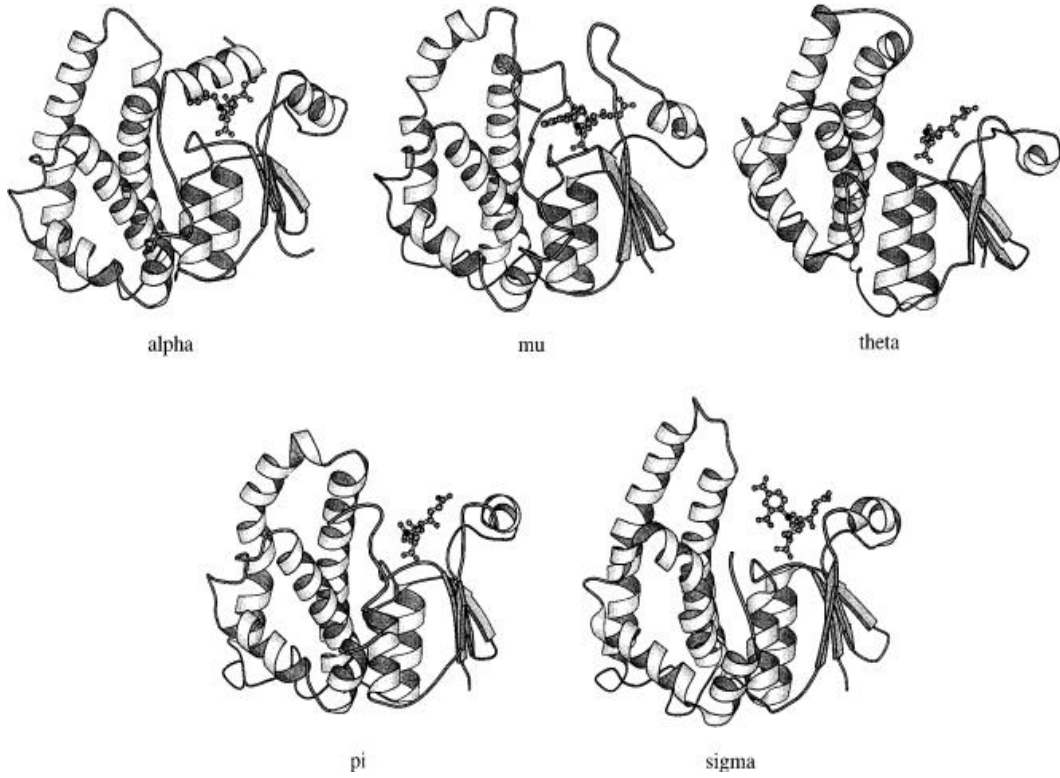
X-ışını kromatografisiyle GST'nin birçok formu (Şekil 1.29) ortaya çıkarılmıştır. GST formlarına protein veri bankalarından ulaşılabilir. GST'ler homodimerik yapıda enzimlerdir. Her alt birimi yaklaşık 210 aminoasitten oluşmaktadır ve 24-29 kDa molekül ağırlığına sahiptirler. GST sınıfları arasında dizi benzerliği %30'dan az olsa da benzer protein katlanmalarına sahiptir (Muşdal, 2012).

Çok substratlı GST enziminin korunmuş dizileri içeren G- ve H- bölgeleri vardır. G-bölgesi GSH'ın bağlandığı bölge iken H-bölgesi elektrofilik ve hidrofobik substratların bağlandığı bölgedir (Armstrong, 1997; Arı ve Dere, 2003).

Bilinen tüm GST dizilerinde bazı aminoasit kısımları korunmuştur. Bunlar; Pro-53, Tyr-7, Ile-68, Asp-57, Gly-145 ve Asp-152'dir.

Kristalografik çalışmalar, ilk iki aminoasidin yan zincirinin, GSH bağlanma bölgesinde kilit roller oynadığını, diğer yan zincirlerin rolünün ise daha az olduğunu göstermiştir. Son üç aminoasit yan zinciri gömülüdür ve protein katlanmalarının belirlenmesi için önemli olabilmektedir. Asp-57'nin görevi ise halen belirsizdir. Glutatyon bağımlı enzimlerin, oksijen metabolizmasının toksik yan ürünlerinin

üretilmesine yanıt olarak aerobik organizmalarda evrimleştiği öne sürülmektedir (Armstrong, 1997).



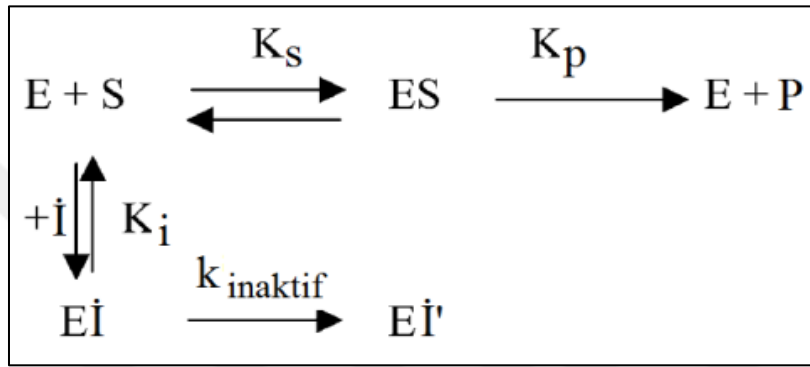
Şekil 1.29. GST alfa, mu, teta, pi ve sigma enzimlerinin üç boyutlu yapıları (Armstrong, 1997).

Arg15, alfa glutatyon transferaz sınıfında korunmuş bir aktif bölge dizisidir. Tyr9'un fenolik hidroksil grubu glutatyonun kükürt atomuna ile bir hidrojen bağı oluşturur ve bu hidroksil grubunun uzaklaştırılması enzimin kısmi inaktivasyonuna neden olur (Björnstedt ve ark., 1995).

## 1.6. Enzim inhibisyonu

Enzimin aktivitesinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ya da yok edilmesi olayına inhibisyon buna neden olan maddelere de inhibitör denir. İnhibitör maddeler genellikle iyonlar ya da düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Enzimatik aktivite biyolojik sistemlerin birçoğunda rol aldığından enzimatik aktivitenin kontrolü olan enzimatik inhibisyon biyolojik sistemlerde son derece önemlidir (Özler, 2009).

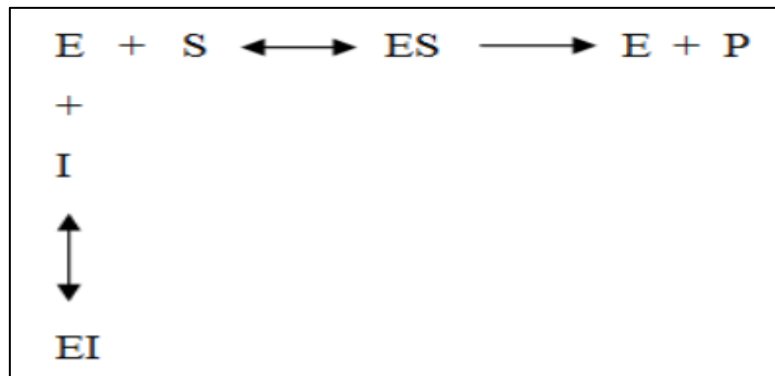
Enzim inhibisyonunun geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki tipi vardır. Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonunda inhibitör madde enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak enzimin aktivitesini durdurur (Şekil 1.30). Geri dönüşümlü enzim inhibisyonunda ise enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bir bağlanma gerçekleşmez. Üç çeşit geri dönüşümlü enzim inhibisyon tipi vardır. Bunlar; yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur (Önez, 2006).



Şekil 1.30. Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu (Gürsoy ve Gürsoy, 2017).

### 1.6.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

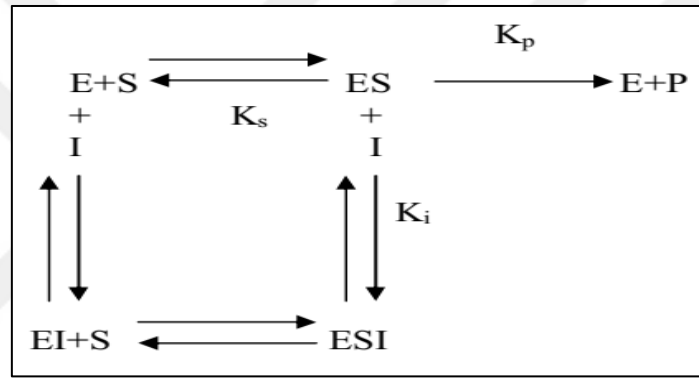
Yarışmalı inhibisyon geri dönüşümlü enzim inhibisyonunun yaygın bir türüdür. Bu inhibisyon türü inhibitör maddenin enzimin aktif bölgesi için substrat ile yarışması prensibine dayanır (Şekil 1.31). Enzimin (E) aktif bölgesine inhibitör (İ) bağlandığında enzim-inhibitör kompleksi (E-İ) oluşur ve substrat enzime bağlanamadığından tepkime gerçekleşmez (Palüzar, 2013).



Şekil 1.31. Yarışmalı enzim inhibisyonu (Palüzar, 2013).

### 1.6.2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon

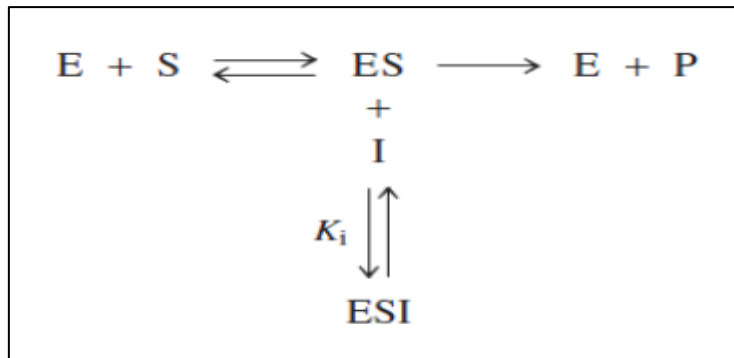
Bu inhibisyon tipinde inhibitör madde enzimin aktif bölgesi dışındaki başka bir bölgeye bağlanır. İnhibitör madde enzimin aktif bölgesine bağlanmadığından enzim-substrat (ES) kompleksi oluşmaya devam eder. Ancak enzim ile substrat arasındaki reaksiyon normal hızlarla devam etmez. İnhibitörle substrat birbirinde bağımsız bir şekilde enzime bağlanarak ES ve EI komplekslerini oluştururlar. Hatta ES+I ve EI+S durumlarında ESI kompleksi de oluşur (Şekil 1.32). Yarışmasız inhibisyon enzimin substrat ile tepkimesini durdurmaz yalnızca enzim katalitik aktivitesini düşürür (Önez, 2006).



Şekil 1.32. Yarışmasız inhibisyon (Önez, 2006).

### 1.6.3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Yarı yarışmalı inhibisyon tipinde inhibitör madde direkt olarak enzime bağlanamayıp enzim-substrat kompleksine bağlanır (Şekil 1.33). ES kompleksine bağlanan inhibitör kompleksin yapısını bozarak ürün oluşmasını engeller (Kılıç, 2015).



Şekil 1.33. Yarı yarışmalı inhibisyon (Kılıç, 2015).

### 1.7. Tezin Amacı

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş benzotiyofen türevlerinin (3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol ve 3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol) antioksidan kapasitelerini 5 farklı antioksidan kapasite metoduyla belirlenmesi ve ayrıca bu maddelerin GST A1-1 izozimi üzerine olası inhibisyon ya da aktivasyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece sentezlenmiş benzotiyofen türevlerinin ilaç olup olmayacağı hakkında ön değerlendirme yapılması hedeflenmiştir. Yeni sentezlenmiş bir maddeyle yeni bir ilacın üretilmesinin ülke ekonomisi ve insan sağlığı üzerindeki etkileri büyük olacaktır. Bu yüzden bu ön değerlendirme çalışması önem arz etmektedir.





## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

El Bialy ve Gouda, 2011 yılında yeni sentezlenmiş benzotiyofen türevleri ile yaptıkları çalışmada antioksidan kapasiteyi bulmak için ABTS metodunu kullanmışlardır ve test ettikleri bazı benzotiyofen türevlerinin oldukça iyi antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirmişlerdir.

Algo ve arkadaşlarının 2018 yılında yeni sentezlenmiş benzotiyofen türevleri ile ilgili yaptıkları çalışmada antioksidan kapasiteyi belirlemede ABTS metodunu ve referans olarak troloks'u (E vitamini analogu) kullanmışlardır. Test edilen örneklerden iki tanesinin antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğunu (TEAC değerleri 2.5 ve 1.1) bildirmişlerdir.

Ferreira ve arkadaşlarının 2006 yılında sentetik benzotiyofen türevleriyle yaptıkları ve DPPH yöntemini kullandıkları çalışmada bazı benzotiyofen türevlerinin antioksidan özellik gösterdikleri saptanmıştır. Hatta bazı türevlerin referans olarak kullanılan askorbik asit'ten bile daha yüksek indirgeme gücüne sahip olduğunu bildirilmişlerdir.

Muşdal 2012 yılında sentetik heterosiklik maddelerle yaptığı çalışmaya göre benzoksazol halkası taşıyan bir bileşiğin (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamid) hGST P1-1 üzerinde kuvvetli inhibisyon özelliği gösterdiğini saptamışlardır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Antioksidan kapasiteleri test edilecek olan 3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol ve 3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol maddeleri (Tezin bundan sonraki bölümlerinde 3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol maddesi için **madde 1** ve 3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol maddesi için ise **madde 2** kısaltmaları kullanıldı) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Arif KIVRAK'tan temin edildi. Diğer kimyasalların satın alındığı firmalar ve bu kimyasalların kodları Çizelge 3.1 'de gösterildi.

Çizelge 3.1. Tez kullanılan kimyasalların marka ve kodları

Kimyasalın adı	Kimyasalın Marka ve Kodu
GST A1-1	Sigma- Aldrich-GS60
İndirgenmiş glutatyon (GSH)	Sigma-Aldrich-G4251
1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	Sigma-Aldrich-138630
Kuersetin	Sigma-Aldrich-117-39-5
Askorbik asit	VWR-83568.180
Troloks	Acros Organics-218940010
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil	Sigma-Aldrich-D9132
2,2-azino bis (3-ethyl benzothiazolin-6-sülfonik asit)	Sigma-Aldrich-A3219
Potasyum persülfat	Sigma-Aldrich-216224
2,4,6- tripiridil s-triazin (TPTZ)	Alfa Aesar-3682-35-7
FeCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich-451649
Amonyum molibdat	Sigma-Aldrich-A1343
Sodyum fosfat	Sigma-Aldrich-342483
Sülfirik asit	Sigma-Aldrich-339741
Saf etanol	Sigma-Aldrich-46139

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu

Blois (1958)'un DPPH yöntemi modifiye edilerek madde 1 ve madde 2'nin radikal süpürme kapasiteleri belirlendi.

DPPH, kahverengi şişeler içerisinde konsantrasyonu 400 µM olacak şekilde saf etanol ile çözdürüldü. Tamamen çözünmesi için DPPH ultrasonikatör içerisinde 30

dakika bekletildi. Madde 1 ve madde 2’de ilk hazırlandıklarında benzer şekilde saf etanol eklendi ve çözünene kadar ultrasonikatörde oda sıcaklığında sonikasyon uygulandı.

Standartlar (troloks ve askorbik asit) ise her deney için taze olarak hazırlandı. Askorbik asit saf su ile troloks (E vitamini analogu) ise etanol ile çözdürüldü. Tüm seyreltmeler saf etanol ile yapıldı. Madde 1 için 6,53-104,63 µM, madde 2 için 6,48-103,75 µM, troloks için 3,75-59,93 µM ve askorbik asit için 5,32-85,08 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Seyreltmelerde beş ayrı konsantrasyon oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör (blank) için üçer örnek hazırlandı. Her örnek için 900 µl madde (körler için etanol) ve 300 µl DPPH eklendi. Şişelerin kapakları kapatıldıktan sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV/VIS spektrofotometrede 517 nm’de referansa (1,2 ml etanol) karşı okundu. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. Tüm ölçümler üçer tekrar olarak gerçekleştirildi. Radikal yakalama aktivitesi (% RSA) “Eş.3.1”de belirtildiği gibi hesaplanarak troloks ve askorbik asit ile karşılaştırıldı.

$$\% \text{ RSA} = \frac{(\text{KörAbs} - \text{ÖrnekAbs})}{\text{KörAbs}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.2.2. ABTS (2,2-azino bis (3-etil benzothiazolin-6-sülfonik asit)) metodu

ABTS metodu Re’nin metodu (1999) modifiye edilerek kullanıldı. ABTS çözeltisi 2,45 mM potasyum persülfat ile 7 mM ABTS olacak şekilde saf su ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti, 12-16 saat kahverengi bir şişe içerisinde çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Madde 1, madde 2 ve troloks etanolde, askorbik asit ise saf suda çözüldü. Beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol kullanılarak seyreltmeler yapıldı.

Madde 1 için 16,34-261,56 µM, madde 2 için 16,2-256,36 µM, troloks için 1,24-19,98 µM ve askorbik asit için 1,76-28,38 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı. Deneyden önce ABTS stok

çözeltisinden 734 nm'de 0,700-0,710 absorbans olacak şekilde etanolle bir ara stok hazırlandı.

Daha sonra her örnek için 600 µl madde (körler için etanol) ve 600 µl seyreltilmiş ABTS eklendi. Şişelerin kapakları kapatıldıktan sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV/VIS spektrofotometrede 734 nm'de referansa (1,2 ml etanol) karşı okundu. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. Tüm ölçümler üçer tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Radikal yakalama aktivitesi (% RSA) "Eş.3.1"de belirtildiği gibi hesaplanarak troloks ve askorbik asitle karşılaştırıldı.

### 3.2.3. Galvinoxil metodu

Shi ve Niki (1998) galvinoxil metodu optimize edilerek uygulandı. Bu yöntemde 160 µM olacak şekilde galvinoxil solüsyonu etanol ile hazırlandı. Test edilen maddeler (madde 1 ve madde 2) ve troloks ve kuersetin saf etanolde çözüldü. Beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol ile seyreltmeler yapıldı.

Madde 1 için 16,35-261,56 µM, madde 2 için 16,21-259,37 µM, troloks için 0,25-2,8 µM ve kuersetin için 0,21-1,65 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı.

Her tüpe farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 1140 µl madde ve 60 µl galvinoxil çözeltisi eklendi. Tüpler 20 dakika karanlık ortamda inkübasyona alındı ve spektrofotometrede 428 nm'de referansa (1200 µl etanol) karşı okuma yapıldı. Kör için 1140 µl etanol ve 60 µl galvinoxil çözeltisi küvete eklenerek referansa karşı okuma yapıldı. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Standart olarak troloks ve kuersetin kullanıldı.

% Radikal yakalama aktivitesi "Eş.3.1"de belirtildiği gibi hesaplanarak örneklerin antioksidan potansiyelleri troloks ve kuersetin ile karşılaştırıldı.

### 3.2.4. Fosfomolibden metodu

Bu yöntemin temel prensibi antioksidan bileşikler tarafından Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesiyle asidik ortamda yeşil renkli fosfat Mo (V) bileşiğinin oluşmasıdır. Bu metot Prieto ve arkadaşlarının (1999) metodu modifiye edilerek uygulandı. Bu metot için gerekli ayraç solüsyon 4 mM amonyum molibdat, 28 mM sodyum fosfat ve 0,6 M sülfürik asit içerecek şekilde distile su (dH<sub>2</sub>O) ile hazırlandı.

Madde 1, madde 2 ve troloks etanolda, askorbik asit saf suda çözüldü. Beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol ile seyreltme yapıldı.

Madde 1 için 65,23-1046,1 µM, madde 2 için 35,64-570,57 µM, troloks için 124,85-1993,42 µM ve askorbik asit için 70,95-1135,42 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı.

Her bir ependorf tüpüne 1 ml ayraç solüsyon ve üzerine 0,1 ml farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiş madde eklenerek karıştırıldı.

Elde edilen reaksiyon solüsyonu 95 °C de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 20-25 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilip soğutulduktan sonra absorbansları spektrofotometrede 695 nm dalga boyunda kör tüpe karşı okundu. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Elde edilen değerler, standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit'in farklı konsantrasyonlarında hazırlanan standart eğrilerinden yararlanılarak askorbik asit eşdeğeri ve troloks eşdeğeri olarak ifade edildi.

### 3.2.5. FRAP (Demir iyonu indirgenme antioksidan kapasite) metodu

Benzie ve Strain (1996) metodu modifiye edilerek uygulandı.

Gerekli solüsyonlar;

- 0,3 M Asetat Tamponu (pH: 3,60)
- 0,01 M TPTZ Çözeltisi
- 0,02 M FeCl<sub>3</sub> Çözeltisi
- 0,04 M HCl Çözeltisi

TPTZ çözeltisi 0,04 M HCl ile FeCl<sub>3</sub> çözeltisi dH<sub>2</sub>O ile hazırlanır. Sırasıyla, asetat tamponu, TPTZ ve FeCl<sub>3</sub> çözeltisi 10:1:1 oranında karıştırıldı. 37 °C de 30 dakika inkübe edildi.

Madde 1, madde 2 ve troloks etanolde, askorbik asit saf suda çözüldü. Beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol ile seyreltme yapıldı.

Madde 1 için 13,08-209,28 µM, madde 2 için 12,96-207-51 µM, troloks için 6,03-96,87 µM ve askorbik asit için 5,31-85,17 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Seyreltmelerde beş ayrı konsantrasyon oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı. Her örnek için 1000 µl madde (kör için etanol) ve 500 µl FRAP solüsyonu eklendi. Daha sonra 4 dakika boyunca 37 °C sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV/VIS spektrofotometrede 593 nm'de kör tüpe karşı okundu. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Elde edilen değerler, standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit ile farklı konsantrasyonlarında hazırlanan standart eğrileri kullanılarak askorbik asit eşdeğeri ve troloks eşdeğeri olarak ifade edildi.

### 3.2.6. GST A1-1 izozimi spesifik aktivite tayini

#### Kullanılan kimyasallar

- 100 mM pH:7,0 Fosfat Tamponu
- 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM CDNB
- 1 mM GSH

Glutasyon S-transferaz- $\alpha$  enzim aktivitesi Habig ve arkadaşlarının (1974) 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak önerdiği metot, ELISA mikrolaka okuyucu sisteme modifiye edilerek kullanıldı. Enzim aktivitesi tiyoeter bağı oluşumunun spektrofotometrik yöntemlerle takip edilmesi esasına dayanır. Substrat olarak CDNB kullanıldığından dolayı absorbans ölçümleri 340 nm'de gerçekleştirildi.

Mikroplakada kullanılan her bir kuyucuk 100 mM (pH: 7,0) fosfat tampon, 1 mM GSH, CDNB (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM) ve test edilen maddelerin (madde 1 ve

madde 2) farklı konsantrasyonlarını (1, 10, 25, 50, 100, 250  $\mu\text{M}$ ) içerir. Ölçüm 340nm' de köre (madde yerine etanol kullanıldı) karşı okundu.

Enzim aktivitesi "Eş.3.2"de belirtildiği gibi formül kullanılarak absorbans değerlerinden (340 nm) hesaplandı.

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{dA/dt}{\varepsilon \text{ (mM}^{-1}\text{)}} \times SF \times \frac{1}{\text{mg protein/ml}} \quad (3.2)$$

Bu formülde;

$dA/dt$  birim zamanda (dakika) absorbanstaki değişimi (mOD),  $\varepsilon$  ekstinksiyon sabitini (CDNB  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ve SF seyreltme faktörünü simgelemektedir.

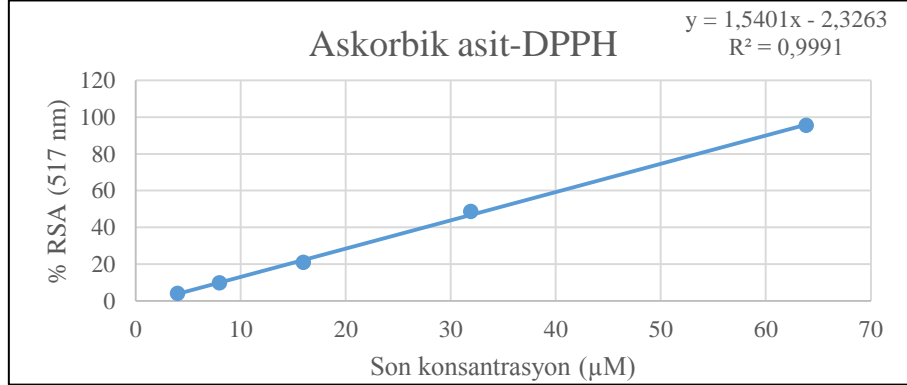


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

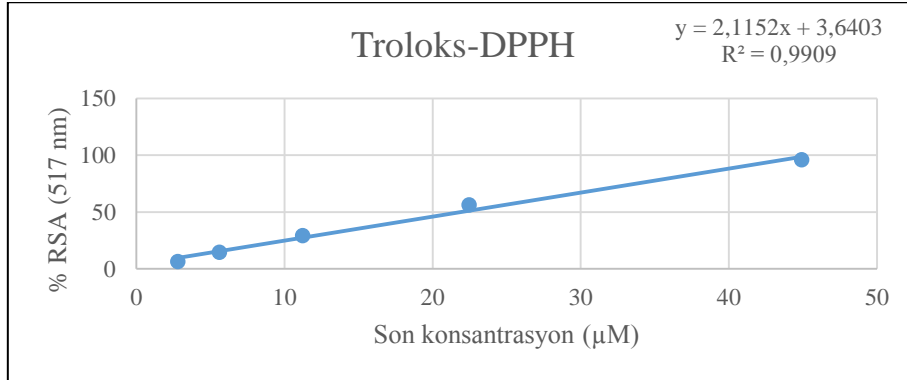
### 4.1. DPPH Metodu Sonuçları

DPPH• radikali uzun ömürlü bir azot radikalidir ve antioksidanların radikal giderilmesindeki rollerinin belirlenmesinde en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir. DPPH• radikalinin indirgenmeden önceki başlangıçtaki rengi mordur. Antioksidan maddeler tarafından DPPH• radikali DPPH-H formuna indirgendiğinde mor renkten sarı renge doğru bir renk değişimi olur. DPPH• radikali en yüksek absorbands değerini 517 nm’de verdiği için renk değişimi spektrofotometrede 517 nm’de ölçülür (Özenç, 2011 ). Antioksidan maddenin radikal süpürme aktivitesi % RSA olarak ifade edilir.

Bu metotta, antioksidan madde arttıkça süpürülen radikal miktarının artmasına dolayısıyla % RSA’nın artması prensibine dayanmaktadır. Bu durum aşağıdaki askorbik asit ve troloks grafiklerinde (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) görülmektedir.



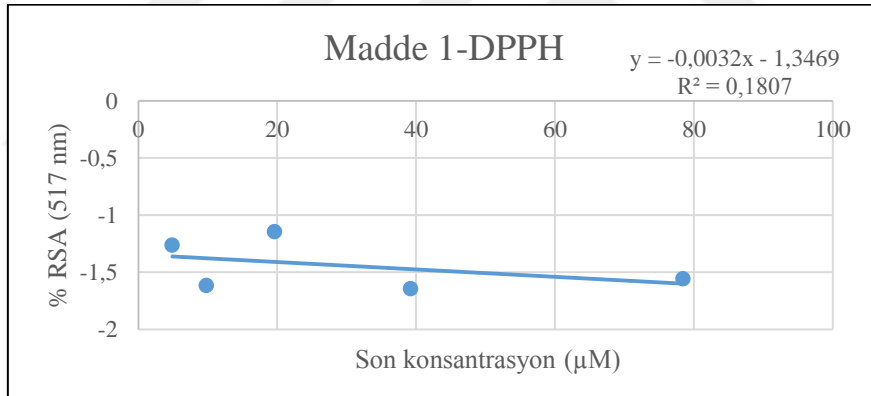
Şekil 4.1. DPPH metodunda askorbik asit'in 517 nm'deki standart eğrisi.



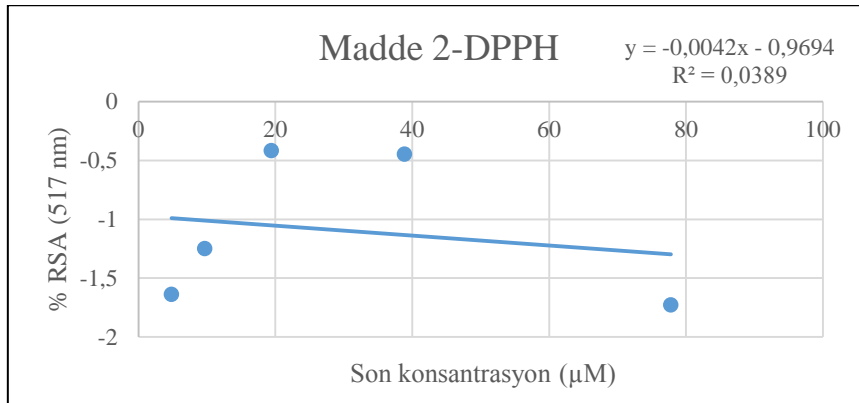
Şekil 4.2. DPPH metodunda troloks'un 517 nm'deki standart eğrisi.

Antioksidan maddenin radikal süpürme aktivitesi belirtilirken ortamda bulunan radikalın % 50'sini süpüren antioksidan miktarını ifade eden  $EC_{50}$  değeri kullanılır.  $EC_{50}$  değerinin düşük olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir. Standart olarak kullanılan askorbik asit ve troloks'un  $EC_{50}$  değerleri grafiklerden (Şekil 4.1, Şekil 4.2) sırasıyla  $33,98 \mu\text{M}$  ve  $21,9 \mu\text{M}$  olarak bulundu.

Test edilen her iki 2,3-Diaril-Benzotiyofen türevide (madde 1 ve madde 2) DPPH radikali ile etkileşmediğinden dolayı DPPH metodu ile yapılan deneyler sonucunda herhangi bir sonuç tespit edilemedi (Şekil 4.3 ve Şekil4.4). Madde 1 için maksimum  $78,47 \mu\text{M}$  ve madde 2 için maksimum  $77,81 \mu\text{M}$  konsantrasyona kadar deneyler yapılmasına karşın DPPH radikalının renginde herhangi bir anlamlı değişim tespit edilemediğinden, bu yöntemle 2,3-diaril benzotiyofen türevlerinin antioksidan kapasiteleri tespit edilemedi.



Şekil 4.3. DPPH metodunda madde 1'in 517 nm'deki % RSA grafiği.



Şekil 4.4. DPPH metodunda madde 2'nin 517 nm'deki % RSA grafiği.

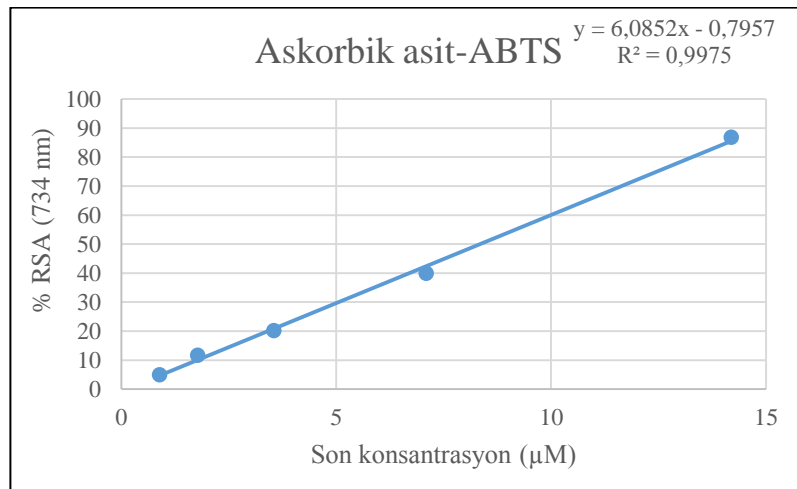
DPPH• radikali hidrojen donörlerine karşı seçicidir. Örneğin, benzen halkasında tek hidroksil grubu bulunduran aromatik asitler ile ve hiç hidroksil grubu bulundurmeyen flavonoidlerle tepkimeye girmemektedir (Selçuk, 2012). Bu tez çalışmasında kullanılan her iki 2,3-Diaril-Benzotiyofen türevide (madde 1 ve madde 2) hidroksil grubuna sahip değildir (Bkz. Şekil 1.3).

DPPH metodunda sonuç alınmamasının en olası nedenlerinden başında test edilen her iki benzotiyofen türevinde hidroksil grubuna sahip olmamaları olduğu düşünülmektedir.

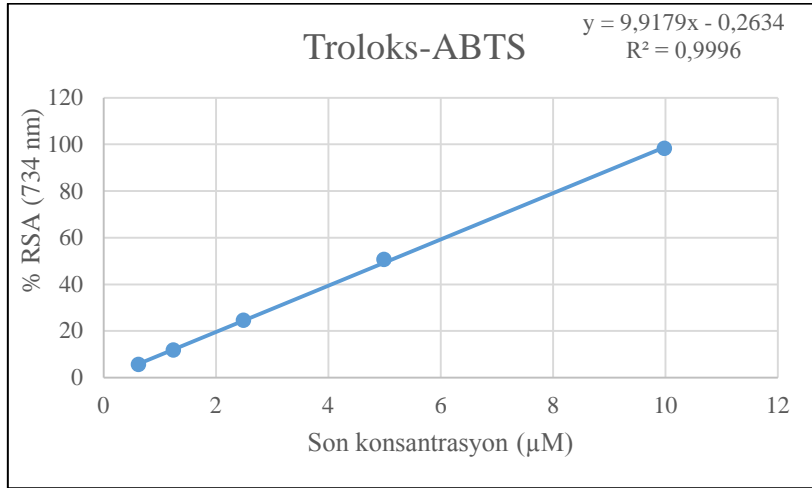
#### 4.2. ABTS Metodu Sonuçları

Bu metotta öncelikle ABTS'nin oksitlenip radikal katyonu (ABTS<sup>•+</sup>) formuna getirilmesi gerekmektedir. ABTS yapısında bulundurduğu azot atomu enzimatik ya da kimyasal yolla radikalik forma çevrilebilir. Bu çalışmada ABTS'nin oksitlenmesinde potasyum persülfat kullanıldı. ABTS<sup>•+</sup> mavi/yeşil renktedir ve antioksidan maddelerle tepkimeye girdiğinde bu renk açılır. Spektrofotometre ile 734 nm'de renk değişimine bakılarak radikal süpürme aktivitesi belirlenmektedir.

Bu metot ortamda antioksidan madde arttıkça süpürülen radikal miktarının artması prensibine dayanmaktadır. Bu durum aşağıda askorbik asit (Şekil 4.5) grafiği ve troluks grafiğinde (Şekil 4.6) açıkça görülmektedir.



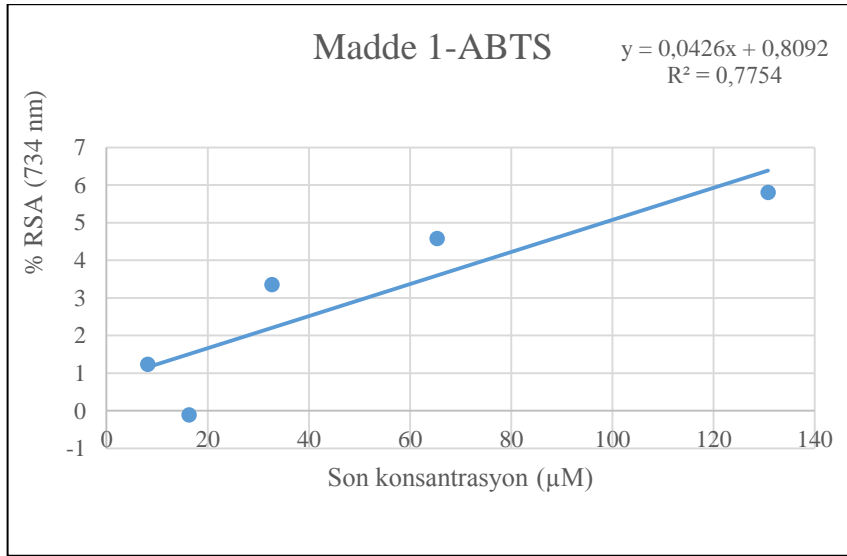
Şekil 4.5. ABTS metodunda askorbik asit'in 734 nm'deki standart eğrisi.



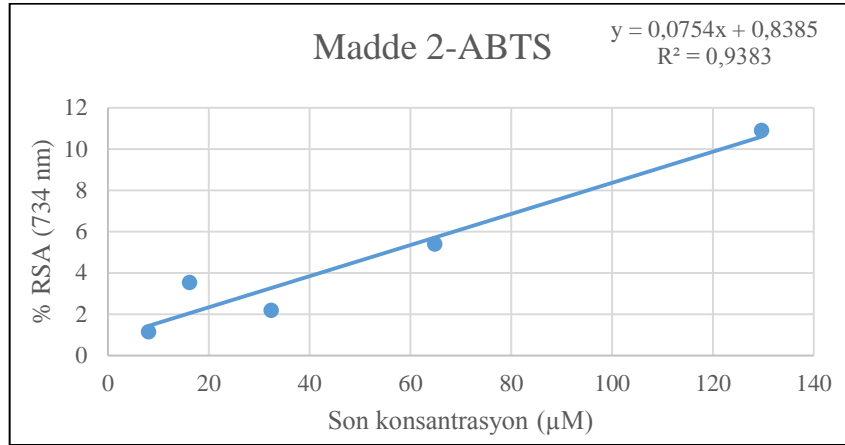
Şekil 4.5. ABTS metodunda troloks'un 734 nm'deki standart eğrisi.

EC<sub>50</sub> değeri antioksidan maddenin etkinliğini hesaplamada kullanılmaktadır. EC<sub>50</sub> değerinin düşük olması antioksidan maddenin etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Standart olarak kullanılan askorbik asit ve troloks'un EC<sub>50</sub> değerleri grafiklerden (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) hesaplandı. Sırasıyla EC<sub>50</sub> değerleri 8,35 µM ve 5,02 µM olarak belirlendi.

Madde 1 ve madde 2 maddeleri'nin ABTS metodunda % RSA değerleri (Şekil 4.7, 4.8) % 50'den az olduğu için troloks ve askorbik asit standartlarında olduğu gibi EC<sub>50</sub> değerleri hesaplanamadı.



Şekil 4.6. ABTS metodunda madde 1'in 734 nm'deki % RSA grafiği.



Şekil 4.7. ABTS metodunda madde 2'nin 734 nm'deki % RSA grafiği.

Madde 2'nin inhibisyon değeri, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de ve Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi madde 1'in % RSA değerinden daha yüksek bulundu.

Çizelge 4.1'de ABTS metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin % RSA değerleri ile kullanılan en yüksek madde konsantrasyonunun denk geldiği askorbik asit ve troloks standartlarının konsantrasyonları görülmektedir. Madde 1'in 130,78 µM konsantrasyonu 1,08 µM askorbik asite ve 0,61 µM troloks konsantrasyonuna ve madde 2'nin 129,68 µM konsantrasyonu 1,91 µM askorbik asite ve 1,12 µM troloks konsantrasyonuna denk geldiği hesaplandı.

Çizelge 4.1. ABTS metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin % RSA değerleri ve bu maddelerin troloks ile askorbik asit standartlarıyla karşılaştırılması

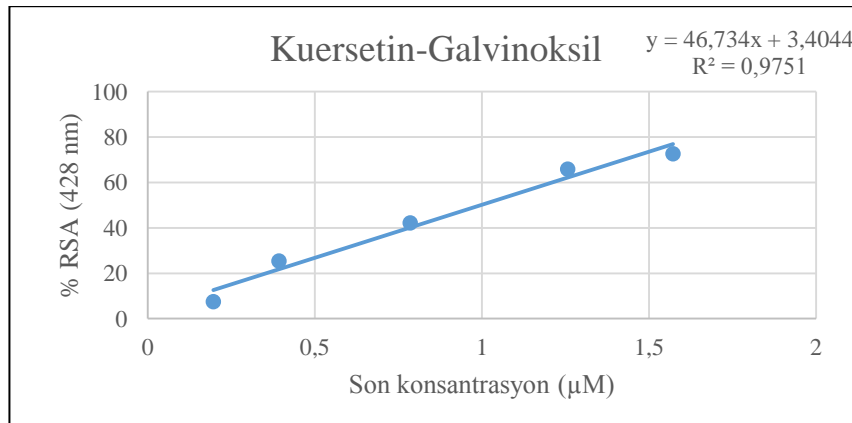
Konsantrasyon (µM)		% RSA değerleri		Kullanılan en yüksek madde konsantrasyonuna denk gelen standart madde konsantrasyonu	
Madde 1	Madde 2	Madde 1	Madde 2	Madde 1	Madde 2
8,17	8,10	1,23	1,14	1,08*	1,91*
16,35	16,21	-0,11	3,53		
32,69	32,42	3,35	2,18		
65,39	64,84	4,58	5,39	0,61**	1,12**
130,78	129,68	5,80	10,89		
Madde 1	3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol				
Madde 2	3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol				
(*)	Askorbik asit karşılığı (µg/ml)				
(**)	Troloks karşılığı (µg/ml)				

ABTS metodunda kullanılan her iki standart maddeninde (troloks ve askorbik asit) yapısında hidroksil grubu vardır. Ancak test edilen maddelerin yapısında (Bkz. Şekil 1.3) böyle bir grup yoktur. Hidroksil grubu hidrojen transferinin daha kolay olmasını sağlar ve ABTS metodu da hidrojen transferine dayalı bir antioksidan kapasite metodudur. Test edilen maddelerin (madde 1 ve madde 2) inhibisyon değerlerinin düşük olması hidroksil grubu gibi hidrojen vermeye yatkın bir grubun olmamasından kaynaklanabilir. Madde 2'nin yapısında madde 1'deki brom yerine bir tiyofen halkası bağlıdır (Bkz. Şekil 1.3). Bu durum madde 2'nin inhibisyon değerinin madde 1'den fazla olmasını sağlamış olabilir.

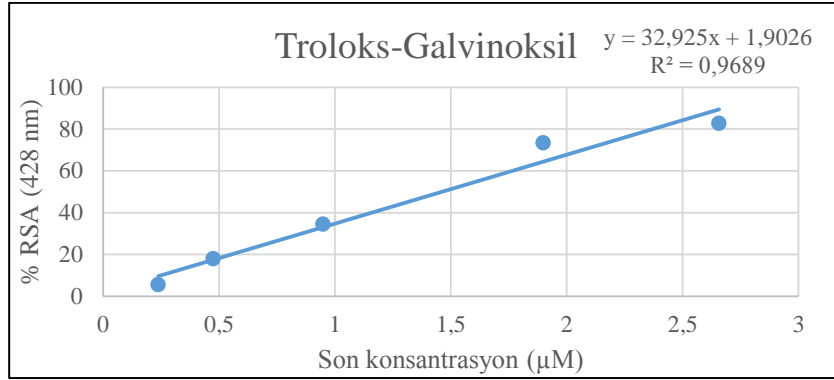
### 4.3. Galvinoksil Metodu Sonuçları

Galvinoksil radikali ferromanyetik bir radikaldir. 428 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon değerine sahiptir. Bu radikal hidrojen veren antioksidan maddelerle indirgenebilir. Temelde bir galvinoksil radikali bir hidroksil grubu ile tepkimeye girerek indirgenmektedir (Selçuk, 2012). Galvinoksil radikali sarımsı bir renktedir. Antioksidan maddenin etkisi ile bu radikal indirgendiğinde sarı renkte bir açılma meydana gelmektedir. Renk değişiminin spektrofotometre ile ölçülmesiyle antioksidan maddenin radikal süpürme aktivitesi hesaplanır.

Bu metot ortamda antioksidan madde arttıkça süpürülen radikal miktarının artması prensibine dolayısıyla % RSA'nın artmasına dayanır. Bu durum aşağıda kuersetin (Şekil 4.9) grafiği ve troloks grafiğinde (Şekil 4.10) açıkça görülmektedir.

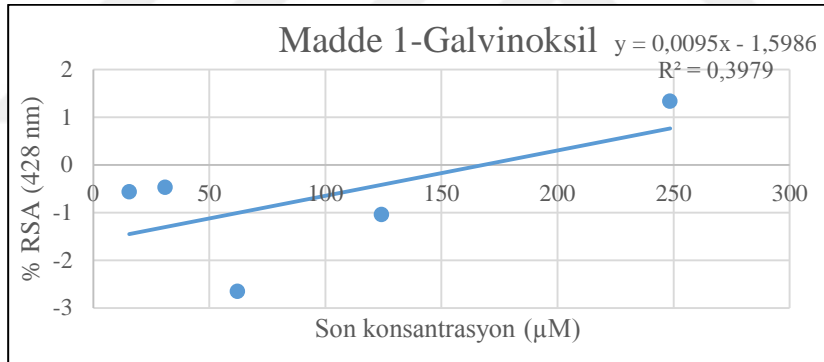


Şekil 4.8. ABTS metodunda kuersetin'in 734 nm'deki standart eğrisi.

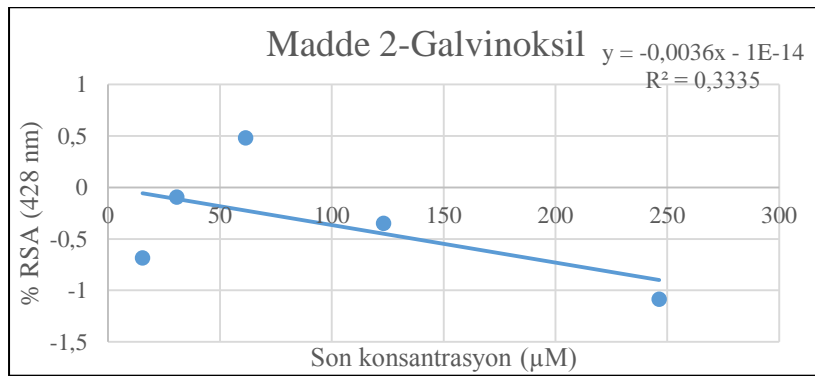


Şekil 4.9. Galvinoksil metodunda troloks'un 428 nm'deki standart eğrisi.

Galvinoksil metodunda standart madde olarak kullanılan kuersetin ve troloks'un  $EC_{50}$  değerleri kuersetin için Şekil 4.9'daki grafik ve troloks için Şekil 4.10'daki grafik denkleminde "y" yerine 50 yazılarak hesaplandı.  $EC_{50}$  değerleri kuersetin için 1 µM ve troloks için 1,46 µM olarak hesaplandı.



Şekil 4.10. Galvinoksil metodunda madde 1'in 428 nm'deki % RSA grafiği.

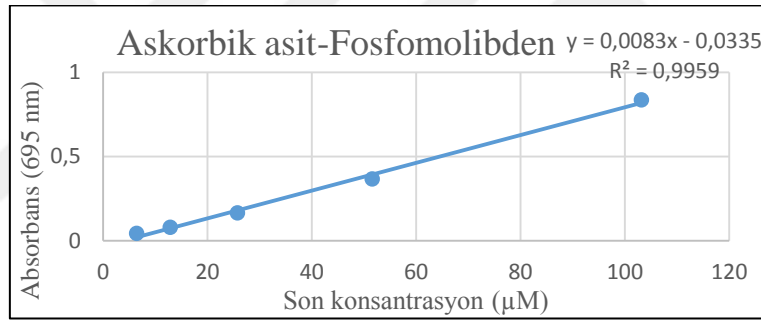


Şekil 4.11. Galvinoksil metodunda madde 2'in 428 nm'deki % RSA grafiği.

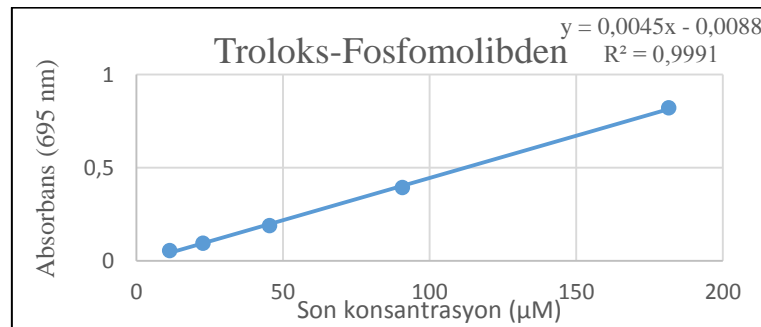
Test edilen 2,3-Diaril-Benzotiyofen türevlerinden madde 1 için 248,48  $\mu\text{M}$  ve madde 2 için 246,40  $\mu\text{M}$  konsantrasyona kadar deneyler yapılmasına karşın bir renk değişimi gözlenemedi. Dolayısıyla galvinoksil radikali her iki maddenin, ne benzen halkasındaki ne de tiyol halkasındaki hidrojenleri ile etkileşime girip bu yapılardan hidrojen alamadığından galvinoksil metoduyla antioksidan kapasite tespit edilemedi.

#### 4.4. Fosfomolibden Metodu Sonuçları

Fosfomolibden metodu antioksidan maddenin etkisiyle Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenerek yeşil bir rengin oluşmasına ve oluşan bu rengin 695 nm'de ölçülmesi prensibine dayanır. Şekil 4.13'te kullanılan askorbik asit standardının grafiği ve Şekil 4.14'te de kullanılan troloks standardının grafiği görülmektedir.



Şekil 4.12. Fosfomolibden metodunda askorbik asit'in 695 nm'deki standart eğrisi.

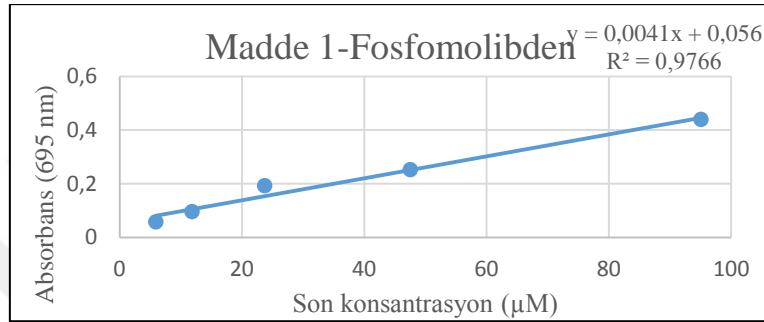


Şekil 4.13. Fosfomolibden metodunda troloks'un 695 nm'deki standart eğrisi.

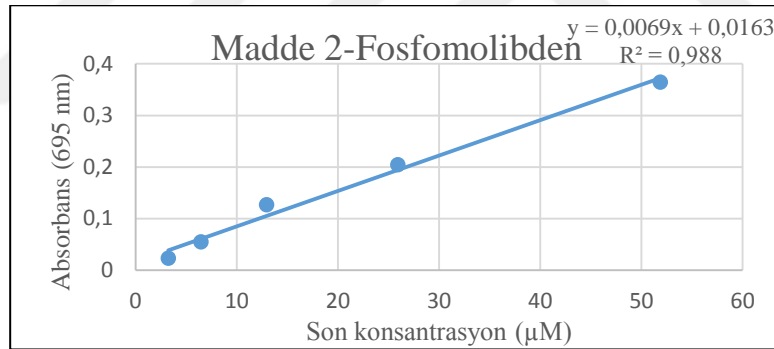
Fosfomolibden metodunda madde 1 ve madde 2'nin grafiği sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmektedir. Grafiklerde de görüldüğü gibi her iki madde de lineer bir artış göstermiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi madde 2'nin aktivitesi madde 1'in



aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur. Her iki maddenin askorbik asit ve troloks karşılıklarını hesaplamak için standartların grafik denklemlerinde 'y' yerine maddelerin absorbans değerleri yazıldı. Hesaplama sonucunda; madde 1'in 45 µM konsantrasyonu 33,01 µM askorbik asit'e ve 55,4 µM troloks'a denk geldiği ve madde 2'nin 25 µM konsantrasyonu 26,78 µM askorbik asit'e ve 43,91 µM troloks'a denk geldiği hesaplandı.



Şekil 4.14. Fosfomolibden metodunda madde 1'in 695 nm'deki grafiği.



Şekil 4.15. Fosfomolibden metodunda madde 2'nin 695 nm'deki grafiği.

Çizelge 4.2'de fosfomolibden metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin (madde 1 ve 2) askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması ve en yüksek konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri verilmiştir. Madde 1'in 91,10 µM konsantrasyonu 99,51 µM troloks'a ve 56,93 µM askorbik asit'e ve madde 2'nin 51,87 µM konsantrasyonu 82,84 µM troloks'a ve 47,89 µM askorbik asit'e denk geldiği hesaplanmıştır. Standart maddeler test maddeleriyle oranlandığında troloks madde 1'in 0,91 katı ile madde 2'nin 0,63 katına ve askorbik asit ise madde 1'in 1,6 katı ile madde 2'nin 1,08 katına denk geldiği bulunmuştur. Bu değerlere bakıldığında her iki maddenin

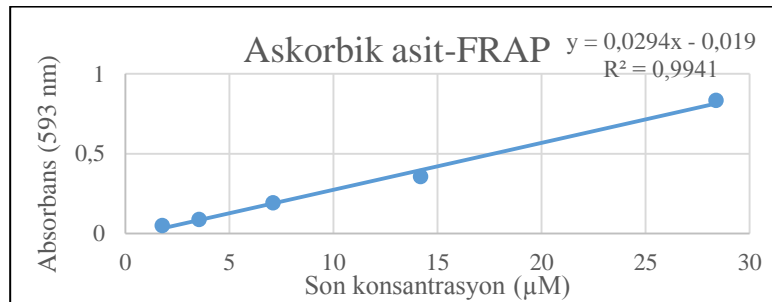
de fosfomolibden metodunda oldukça yüksek radikal indirgeme kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, çizelge 4.2’de madde 2’nin madde 1’den daha fazla radikal indirgeme kabiliyeti olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Fosfomolibden metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin askorbik asit ve trolox standartlarıyla karşılaştırılması

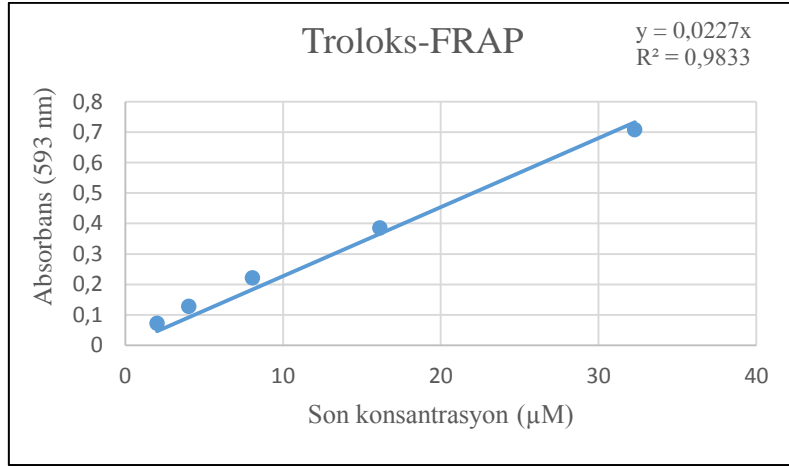
	İlk konsantrasyon.* ( $\mu\text{M}$ )	Son konsantrasyon.** ( $\mu\text{M}$ )	ABS değeri	Trolox eşdeğeri † ( $\mu\text{M}$ )	Oran‡	Askorbik asit eşdeğeri- ( $\mu\text{M}$ )	Oran--
Madde 1	1002,1	91,10	0,439	99,51	0,91	56,93	1,6
Madde 2	570,57	51,87	0,364	82,84	0,63	47,89	1,08
Madde 1	3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol						
Madde 2	3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol						
(*)	Tepkime ortamına eklenen test bileşiği konsantrasyonu						
(**)	Reaksiyon ortamında test edilen bileşiğin son konsantrasyonu						
(†)	Ortalama abs / Standart eğrinin eğimi						
(‡)	Son konsantrasyon / Trolox eşdeğeri						
(-)	Ortalama abs / Standart eğrinin eğimi						
(--)	Son konsantrasyon / Askorbik asit eşdeğeri						

#### 4.5. FRAP Metodu Sonuçları

FRAP metodu antioksidan maddenin etkisiyle düşük pH'ta, bir ferrik-tri-piridridiazin ( $\text{FeIII-TPTZ}$ ) kompleksi, demir ( $\text{FeII}$ ) formuna indirgenmesiyle mavi bir rengin oluşmasına ve oluşan bu rengin 593 nm’de ölçülmesi prensibine dayanır. Şekil 4.17’te kullanılan askorbik asit standardının grafiği ve Şekil 4.18’te de kullanılan trolox standardının grafiği görülmektedir.



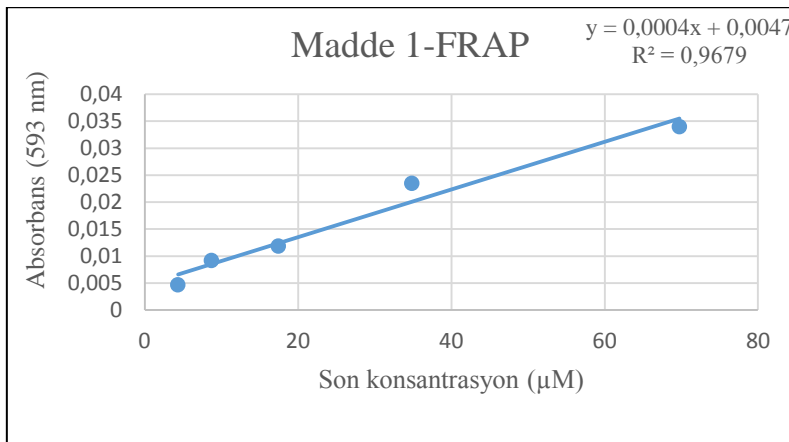
Şekil 4.16. FRAP metodunda askorbik asit’in 593 nm’deki standart eğrisi.



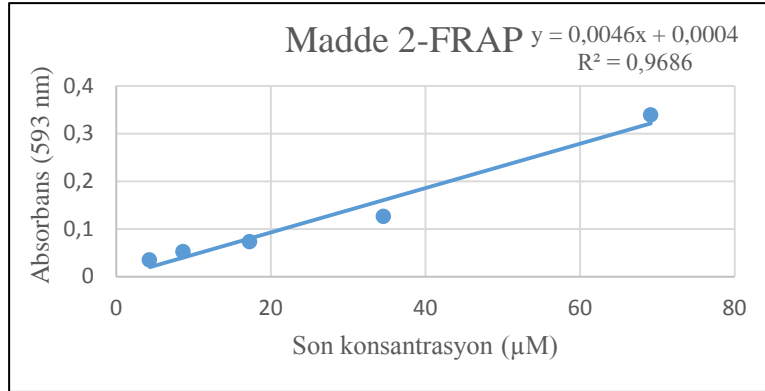
Şekil 4.17. FRAP metodunda troloks' un 593 nm'deki standart eğrisi.

FRAP metodunda, madde 1'in ve madde 2'nin grafiği sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmektedir. Grafiklerde de görüldüğü gibi her iki madde de lineer bir artış göstermiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi madde 2'nin aktivitesi madde 1'in aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur.

Her iki maddenin askorbik asit ve troloks karşılıklarını hesaplamak için standartların grafik denklemlerinde 'y' yerine maddelerin absorbans değerleri yazıldı. Hesaplama sonucunda; madde 1'in 35 µM konsantrasyonu 1,28 µM askorbik asit'e ve 0,82 µM troloks'a denk geldiği ve madde 2'nin 35 µM konsantrasyonu 6,14 µM askorbik asit'e ve 7,11 µM troloks'a denk geldiği hesaplandı.



Şekil 4.18. FRAP metodunda madde 1'in 593 nm'deki grafiği.



Şekil 4.19. FRAP metodunda madde 2'nin 593 nm'deki grafiği.

Çizelge 4.3'te FRAP metodu ile test edilen 2,3-Diaril-Benzotiyofen türevleri'nin (madde 1 ve 2) askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması ve en yüksek absorbans değerleri verilmiştir. Madde 1'in 69,76 µM konsantrasyonu 1,5 µM troloks'a ve 1,8 µM askorbik asit'e karşılık gelirken madde 2'nin 69,17 µM konsantrasyonu 14,93 µM troloks'a ve 12,18 µM askorbik asit'e denk geldiği hesaplanmıştır. Sonuçlara bakıldığında her iki maddeninde indirgeme özelliği olduğu ancak madde 2'nin aktivitesinin madde 1'den daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. FRAP metodunda kullanılan benzotiyofen türevlerinin askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması

	İlk konsantrasyon.* (µM)	Son konsantrasyon.** (µM)	ABS değeri	Troloks eşdeğeri † (µM)	Oran‡	Askorbik asit eşdeğeri - (µM)	Oran--
Madde 1	209,28	69,76	0,034	1,5	46,51	1,8	38,75
Madde 2	207,51	69,17	0,339	14,93	4,63	12,18	5,68

Madde 1 3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol

Madde 2 3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol

(\*) Tepkime ortamına eklenen test bileşiği konsantrasyonu

(\*\*) Reaksiyon ortamında test edilen bileşiğin son konsantrasyonu

(†) Ortalama abs / Standart eğrinin eğimi

(‡) Son konsantrasyon / Troloks eşdeğeri

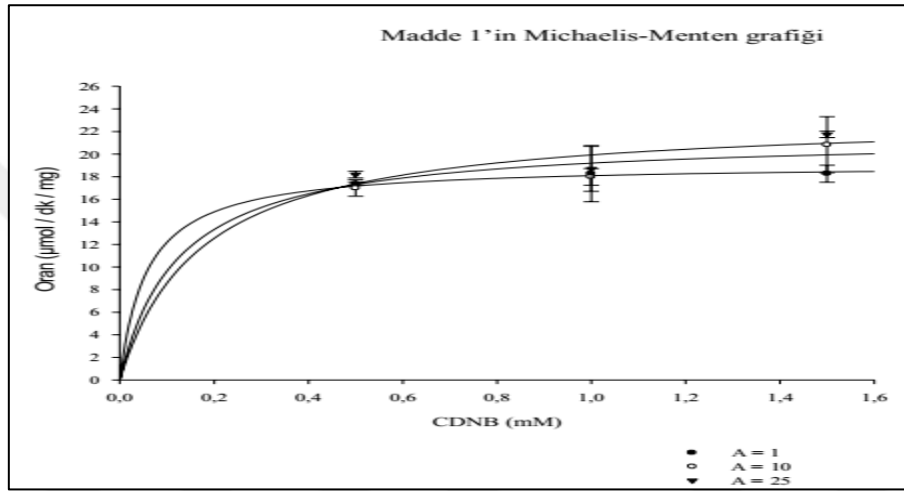
(-) Ortalama abs / Standart eğrinin eğimi

(--) Son konsantrasyon / Askorbik asit eşdeğeri

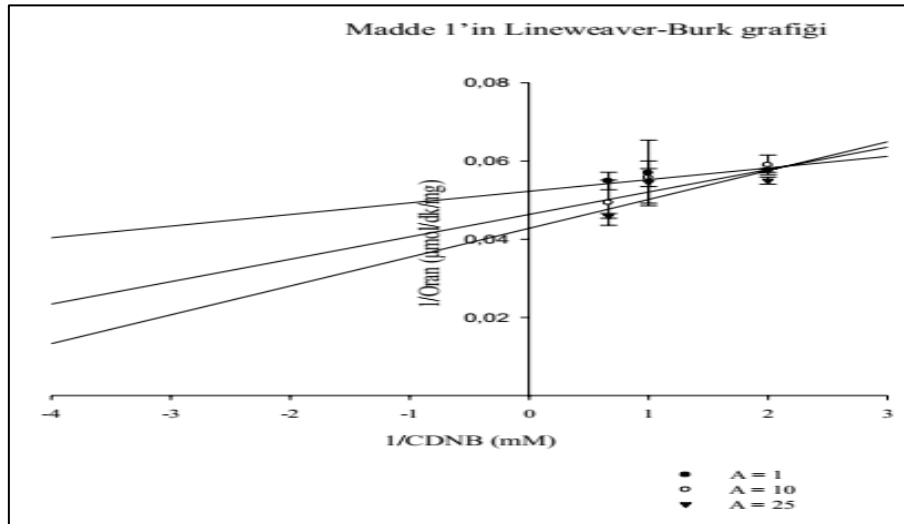
## 4.6. GST A1-1 İzozimi Spesifik Aktivite Tayini Sonuçları

### 4.6.1. GST A1-1 izoziminin aktivasyon sonuçları

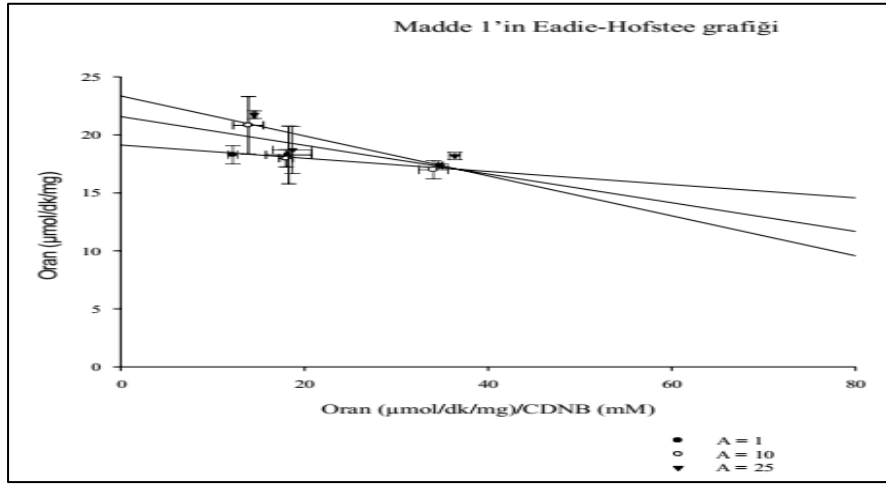
Madde 1 ve madde 2'nin GST A1-1 izozimiyle yapılan çalışmalarda madde 1'in 1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda, madde 2'nin ise 1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda test edilen enzim üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği SigmaPlot yazılımıyla tespit edildi.



Şekil 4.20. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.21. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.

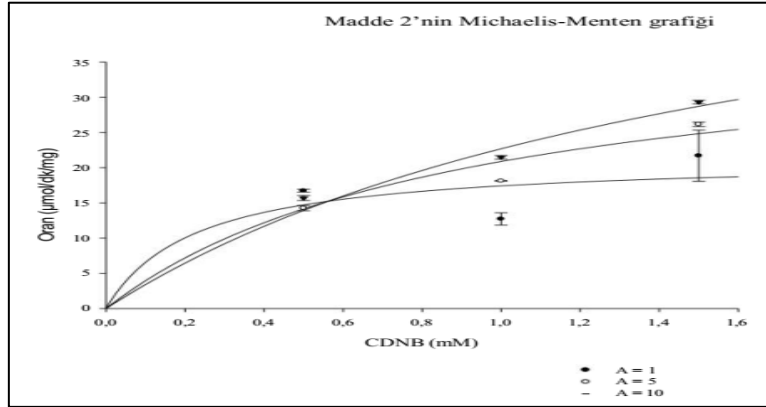


Şekil 4.22. Madde 1'in aktivasyon etki tipi için (1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği.

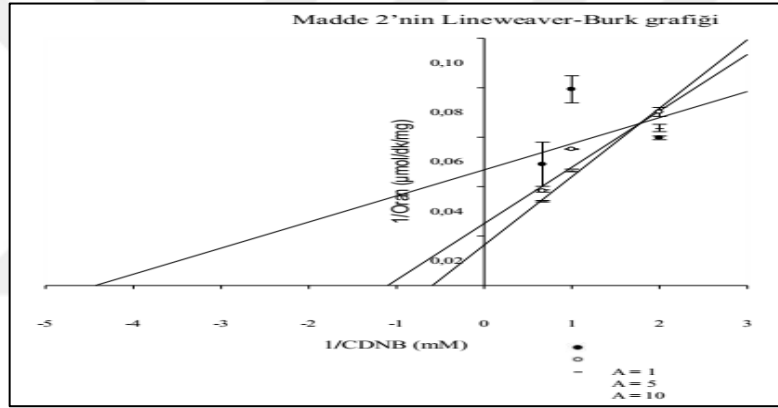
Çizelge 4.4'te verildiği gibi bu analizlerde üç farklı CDNB substrat konsantrasyonu (0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM) kullanılmış ve her CDNB konsantrasyonu için 1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında madde 1 kullanılmıştır. Madde 1 için test edilen bu konsantrasyonlarda  $V_{\text{max}}$  değeri ise 18,7  $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein iken,  $K_m$  ve  $K_a$  değerleri sırasıyla, 0,04518  $\mu\text{M}$  ve 3  $\mu\text{M}$  olarak SigmaPlot yazılımı ile tespit edilmiştir. Test edilen madde 1 konsantrasyonlarında (1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$ ) madde1'in GST A1-1 izozimine üzerine aktivasyon etki gösterdiği ve bu aktivasyon etki tipinin “zorunlu olmayan aktivasyon” olduğu yine SigmaPlot yazılımı yardımıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Madde 1'in 1, 10 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim Aktivasyon Kinetiği Sonuçları

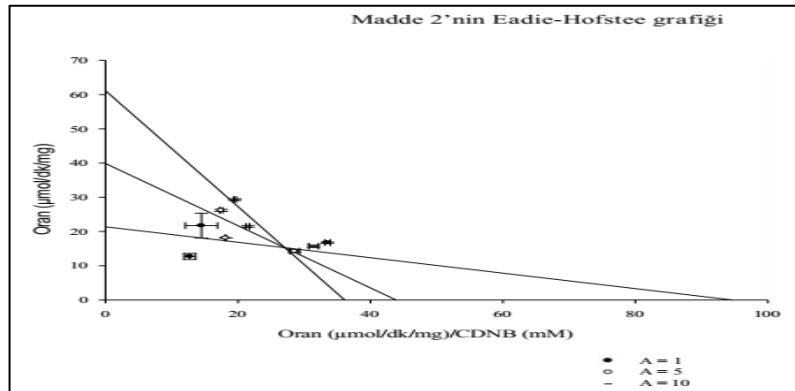
CDNB (mM)	Madde 1'in konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Ortalama spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Etki tipi	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_a$ ( $\mu\text{M}$ )
0,5	1	17,376	Zorunlu olmayan aktivasyon	18,7	0,04518	3
	10	17,00				
	25	18,193				
1	1	18,276				
	10	17,988				
	25	18,699				
1,5	1	18,272				
	10	20,833				
	25	21,758				



Şekil 4.23. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.24. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4. 25. Madde 2'nin aktivasyon etki tipi için (1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği.

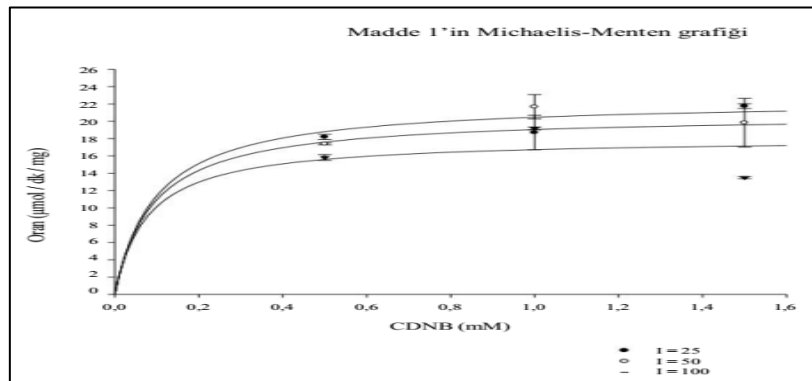
Çizelge 4.5'te verildiği gibi üç farklı CDNB konsantrasyonu (0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM) kullanılmış ve her CDNB konsantrasyonu için 1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda madde 2 kullanılmıştır. Madde 2'nin  $V_{\text{max}}$  değeri 16,5  $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein iken,  $K_m$  ve  $K_a$  değerleri sırasıyla, 0,0459  $\mu\text{M}$  ve 0,252  $\mu\text{M}$  olarak SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir. Test edilen madde 2'nin 1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ise madde 2'in GST A1-1 izozimine üzerine aktivasyon etki gösterdiği bu etki tipinin ise “zorunlu olmayan aktivasyon” olduğu yine SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Madde 2'nin 1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim Aktivasyon Kinetiği Sonuçları

CDNB (mM)	Madde 2'nin konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Ortalama spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Etki tipi	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_a$ ( $\mu\text{M}$ )
0,5	1	16,7433	Zorunlu olmayan aktivasyon	16,5	0,0459	0,252
	5	14,2630				
	10	15,7030				
1	1	12,7203				
	5	18,1250				
	10	21,4823				
1,5	1	21,7110				
	5	26,1587				
	10	29,3187				

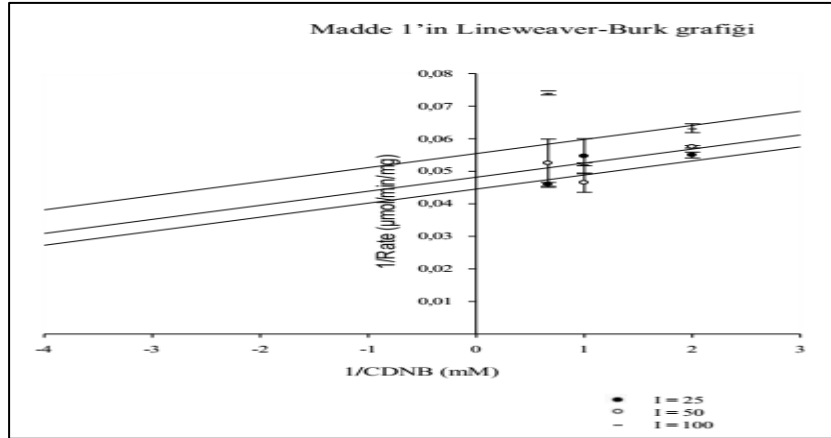
#### 4.6.2. GST A1-1 izoziminin inhibisyon sonuçları

Madde 1 ve madde 2'nin GST A1-1 izozimiyle yapılan enzim kinetiği çalışmalarında madde 1'in 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında, madde 2'nin ise 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında test edilen GST A1-1 izoenzimi üzerinde inhibisyon etki gösterdiği SigmaPlot yazılımı yardımıyla tespit edilmiştir.

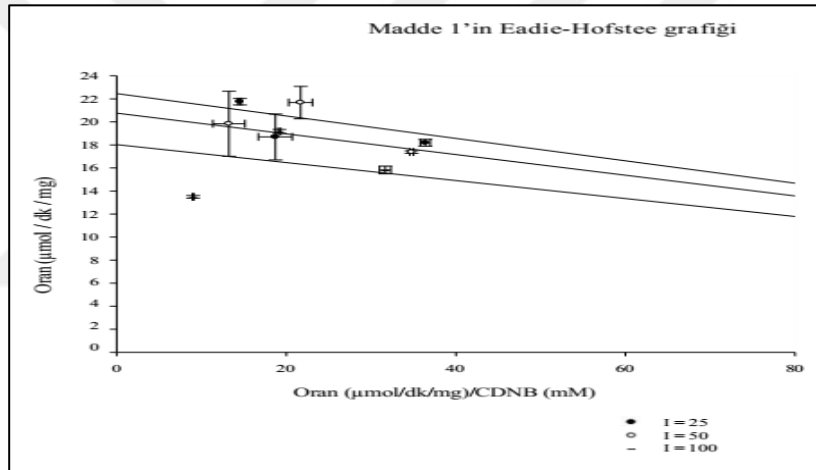


Şekil 4.26. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.





Şekil 4.27. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.

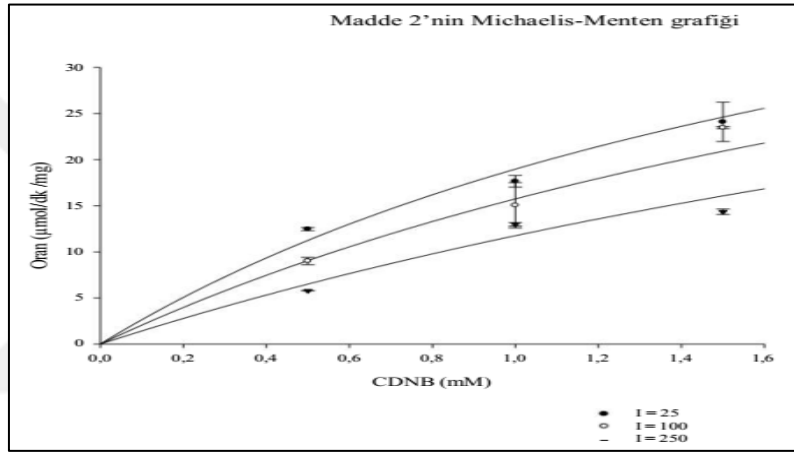


Şekil 4.28. Madde 1'in inhibisyon etki tipi için (25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği.

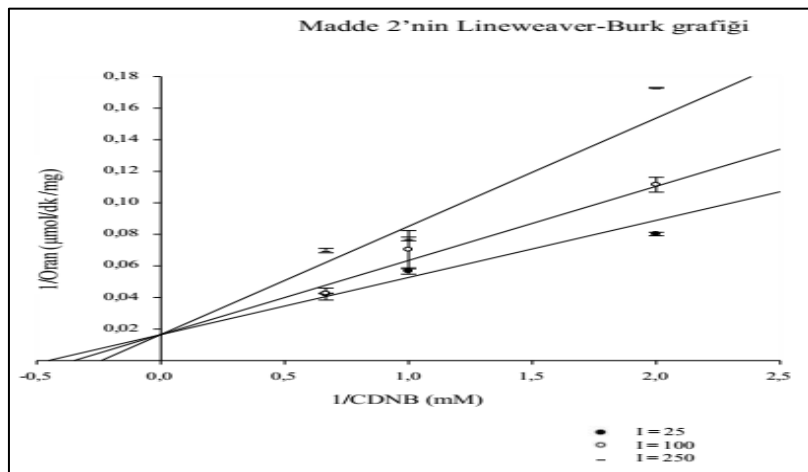
Çizelge 4.6'da verildiği gibi bu analizlerde de yine üç farklı CDNB konsantrasyonu (0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM) kullanılmış ve her CDNB konsantrasyonu için 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında madde 1 kullanılmıştır. Madde 1'in  $V_{max}$  değeri ise 24,5 µmol/dk/mg protein iken,  $K_m$  ve  $K_i$  değerleri ise sırasıyla 0,1058 µM ve 280,8 µM olarak SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir. Test edilen 25, 50 ve 100 µM madde 1 konsantrasyonlarında, madde 1'in GST A1-1 izozimine üzerine inhibisyon etki gösterdiği bu etki tipinin ise “yarışmalı (tam) inhibisyon” olduğu yine SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Madde 1'in 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim İnhibisyon Kinetiği Sonuçları

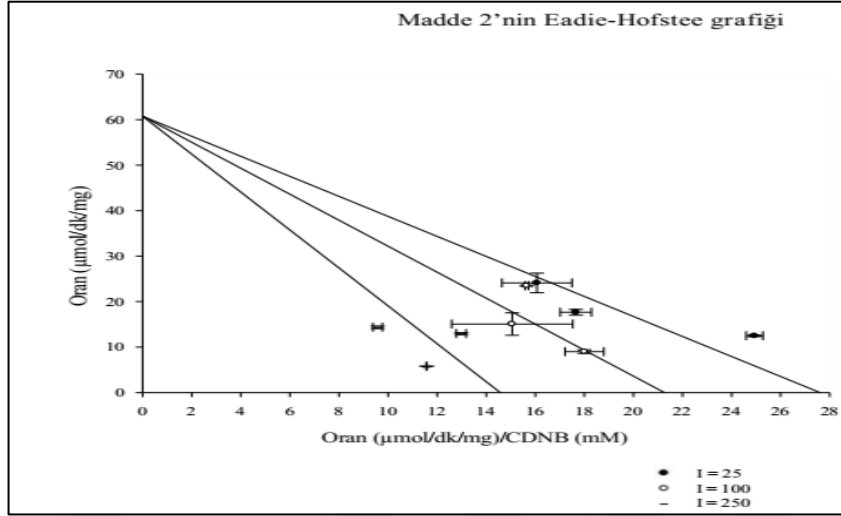
CDNB (mM)	Madde 1'in konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Ortalama spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ )	Etki tipi	Vmax ( $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ )	Km ( $\mu\text{M}$ )	Ki ( $\mu\text{M}$ )
0,5	25	18,1937	Yarışmalı (tam) inhibisyon	24,5	0,1058	280,8
	50	17,3863				
	100	15,8277				
1	25	18,6990				
	50	21,6767				
	100	19,1763				
1,5	25	21,7580				
	50	19,8393				
	100	13,5003				



Şekil 4.29. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.30. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.31. Madde 2'nin inhibisyon etki tipi için (25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda) Eadie-Hofstee grafiği.

Çizelge 4.7'de verildiği gibi üç farklı CDNB substratı konsantrasyonunda (0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM) kullanılmış ve her CDNB substratı konsantrasyonu için 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda madde 2 uygulanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda madde 2'nin  $V_{\text{max}}$  değeri 60,7  $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein iken,  $K_m$  ve  $K_i$  değerleri sırasıyla, 2  $\mu\text{M}$  ve 226,7  $\mu\text{M}$  olarak SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir. Test edilen madde 2 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında, madde 2'nin GST A1-1 izozimine üzerine inhibisyon etki gösterdiği bu etki tipinin ise “bağımlı inhibisyon” olarak SigmaPlot yazılımıyla tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Madde 2'in 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda GST A1-1 izozimi üzerine Enzim İnhibisyon Kinetiği Sonuçları

CDN B (mM)	Madde 2'nin konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Ortalama spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Etki tipi	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
0,5	25	12,4690	Bağımlı inhibisyon	60,7	2	226,7
	100	9,0030				
	250	5,7853				
1	25	17,6573				
	100	15,0577				
	250	12,9793				
1,5	25	24,1037				
	100	23,4800				
	250	14,3573				

#### 4.7. Tartışma ve Deney Sonuçlarının Karşılaştırılması

Madde 1 ve madde 2 olarak adlandırılan 2,3-Diaril-benzotiyofen türevlerinin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla bu çalışmada beş farklı antioksidan kapasite yöntemi (DPPH, ABTS, Galvinoxil, Fosfomolibden ve FRAP) kullanıldı. Ayrıca, standart madde olarak troloks, kuersetin ve askorbik asit kullanıldı. Çizelge 4.8’de madde 1 ve madde 2’nin antioksidan kapasite sonuçlarının troloks ve askorbik asitle karşılaştırılmalı sonuçları ve bu iki maddenin enzim etki tipleri gösterilmektedir.

Ferreira ve arkadaşları (2006) sentetik benzotiyofen türevleriyle yaptıkları çalışmada DPPH metodunu kullanmışlar ve bu türevlerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ancak, bu tez çalışmasında sentezlenen 2,3-Diarilbenzotiyofen türevlerinin (madde 1 ve madde 2) DPPH metoduyla yapılan deneylerde antioksidan kapasite tespit edilemedi.

El Bialy ve Gouda (2011) sentetik benzotiyofen türevlerinin antioksidan kapasitesini tespit etmek için ABTS yöntemini kullanmışlar ve test edilen türevlerin yüksek aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Buna karşın, bu çalışmada test edilen benzotiyofen türevleri (madde 1 ve madde 2) ise ABTS metodunda madde 1’in 130,78  $\mu\text{M}$  ve madde 2’nin 129,68  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda bile (Bkz. Şekil 4.7, Şekil 4.8) % 50’den az olduğu için  $\text{EC}_{50}$  değerleri hesaplanamadı. Test edilen en yüksek konsantrasyonda (madde 1 için 130,78  $\mu\text{M}$  ve madde 2 için 129,68  $\mu\text{M}$ ) maddeler, troloks ve askorbik asitle karşılaştırıldığında madde 1 için 1,08  $\mu\text{M}$  askorbik asit’e ve 0,61  $\mu\text{M}$  troloks konsantrasyonuna denk gelirken, madde 2 için 1,91  $\mu\text{M}$  askorbik asit’e ve 1,12  $\mu\text{M}$  troloks konsantrasyonuna denk geldiği hesaplandı.

Bu tez çalışmasında kullanılan diğer bir antioksidan kapasite yöntemi ise galvinoxil metodudur. Madde 1 ve madde 2’nin galvinoxil metodunda aynı DPPH metodunda olduğu gibi test edilen benzotiyofen molekülleri ile galvinoxil radikali (Karbon radikali) ile etkileşime giremediğinden dolayı antioksidan kapasite belirlenemedi (Bkz. Şekil 4.11, Şekil 4.12).

Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesi prensibine dayanan fosfomolibden metodu ise elektron transferine dayalı bir antioksidan kapasite metodudur. Fosfomolibden metodunda madde 1 ve 2 türevlerinin antioksidan kapasiteleri Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da görüldüğü gibi oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Kullanılan benzotiyofen türevlerinin en yüksek konsantrasyonlarının askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılması Çizelge 4.2'de verilmektedir. Madde 1'in 91,10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu troloks'un 99,51  $\mu\text{M}$  ve askorbik asit'in 56,93  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna denk gelirken, madde 2'nin ise 51,87  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu troloks'un 82,84  $\mu\text{M}$  ve askorbik asit'in 47,89  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna denk geldiği hesaplandı. Bu değerlere bakıldığında test edilen maddelerin fosfomolibden metoduna göre oldukça yüksek indirgeme aktivitesine sahip oldukları söylenebilir. Hatta hem madde 1 hem de madde 2 test edilen en yüksek konsantrasyonda troloks'tan daha yüksek aktivite (troloks, madde 1'in 0,91 ve madde 2'nin 0,63 katına denk gelmektedir) askorbik asit'e oldukça yakın antioksidan aktivite (askorbik asit, madde 1'in 1,6 ve madde 2'nin 1,08 katına denk gelmektedir) gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.2).

FRAP metodu elektron transferine dayalı bir antioksidan kapasite metodudur. Madde 1 ve madde 2'nin FRAP metodu sonuçlarına göre madde 2'nin, madde 1'den daha yüksek (Şekil 4.19, Şekil 4.20) aktivite gösterdiği tespit edildi. Madde 1 ve madde 2'nin askorbik asit ve troloks standartlarıyla karşılaştırılmalı sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Buna göre madde 1'in 69,76  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu 1,5  $\mu\text{M}$  troloks ve 1,8  $\mu\text{M}$  askorbik asit konsantrasyonuna denk gelirken, madde 2'nin 69,17  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu 4,63  $\mu\text{M}$  troloks ve 5,68  $\mu\text{M}$  askorbik asit konsantrasyonuna denk geldiği hesaplandı. Bu sonuçlara göre her iki maddeninde indirgeme kapasitesinin mevcut olduğu ve madde 1'in indirgeme kapasitesinin madde 2'den daha düşük olduğu tespit edildi.

Antioksidan kapasiteyi hesaplamak için kullanılan beş yöntemin sonuçlarına bakıldığında test edilen her iki 2,3-diaril benzotiyofen türevinin (madde 1 ve madde 2) hidrojen transferi prensibine dayalı yöntemlerde (DPPH, Galvinoxil ve ABTS) aktivite göstermedikleri ya da düşük aktivite gösterdikleri ve elektron transferine dayalı

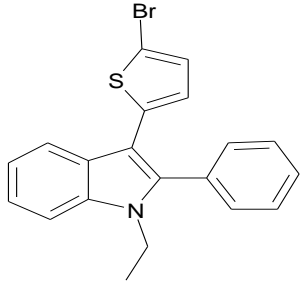
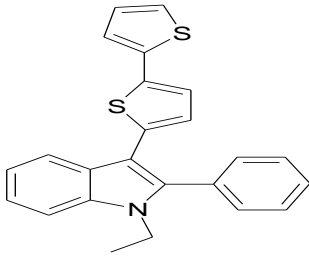
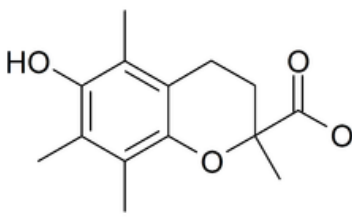
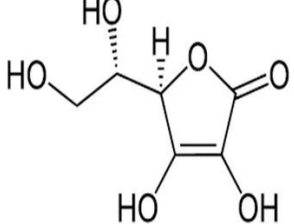
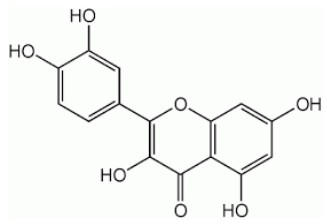
yöntemlerde (FRAP ve Fosfomolibden metotları) genellikle yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur.

2,3-diaril benzotiyofen türevlerinin (madde 1 ve madde 2) GST A1-1 izozimiyle yapılan çalışmalarda substrat olarak CDNB'nin 0,5, 1 ve 1,5 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonu kullanıldı. Her CDNB konsantrasyonu için 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 250  $\mu$ M konsantrasyonlarda test edilen 2,3-diaril benzotiyofen türevleri (madde 1 ve madde 2) kullanıldı.

Yapılan enzim kinetiği çalışmalarında, madde 1'in 1, 10 ve 25  $\mu$ M konsantrasyonlarda zorunlu olmayan tip aktivasyon gösterdiği SigmaPlot yazılımıyla belirlenirken, aynı maddenin 25, 50 ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarda bu kez tam yarışmalı tip inhibisyon yaptığı belirlendi.

Diğer 2,3-diaril benzotiyofen türevi olan madde 2 ise madde 1'e benzer şekilde düşük madde konsantrasyonlarında 1, 5 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarında zorunlu olmayan tip aktivasyon gösterirken, yine madde 1'e benzer şekilde 25, 100 ve 250  $\mu$ M konsantrasyonlarda inhibisyon yaptığı ancak inhibisyon tipinin ise bağımlı tip inhibisyon olduğu SigmaPlot yazılımı ile tespit edildi.

Çizelge 4.8. Tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevlerinin enzim etki tipi ve kullanılan en yüksek konsantrasyona göre trolks ve askorbik asit eşdeğerleri

Madde adı	Maddenin basit formülü	Enzim etki tipi		DPPH metodu		ABTS metodu		Galvinoxil metodu		Fosfomolibden metodu		FRAP metodu	
		Zorunlu olmayan <sup>a</sup>	Yarışmalı <sup>i</sup>	-	-			-	-				
Madde 1	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> BrNS	Zorunlu olmayan <sup>a</sup>	Yarışmalı <sup>i</sup>	-	-	1,08 <sup>*</sup>	0,61 <sup>+</sup>	-	-	99,51 <sup>*</sup>	56,93 <sup>+</sup>	1,5 <sup>*</sup>	1,8 <sup>+</sup>
Madde 2	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> NS <sub>2</sub>	Zorunlu olmayan <sup>a</sup>	Bağımlı <sup>i</sup>	-	-	1,91 <sup>*</sup>	1,12 <sup>+</sup>	-	-	82,84 <sup>*</sup>	47,89 <sup>+</sup>	14,93 <sup>*</sup>	12,18 <sup>+</sup>
*	Trolks eşdeğeri												
+	Askorbik asit eşdeğeri												
-	Belirlenemedi												
a	Aktivasyon												
i	İnhibisyon												
Kullanılan maddelerin ve standartların moleküler yapıları													
Madde 1		Madde 2		Trolks		Askorbik asit		Kuersetin					
													
3-(5-Bromo-tiyofen-2il)-1-etil-2-fenil-1H-indol		3-[2,2']Bitiyofenil-5-il-1-etil-fenil-1H-indol		6-Hidroksi-2,5,7,8 tetrametil Kroman-2-karboksilik asit		(5R)-[(1S)-1,2-Dihidroksietil]-3,4-dihidroksifuran-2(5H)-one		2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-one					





## KAYNAKLAR

- Akkuş İ., 1995. Serbest **Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri**. Mimoza Yayınları, Konya. 157.
- Akpoyraz, M., Durak, İ., 1995. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. **Ankara Tıp Mecmuası ( The Journal of the Faculty of Medicine)**, **48**: 253-262.
- Algo, M. A., Kivrak, A., Konus, M., Yılmaz, C., Kurt-Kizildoğan, A., 2018. Synthesis and biological evaluation of novel benzothioephene derivatives. **Journal of Chemical Sciences**, **130** (9), 119.
- Arı, F., Dere, E. 2003. Benzen'in Karaciğer Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesine In Vitro Etkisi. **Fen Bilimleri Dergisi**, **24** (1).
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research In Toxicology**, **10** (1): 2-18.
- Avcı A. 2001. **Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi Ve E vitamini Etkileri**. (Uzmanlık Tezi). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.
- Aydemir S. 2018. **Sentetik Benzaldehit Türevlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Ve İnsan Meme Kanseri Hücrelerine Etkilerinin Araştırılması** (yüksek lisans tezi).Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye
- Aydın, H. 2011. **Bazı Baharatların Farklı Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi** (yüksek lisans tezi)Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne. Türkiye.
- Benzie, I. F., Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, **239** (1): 70-76.
- Berger, M. M. 2005. Can oxidative damage be treated nutritionally?. **Clinical Nutrition**, **24**(2): 172-183.
- Björnstedt, R., Stenberg, G., Widersten, M., Board, P. G., Sinning, I., Jones, T. A., Mannervik, B., 1995. Functional Significance Of Arginine 15 In The Active Site Of Human Class Alpha Glutathione Transferase A1-1. **Journal of molecular biology**, **247** (4): 765-773.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, **181** (4617): 1199.
- Brasholz, M., Reissig, H. U. ve Zimmer, R. 2008. Sugars, alkaloids, and heteroaromatics: exploring heterocyclic chemistry with alkoxyallenes. **Accounts of chemical research**, **42**(1): 45-56.
- Cava, M.P., Lakshmikantham, M.V., 1975. Nonclassical Condensed Thiophenes. **Accounts of Chemical Research**, **8**: 139-44.
- Coa J C, Castrillon W, Cardona W, Carda M, Ospina V, Munoz J A, Velez I D and Robledo S M 2015. Synthesis, Leishmanicidal, Trypanocidal And Cytotoxic Activity of Quinoline-Hydrazone Hybrids. **Eur. J. Med. Chem.**, 101746
- Çaylak, E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. **Tıp Araştırmaları Dergisi**, **9**(1), 73-83.
- Delibaş, N., Özçankaya, R. 1995. Serbest Radikaller. **SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi**, **2**(3).

- Edwards G and Weston A H. 1993. The Pharmacology Of ATP-Sensitive Potassium Channels. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.*, 33-59
- Ekici, L., Sağdıç, O. 2008. Serbest Radikaller ve Antioksidan Gıdalarla İnhibisyonu. *Gıda Dergisi*, **33** (5).
- El Bialy S.A. A., Gouda M. A. 2011. Cyanoacetamide in Heterocyclic Chemistry: Synthesis, Antitumor and Antioxidant Activities of Some New Benzothiohenes, *J. Heterocyclic Chem.*, **48**: 1280.
- Estrela, J. M., Ortega, A., & Obrador, E. 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, **43** (2): 143-181.
- Ferreira, I. C., Queiroz, M. J. R., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Begouin, A., & Kirsch, G. 2006. Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo [b] thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **16**(5), 1384-1387.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. 2011. Comparison Of ABTS/DPPH Assays To Measure Antioxidant Capacity İn Popular Antioxidant-Rich US Foods. *Journal of food composition and analysis*, **24**(7): 1043-1048.
- Flora, S. J. S. 2007. Role Of Free Radicals And Antioxidants İn Health And Disease. *Cellular and Molecular Biology*, **53** (1): 1-2.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. 2006. Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **23** (1-1): 85-89.
- Grynyuk, I. I., Prylutska, S. V., Franskevych, D. V., Trush, V. A., Sliva T Y, Slobodyanik M S, Hurmach VV, Prylutsky Y I, Matyshevska O. P. and Ritter U. 2016. Combined action of C60 fullerene with dimethyl-N-(benzoyl) amidophosphate or dimethyl-N-(phenylsulfonyl) amidophosphate on leukemia L1210 cells in silico and in vitro: Die Wirkung von C60-Fulleren mit Dimethyl-N-(benzoyl)-amidophosphat oder Dimethyl-N-(phenylsulfonyl) amidophosphat auf Leukämie-L1210-Zellen in silico and in vitro. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **47** (2-3): 98-104.
- Gürsoy, S. Ş., Gürsoy, O. 2017. Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler. *Akademik Gıda*, **15** (4): 426-435.
- Habig, W., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Glutathione-S-transferase. *J Biol Chem*, **249**: 7130-7139.
- Halliwell, B. 1994. Free Radicals And Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*, **52** (8): 253-265.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **53** (6): 1841-1856.
- Ionita, P. 2005. Is DPPH Stable Free Radical A Good Scavenger For Oxygen Active Species. *Chem Pap*, **59** (1): 11-16.
- Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., & Persson, B. 1999. Common structural features of mapeg—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, **8** (3): 689-692.
- Jensen, S. J. K. 2003. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, **666**: 387-392.
- Jesberger, J. A., & Richardson, J. S. 1991. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *International Journal of Neuroscience*, **57** (1-2): 1-17.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, **47**(10): 3954-3962.
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş. 2016. Antioksidanlar. **Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **1**(1), 65-76.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. 2009. Review Of Methods To Determine Antioxidant Capacities. *Food analytical methods*, **2** (1): 41-60.
- Kavas, G. Ö. 1989. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, **9** (1): 1-8.
- Kazemizadeh A R, Shajari N, Shapouri R, Adibpour Nand Teimuri-Mofrad R 2016 Synthesis And Anti-Brucellaactivity Of Some New 1,3,4-Oxadiazole Derivatives Containinga Ferrocene Unit *J. Iran. Chem. Soc.*, **13**1349
- Kılıç L.2015. *Bazı Bitki Ekstreleri ve Kimyasal Maddelerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkileri* (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, Türkiye.
- Koca, N., Karadeniz ,F., 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **Sayı: Aralık/2003**.
- Konukoğlu, D., Akçay, T. 1995. Glutasyon metabolizması ve klinik önemi. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, **15** (4): 214-218.
- Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S., Biasi, F., & Poli, G. 2012. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, **52** (1): 19-34.
- Lipinski, C. A. 2004. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, **1** (4): 337-341.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23** (1-3): 3-25.
- Liska, D., Lyon, M., & Jones, D. S. 2006. Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore: The Journal of Science and Healing*, **2** (2), 122-140.
- Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., Pearson, W. R. 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, **401**, 1-8.
- Mannervik, B., Helena Danielson, U., &Ketterer, B. 1988. Glutathione transferases— structure and catalytic activit. *Critical Reviews in Biochemistry*, **23**(3), 283-337.
- Memişoğulları, R.,2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*,**3**:30-39.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, **84** (4): 407-412.
- Muşdal, Y. 2012. Özgün Heterosiklik Bileşiklerin Glutasyon Transferaz P1-1 *İnhibitörleri Olarak Araştırılması ve İnsan Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi* (Doktora tezi).Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, Türkiye.

- Niermann, N., Degefa, T. H., Walder, L., Zielke, V., Steinhoff, H. J., Onsgaard, J., Speller, S. 2006. Galvinoxyl monolayers on Au (111) studied by STM, EPR, and cyclic voltammetry. *Physical Review B*, **74** (23): 235424.
- Önez, Z. 2006. *Üzümden (vitis vinifera l.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi*. Ankara Üniversitesi, (Yüksek Lisans Tezi), Ankara, Türkiye.
- Özden, M., Özden, A. N. 2014. Farklı renkteki meyvelerin toplam antosiyanin, toplam fenolik kapsamlarıyla toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **9** (2): 1-12.
- Özenç, B. 2011. *Fumaria Officinalis' Un Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi* (Doktora tezi), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
- Özler, A. 2009. *Malatya Kayısısından (Prunus Armeniaca L.) Pektinesteraz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi) Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 74s.
- Palüzar, H. 2013. *Pestisitlerin Vücut Savunma Sistemi Enzimleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro İncelenmesi* (Doktora Tezi) Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.. Edirne, Türkiye.
- Pathak R B, Chovatia P. T., Parekh H H. 2012. Synthesis, antitubercular and antimicrobial evaluation of 3-(4-chlorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5129
- Pommier, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, **6** (10): 789.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, **269** (2): 337-341.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **53** (10): 4290-4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26** (9-10): 1231-1237.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, **26** (9-10): 1231-1237.
- Selçuk, A. R. 2012. *Galvinoksil radikali bazlı spektrofotometrik antioksidan aktivite tayin yöntemi ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlerle kıyaslanması* (yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Shakdofa M M E, Shtaiwi M H, Morsy N, Abdel-Rassel T M A 2014. Metal complexes of hydrazones and their biological analytical and catalytic applications. *A review Main Group Chem.* **13**187
- Shi, H., Niki, E. 1998. Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. *Lipids*, **33** (4): 365.

- Smith, M. A. L., Marley, K. A., Seigler, D., Singletary, K. W., & Meline, B. 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science*, **65** (2): 352-356.
- Sohal, R. S. 1993. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clinical and Experimental Research*, **5** (1): 3-17.
- Tabakoğlu, E., Durgut, R. 2013. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Dergisi*, **3** (1): 69-75.
- Tekeli H. 2012. *Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutasyon (Gsh) Ve Glutasyon Stransferaz (Gst) Aktivitesi Üzerine N-Asetil Sisteinin Etkisi* (yüksek lisans tezi). Adnan Menderes Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın, Türkiye.
- Tozkoparan, B., Aytaç, S. P. 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutasyon s-transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **27** (2): 139-164.
- Ugar, M. 2016. *Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü İçin Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi* (yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi. Fen bilimleri enstitüsü. İstanbul. Türkiye.
- Van der Vliet, A., O'Neill, C. A., Halliwell, B., Cross, C. E., Kaur, H. 1994. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxy nitrite. *Febs Letters*, **339** (1-2): 89-92.
- Villanueva, C., Kross, R. D. 2012. Antioxidant-induced stress. *International journal of molecular sciences*, **13** (2): 2091-2109.
- Williams R J, Spencer J P E and Rice-Evans C 2004 Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?. *FreeRad. Biol. Med.*, **36**: 838
- Yavaşer, R. 2011. *Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi) Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Aydın. Türkiye.
- Yazıcı, C. Ve Köse, K. 2004. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, **13** (2): 56-65.



## EKLER

### EK1. DPPH metodu için grafik verileri

Askorbik asit'in DPPH deneyi sonuçları						
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
3,99225	1,295	1,264	1,2795	1,3335	0,02192	4,049494
7,9845	1,213	1,194	1,2035	1,3335	0,013435	9,748781
15,969	1,056	1,05	1,053	1,3335	0,004243	21,03487
31,938	0,674	0,695	0,6845	1,3335	0,014849	48,66892
63,876	0,062	0,059	0,0605	1,3335	0,002121	95,46307
0	1,36	1,307	1,3335	-	0,037477	-

Troloks' un DPPH deneyi sonuçları						
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
2,80925	1,047	1,05	1,0485	1,12	0,002121	6,383929
5,6185	0,952	0,963	0,9575	1,12	0,007778	14,50893
11,237	0,781	0,806	0,7935	1,12	0,017678	29,15179
22,474	0,494	0,484	0,489	1,12	0,007071	56,33929
44,948	0,042	0,047	0,0445	1,12	0,003536	96,02679
0	1,121	1,119	1,12	-	0,001414	-

Madde 1'in DPPH deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
4,904375	0,99	1,233	1,226	1,149667	1,135	0,138	-1,26248
9,80875	0,985	1,246	1,23	1,153667	1,135	0,146	-1,6148
19,6175	0,984	1,231	1,23	1,148333	1,135	0,142	-1,14504
39,235	0,981	1,247	1,234	1,154	1,135	0,149	-1,64416
78,47	0,979	1,223	1,257	1,153	1,135	0,151	-1,55608
0	0,978	1,212	1,216	1,135333	-	0,136269	-

## Ek 1. (devam ediyor)

Madde 2'nin DPPH deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
4,863125	1,016	1,194	1,202	1,137333	1,119	0,105154	-1,63837
9,72625	1,014	1,193	1,192	1,133	1,119	0,103058	-1,25112
19,4525	1,001	1,184	1,186	1,123667	1,119	0,106237	-0,41704
38,905	0,997	1,185	1,19	1,124	1,119	0,110014	-0,44683
77,81	1,01	1,198	1,207	1,138333	1,119	0,111231	-1,72773
0	1	1,173	1,184	1,119	-	0,103204	-

## EK2. ABTS metodu için grafik verileri

Askorbik asit'in ABTS deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
0,887172	0,314	0,301	0,291	0,302	0,317667	0,011533	4,931794
1,774344	0,292	0,276	0,274	0,280667	0,317667	0,009866	11,64743
3,548688	0,269	0,257	0,235	0,253667	0,317667	0,017243	20,1469
7,097375	0,204	0,197	0,172	0,191	0,317667	0,016823	39,87408
14,19475	0,033	0,042	0,051	0,042	0,317667	0,009	86,77859
0	0,327	0,317	0,309	0,317667	-	0,009018	-

Troloks' un ABTS deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
0,624281	0,292	0,306	0,298	0,298667	0,316333	0,007024	5,584826
1,248563	0,276	0,285	0,277	0,279333	0,316333	0,004933	11,69652
2,497125	0,237	0,244	0,235	0,238667	0,316333	0,004726	24,55216
4,99425	0,162	0,158	0,149	0,156333	0,316333	0,006658	50,57956
9,9885	0,007	0,005	0,005	0,005667	0,316333	0,001155	98,20864
0	0,308	0,324	0,317	0,316333	-	0,008021	-



## Ek 2. (devam ediyor)

Madde 1'in ABTS deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
8,173594	0,266	0,313	0,306	0,295	0,298667	0,025357	1,227679
16,34719	0,271	0,308	0,318	0,299	0,298667	0,024759	-0,11161
32,69438	0,263	0,299	0,304	0,288667	0,298667	0,022368	3,348214
65,38875	0,262	0,302	0,291	0,285	0,298667	0,020664	4,575893
130,7775	0,253	0,292	0,299	0,281333	0,298667	0,024786	5,803571
0	0,267	0,312	0,317	0,298667	-	0,027538	-

Madde 2'nin ABTS deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
8,105313	0,324	0,309	0,32	0,317667	0,321333	0,007767	1,141079
16,21063	0,328	0,3	0,302	0,31	0,321333	0,01562	3,526971
32,42125	0,324	0,304	0,315	0,314333	0,321333	0,010017	2,178423
64,8425	0,316	0,288	0,308	0,304	0,321333	0,014422	5,394191
129,685	0,301	0,283	0,275	0,286333	0,321333	0,013317	10,89212
0	0,331	0,318	0,315	0,321333	-	0,008505	-

## EK3. Galvinoxil metodu için grafik verileri

Kuersetin' in Galvinoxil deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA	
0,1965	0,963	0,855	0,909	0,983	0,076368	7,527976	
0,393	0,746	0,722	0,734	0,983	0,016971	25,33062	
0,786	0,596	0,541	0,5685	0,983	0,038891	42,16684	
1,257	0,3333	0,338	0,33565	0,983	0,003323	65,85453	
1,572	0,265	0,273	0,269	0,983	0,005657	72,63479	
0	0,997	0,969	0,983	-	0,019799	-	

## Ek 3. (devam ediyor)

Troloks' un Galvinoksil deneyi sonuçları						
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	%R SA
0,23725	0,736	0,75	0,743	0,787	0,009899	5,590851
0,4745	0,65	0,642	0,646	0,787	0,005657	17,91614
0,949	0,513	0,518	0,5155	0,787	0,003536	34,49809
1,898	0,219	0,2	0,2095	0,787	0,013435	73,37992
2,657	0,133	0,138	0,1355	0,787	0,003536	82,78272
0	0,775	0,799	0,787	-	0,016971	-

Madde 1'in Galvinoksil deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
15,52981	1,205	0,986	0,986	1,059	1,053	0,12644	-0,5698
31,05963	1,224	0,975	0,975	1,058	1,053	0,14376	-0,47483
62,11925	1,223	1,01	1,01	1,081	1,053	0,122976	-2,65907
124,2385	1,23	0,981	0,981	1,064	1,053	0,14376	-1,04463
248,477	1,193	0,962	0,962	1,039	1,053	0,133368	1,329535
0	1,155	1,002	1,002	1,053	-	0,088335	-

Madde 2'nin Galvinoksil deneyi sonuçları							
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	Kör	ss( $\pm$ )	% RSA
15,40013	1,054	1,064	1,0315	1,049833	1,042667	0,016646	-0,68734
30,80025	1,039	1,058	1,034	1,043667	1,042667	0,012662	-0,09591
61,6005	1,022	1,052	1,039	1,037667	1,042667	0,015044	0,47954
123,201	1,025	1,065	1,049	1,046333	1,042667	0,020133	-0,35166
246,402	1,038	1,074	1,05	1,054	1,042667	0,01833	-1,08696
0	1,056	1,018	1,054	1,042667	-	0,021385	-

## EK4. Fosfomolibden metodu için grafik verileri

Askorbik asit'in Fosfomolibden deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
6,4515	0,036	0,045	0,044	0,041667	0,004933
12,903	0,077	0,081	0,078	0,078667	0,002082
25,806	0,158	0,174	0,162	0,164667	0,008327
51,612	0,348	0,382	0,368	0,366	0,017088
103,224	0,796	0,883	0,828	0,835667	0,044004

Troloks'un Fosfomolibden deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
11,34938	0,048	0,048	0,069	0,055	0,012124
22,69875	0,078	0,098	0,107	0,094333	0,014844
45,3975	0,158	0,207	0,199	0,188	0,026287
90,795	0,34	0,439	0,4	0,393	0,04987
181,59	0,757	0,883	0,823	0,821	0,063024

Madde 1'in Fosfomolibden deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
5,943813	0,062	0,048	0,063	0,057667	0,008386
11,88763	0,095	0,089	0,104	0,096	0,00755
23,77525	0,159	0,21	0,207	0,192	0,028618
47,5505	0,271	0,204	0,28	0,251667	0,041525
95,101	0,426	0,424	0,467	0,439	0,024269

Madde 2'nin Fosfomolibden deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
3,242125	0,022	0,016	0,03	0,022667	0,007024
6,48425	0,054	0,065	0,044	0,054333	0,010504
12,9685	0,111	0,123	0,145	0,126333	0,017243
25,937	0,184	0,201	0,226	0,203667	0,021127
51,874	0,342	0,375	0,375	0,364	0,019053

## EK5. FRAP metodu için grafik verileri

Askorbik asit'in FRAP deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
1,774375	0,046	0,051	0,052	0,049667	0,003215
3,54875	0,084	0,089	0,093	0,088667	0,004509
7,0975	0,164	0,173	0,241	0,192667	0,042099
14,195	0,356	0,342	0,37	0,356	0,014
28,39	0,829	0,803	0,869	0,833667	0,033247

Troloks'un FRAP deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
2,018375	0,071	0,073	0,071	0,071667	0,001155
4,03675	0,126	0,128	0,128	0,127333	0,001155
8,0735	0,226	0,215	0,223	0,221333	0,005686
16,147	0,39	0,378	0,389	0,385667	0,006658
32,294	0,694	0,714	0,716	0,708	0,012166

Madde 1'in FRAP deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
4,36	0,005	0,002	0,007	0,004667	0,002517
8,72	0,009	0,006	0,0125	0,009167	0,003253
17,44	0,01	0,011	0,0145	0,011833	0,002363
34,88	0,021	0,02	0,0295	0,0235	0,00522
69,76	0,034	0,027	0,041	0,034	0,007

Madde 2'nin FRAP deneyi sonuçları					
Son Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	Ortalama	ss( $\pm$ )
4,323375	0,027	0,035	0,042	0,034667	0,007506
8,64675	0,043	0,053	0,061	0,052333	0,009018
17,2935	0,058	0,074	0,086	0,072667	0,014048
34,587	0,106	0,126	0,145	0,125667	0,019502
69,174	0,305	0,342	0,369	0,338667	0,03213

## ÖZ GEÇMİŞ

Bitlis'in Hizan ilçesine bağlı alışkanlar Köyü'nde 1994 yılında doğdu. alışkanlar Köyü İlkretim Okulu'nda başladığı öğrenimini Hizan Yatılı İlkretim Okulu'nda tamamladı. Iędir Gaziler Anadolu ęretmen Lisesi'nde orta öğrenimini tamamlayıp 2012 yılında Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2016 yılında lisans eğitimini bitirip aynı yıl Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans eğitimine başladı.



T.C  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 03/01/2019

Tez Başlığı / Konusu: **İLAC OLMA POTANSİYELİ TAŞIYAN 2,3-DİARİL-BENZOTİYOFEN TÜREVELERİNİN ANTIÖKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE GST- $\alpha$  İZOZİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 101 sayfalık kısmına ilişkin, 03/01/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 (bir) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayımlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

03.01.2019



Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Doğan ÇETİN

Öğrenci No:169102021

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Statüsü: Y. Lisans  Doktora

DANIŞMAN ONAYI  
UYGUNDUR



Doç. Dr. Metin KONUS

ENSTİTÜ ONAYI  
UYGUNDUR

  
Prof. Dr. Suat ŞENSOY

Prof. Dr. Suat ŞENSOY