

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1,2-BİS(P-AMİNOFENOKSİ)ETAN TÜREVİ SCHİFF BAZLARI VE
METAL KOMPLEKSLERİNİN ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Haluk ÇAKMAK

Tez Yöneticisi

Yrd.Doç. Dr. Mustafa KARATEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2007

**1,2-BİS(P-AMİNOFENOKSİ)ETAN TÜREVİ SCHİFF BAZLARI VE
METAL KOMPLEKSLERİNİN ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Haluk ÇAKMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez, / / tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Mustafa KARATEPE

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarım süresince destek ve ilgisini esirgemeyen bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Yrd.Doç. Dr. Mustafa KARATEPE'ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince verdikleri desteklerden dolayı Prof.Dr. Memet ŞEKERCİ, Doç. Dr Sevda KIRBAĞ, Işıl YILDIRIM, Ömer Naci ALAYUNT, Süleyman SANDAL ve Bölüm Şefimiz Mehmet ORHAN'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Doktora çalışmamın 1257 nolu Proje ile mali desteğini sağlayan, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne (FÜBAB) ve fedakar çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Haluk ÇAKMAK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET	II
SUMMARY.....	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLoların LİSTESİ	VI
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Schiff Bazlarının Biyolojik Özellikleri	1
1.2. Çalışmanın amacı	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	3
2.1.1. Serbest Radikaller.....	3
2.1.2 Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu	3
2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	5
2.3. Antioksidan Tanımı ve Çeşitleri	6
2.3.1. E Vitamininin Antioksidan Etkisi	6
2.3.2. A Vitamininin Antioksidan Etkisi	7
2.3.3. C Vitamininin Antioksidan Etkisi	8
2.4. Çalışmanın Amacı	8
3. MATERYAL ve METOT	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler	9
3.3. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler.....	10
3.4. MCF-7 Hücrelerinin Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi	10

3.5. Kullanılacak hücre sayısı ve madde dozlarının belirlenmesi	10
3.6. Örneklerin Analizleri.....	11
3.6.1. C Vitamini ve MDA Analizi	11
3.6.2.A ve E Vitamini Analizi	11
4. BULGULAR	13
4.1. Uygulamalardaki Farklı Gruplar Arası Karşılaştırmalar	13
4.1.1. MDA Düzeyleri	14
4.1.2. C Vitamini Düzeyleri	14
4.1.3. A Vitamini düzeyleri	15
4.1.4. E Vitamini Düzeyleri.....	15
5. TARTIŞMA	16
6. KAYNAKLAR.....	19

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 2.1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	5
Tablo 4-1: Hücrelerin uygulama süreleri ve doza göre canlılık durumları	13
Tablo 4.2. MDA (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri	14
Tablo 4.3.C Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri	14
Tablo 4.4. A Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri	15
Tablo 4.5. E Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri	15

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. Oksidan ve antioksidan denge.....4

Şekil:3.1 Uygulamalarda kullanılan bileşikler9

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

1,2-BİS(P-AMİNOFENOKSİ)ETAN TÜREVİ SCHİFF BAZLARI VE METAL KOMPLEKSLERİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Haluk ÇAKMAK

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

2007, Sayfa: 25

Bu araştırmada, iki farklı Schiff bazı ve bunların metal komplekslerinin hücre kültürü ortamına ilave edilmesi ile lipit peroksidasyonunun derecesini gösteren MDA konsantrasyonu, antioksidan A, E, C vitaminlerinin düzeyleri üzerine olan etkisi araştırıldı.

Deney grupları arasındaki karşılaştırmalarda MDA, A,E,C vitamin düzeylerinin istatistiksel olarak değiştiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, ölçülen parametreler Zn kompleksleri hariç bütün maddelerin oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir.

*: Bu çalışma 1257 nolu FÜBAP projesiyle desteklenmiştir.

ABSTRACT

Master Thesis

AN INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF 1,2-BIS(P-AMINOPHENOXY)ETANE DERIVATIVE SCHIFF BASES AND METAL COMPLEXES.

Haluk ÇAKMAK

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

2007, Page: 25

In this research, the effect of two Schiff base derivatives and its metal complexes on the MDA concentration which is an indicator of Lipid peroxidation, antioxidant vitamins A, E, C levels in cell culture media.

In the comparison done among groups, it was observed that MDA, Vitamins A, E and C concentrations were statistically changed.

In conclusion, the parameters measured here in the show that all compounds caused a considerable oxidative stress without Zn complexes.

*: This study was supported by numbers 1257 with FÜBAP Project.

1. GİRİŞ

1.1. Schiff Bazlarının Biyolojik Özellikleri

İnorganik ve organometalik bileşiklerin farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmalarının kimyasal temellerinin incelenmesi, ilaç araştırmalarının ilk aşamaları için çok önemlidir (1). Schiff bazı (SB) türevleri antiviral, antineoplastik, antimalarial, antifungal ve antibakteriyal özelliklerinden dolayı kimya, biyoloji ve farmakolojide büyük ilgi görmektedir (2).

Schiff bazları ve metal kompleksleri, antitümör (3), antiviral (4), antimikrobiyal (5), antineoplastik (6), gibi çeşitli farmakolojik aktivitelerinden dolayı geniş şekilde araştırılmaktadırlar. Ayrıca, Schiff bazı bileşiklerinin ve Cu(II) metal komplekslerinin, lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidatif aktivite gösterdiği de belirtilmektedir (7).

Schiff bazı türevlerinin DNA ve RNA sentezini inhibe edici etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir(8). Bu etki onların ribonükleotit redüktaz (RR) enzimini inhibe etmelerinden kaynaklanmaktadır (9).

Çeşitli TSC ve SB türevleri ve bakır komplekslerinin spektrofotometrik davranışlarının süperoksit dismutaz (SOD) ile mukayesesi yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinin yanı sıra SOD benzeri aktivite gösterdikleri de vurgulanmaktadır (10).

Bölümümüzde yapılan çalışmalarda, bu sınıf bileşiklerin antioksidan prooksidan özellikleri ile çeşitli dokulara olan etkileri araştırılmış ve ratlarda farklı özellikler sergilediği gösterilmiştir (11,12). Yapılan başka bir çalışmada ise bu tür bileşiklerin antiviral özelliği araştırılmış ve kullanılan bileşiklerin her hangi bir antiviral aktivite göstermediği, ancak çok güçlü sitotoksik etkiye sahip oldukları gözlenmiştir (13).

Görüldüğü gibi Schiff bazlarının biyolojik aktiviteleri *in vivo* ve *in vitro* olarak bir çok çalışmaya konu olmuştur. Ligandın yapısı ve konformasyonu ile koordinasyon bileşiklerindeki merkez atomunun redoks potansiyellerinin bu tür bileşiklerin biyolojik aktivitelerini etkilediği belirtilmektedir (10). Bu gibi çalışmalar daha aktif komplekslerin sentezini veya doğal biyokoordinatif bileşiklerin davranışını anlamaya yardımcı olacaktır.

1.2. Çalışmanın amacı

Kimya bölümünde Schiff bazı türevleri ve bunların çeşitli metal kompleksleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (14,15). Bu bilgiler ışığında yaptığımız tez çalışmasında orijinal Schiff bazları ve metal komplekslerinin *in vitro* olarak antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Burada Schiff bazları ve metal kompleksleri

mikroorganizmanın bulunduğu ortama ilave edilerek, elde edilen materyallerde bazı antioksidanlar (vitamin A,E,C) ve lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarlarının ölçümü amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

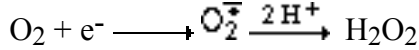
2.1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip, reaktif ve kısa ömürlü kimyasal bileşiklerdir. Serbest radikallere, oksidan moleküller veya en doğru adlandırma ile "Reaktif Oksijen Partikülleri" de denilmektedir (16).

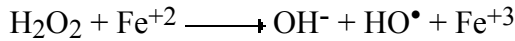
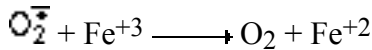
2.1.2. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Bir serbest radikalın başlangıç ürünü moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyon radikalidir ($O_2^{\cdot-}$). Bir serbest radikal, çiftleşmemiş elektrona sahip bir atom veya moleküldür. Bu ürün kararsız bir yapıdır ve çevresindeki bir organik veya inorganik yapıya saldırabilir. Peroksit anyonu çözültiden iki proton alarak hidrojen perokside dönüşür.

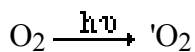


Canlı sistemlerde oksijen radikalinin zararlı etkilerine dikkat edilmesi ve bu radikallerin oluşumu ile hemen etkilerinin uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde bunlar Fe veya Cu gibi iki değerli katyonları katalizleyerek daha etkili bir serbest radikal olan hidroksil radikalini oluştururlar (17).



HO^{\cdot} radikali, canlı sistemlere çok zararlı olabilecek çok güçlü bir radikaldir. Birçok hastalıklara sebebiyet verebilecek biyokimyasal değişimleri oluşturulabilir (18). Serbest radikaller belli miktarlarda hücreler tarafından bazı hücre içi redoks ve sinyal farklılıklarını göstermek gibi fizyolojik faydalar için kullanılabilir (19).

Oksijenin diğer bir metaboliti singlet oksijendir (1O_2). Bu molekül oksijenin enerji yakalamasıyla şekillenir.



Singlet oksijen serbest radikal değildir (20). Ancak biyokimyasal olaylarda önemlidir ve doku hasarlarına yol açabilir. Bu zararlarının ortadan kalkışı vitamin A ve diğer retinoitler veya β -karoten ve diğer karotenoitler gibi antioksidanların kimyasal değişmeksizin enerji absorbe eden bileşikler olarak singlet oksijeni biyolojik sistemlere zarar vermeden O_2 'ye dönüştürmesiyle olur (21).

Bu açıklamalara göre oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde bileşenler (non-radikaller) olmak üzere 2 grupta toplanırlar (22).

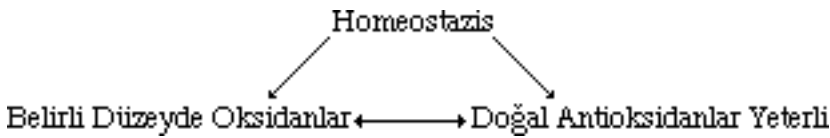
1. Radikaller

- Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)
- Hidroksil radikali (HO^{\cdot})
- Alkoksil radikali (LO^{\cdot})
- Peroksit radikali (LOO^{\cdot})

2. Non-Radikaller

- Hidrojenperoksit (H_2O_2)
- Lipit hidroperoksitler ($LOOH$)
- Hipoklorik asit ($HOCl$)

Oksidanlar, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu sırasında olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum ve "endojen antioksidanlar" adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirilme süreci içindedirler. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge (homeostazis) içindedir (23).



Şekil 2.1. Oksidan ve antioksidan denge

Kanser, romatoid artrit, katarakt, parkinson, şeker hastalığı ve yaşlanma süreci oksidan moleküllerin etkin olduğu kabul edilen hastalıklar arasında sayılmaktadır (24).

Oksidan moleküller, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (19).

2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler (19).

Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, geniş miktarlarda poliansature yağ asiti ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipid radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir işaretidir. Biyolojik membranların en önemli unsurları lipid ve proteinlerdir. Lipid peroksidasyonu, lipidler kadar mebran proteinlerini de hasara uğratabilir (22).

Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde O₂'nin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az yada çok degradasyonu ile sonuçlanan hücre lipidlerinin peroksidasyonudur (19).

Oksijen molekülü lipidlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipid peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun zar yapısı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir (25).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de

doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır (26).

2.3. Antioksidan Tanımı ve Çeşitleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.

Antioksidanlar, okside olabilir bir substratla mukayese edildiğinde, düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli derecede geciktiren ya da inhibe eden "herhangi bir substrat" olarak tanımlanmaktadırlar. Endojen (doğal) ve eksojen (ilaçlar) antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (19,23).

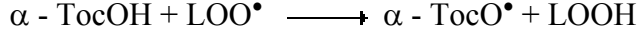
Tablo 2.1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

A- Endojen (Doğal) Antioksidanlar		
I. Enzimler	II. Makromoleküller	III. Mikromoleküller
- Süperoksid dismutaz	- Seruloplazmin	- E vitamini ve analogları
- Katalaz	- Transferrin	- C vitamini
-Glutasyon peroksidaz	- Ferritin	- Tiyoil içerenler: GSH
- Glutasyon redükaz	- Hemogloblin	-N-asetil sistein, Metiyonin kaptopril
- Hidroperoksidaz	- Miyogloblin	- A vitamini-β-karoten
- Sitokrom -C oksidaz		- Glikoz
		- Ürik asit
		- Ubikinon
		- Bilirubin
B - Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)		Gıda Antioksidanları
- NADPH oksidaz inhibitörleri		- Bütil Hidroksitoluen (BHT)
-Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler		- Bütil Hidroksianisol (BHA)
- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları		- Sodyum benzoat
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri		- Etoksikuin
- Nötrofil adezyon inhibitörleri		- Propilgalat
- Rekombinant h-SOD		
- 21 - Aminosteroidler, Indopamid		
- Sitokinler, Flavonoidler		
- Ksantin oksidaz inhibitörleri		
- Barbitüratlar, Trimetazidin		

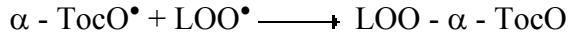
2.3.1. E Vitamininin Antioksidan Etkisi

E vitamininin normal fizyolojik süreçlerde ve farklı hastalık durumlarındaki rolü sürekli olarak araştırılmıştır. E vitamini diğer biyolojik moleküllerden daha fazla

peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önler ve hücre yapısını koruyarak güçlü bir antioksidan etki gösterir (19). Lipid peroksidasyonunda oluşan peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek çok fazla zayıf ve etkisiz bir radikal olan tokoferoksil radikalini oluşturur.



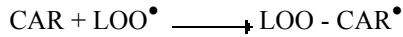
Daha sonra tekrar ikinci bir radikalle reaksiyona girerek radikal olmayan bir ürün olan LOO - TocO'yi oluşturur.



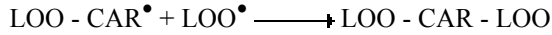
Böylece her tokoferol molekülü, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını önleyerek antioksidan etkisini gösterir (17).

2.3.2. A Vitamininin Antioksidan Etkisi

Konjuge polienlerin büyük kısmı benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Karotenoitler, lipid peroksidasyonu esnasında ortaya çıkan radikalleri önlemede etkilidir ve aktif oksijen çeşitlerini durdurmada etkili olan pigmentler olarak görülürler. Karotenoitlerin uzun, konjuge, çift bağlı sistemleri radikal saldırılarına karşı onları üstün hale getirmektedir. β - karotenin (CAR) peroksil radikali ile direkt olarak reaksiyona girebileceği ve karbon merkezli radikal oluşturarak rezonans kararlı hale geleceği belirtilmektedir (27).



Karotenoitler α - tokoferollerde görüldüğü gibi iki peroksil radikali ile reaksiyona girebilir (28).



Bununla birlikte bu antioksidan etki burada bitmez. Aşağıda gösterildiği gibi çoklu rezonans kararlılığı ile bir karoten molekülü, karbon merkezli radikaller oluşturarak iki peroksil radikale daha etki eder.



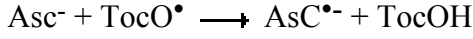
β - karoten ile peroksil radikalının reaksiyonundan oluşan ürünlerin bazıları son zamanlarda ESR ile tarif edilmiştir. Ürünler bazı epoksitler ile β - karotenin karbonil türevleridir (27,29).

2.3.3. C Vitamininin Antioksidan Etkisi

C vitamini bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Suda çözünebilen vitaminlerden olan askorbik asit bağırsaklarda kolayca emilir ve kana karışır (30,31).

C vitamini güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların temizlenmesinde rol oynar (32,33). C vitamininin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir (20).

Ayrıca C vitamini askorbat radikali oluşturarak, radikalik tokoferollerin yenilenmesini sağlar (17).



2.4. Çalışmanın Amacı

Schiff bazlarının çeşitli türevleri ve bunların metal kompleksleri antineoplastik, antiviral, antimikrobiyal, antimalarial gibi biyolojik fonksiyonlarından dolayı kimya, biyoloji ve farmakoloji bilim dallarında büyük ilgi görmektedir. Bu bileşiklerin sahip oldukları biyolojik etkilerin değişimi sentezlenen bileşiğin yapısına, farklı sübstitüentlerin konumuna ve komplekslerinde kullanılan metal atomunun özelliğine göre farklılaşmaktadır.

Yapılan literatür taramalarında bu bileşiklerin *in vitro* antioksidan özellikleriyle ilgili çok fazla araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile Schiff bazı ve bu bileşiğin Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II) ve Zn(II) komplekslerinin antioksidan vitaminler, A, E, C düzeylerine etkisi ve lipit peroksidasyon derecesinin (MDA) araştırılması amaçlanmıştır.

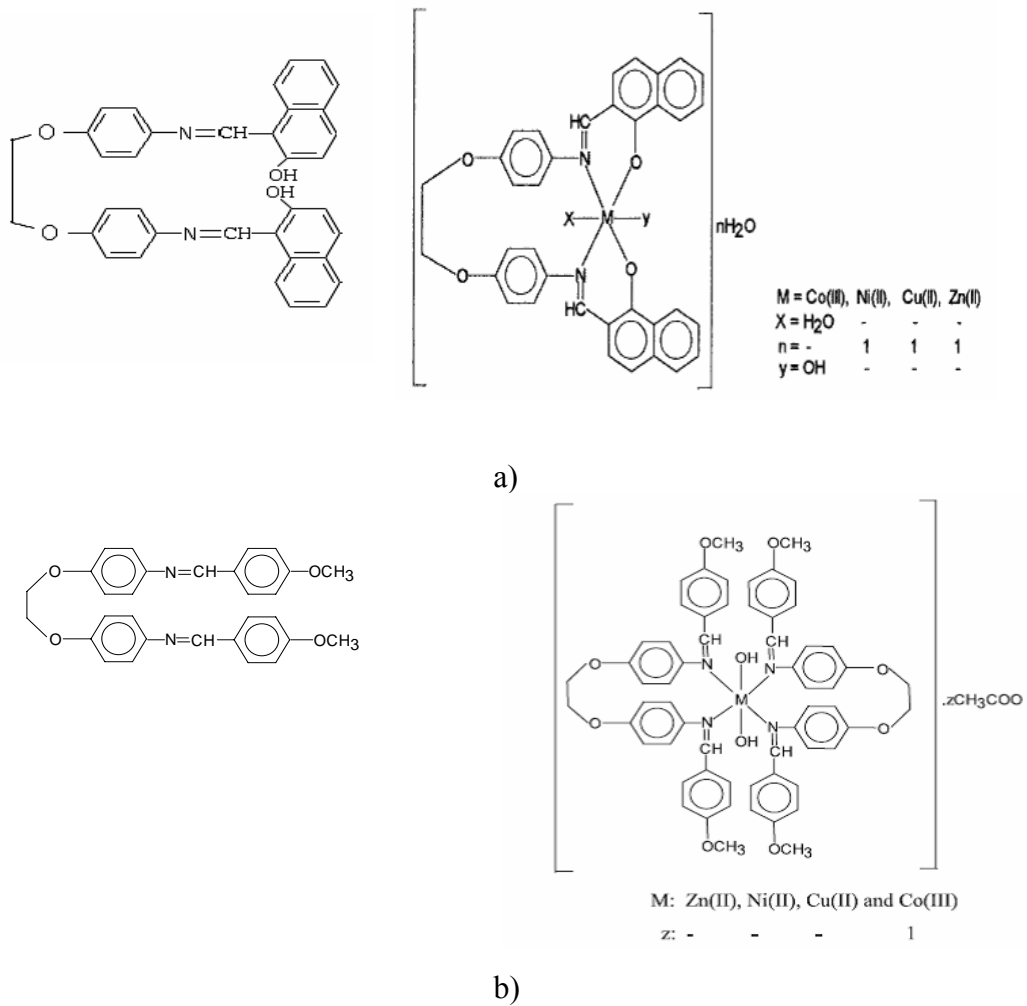
3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.2. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler

Uygulamalarda, salisilaldehitden türevlendirilmiş Schiff bazının iki farklı türevi ve metal kompleksleri kullanılmıştır.

Bu ligandlar ve Cu, Co, Mn, Ni ve Zn metal kompleksleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (14,15). Ligandların ve komplekslerinin yapısı aşağıdadır.



Şekil:3.1 Uygulamalarda kullanılan bileşikler. a) L₁,N,N'-bis(2-hydroxy naphthalin-1-cabaldahydene)-1,2-bis-(p-aminophenoxy)ethane ve metal kompleksleri. b) L₂, N,N'-bis(4-methoxy benzylidene)-1,2-bis-(p-aminophenoxy)ethane ve metal kompleksleri.

3.3. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler

Bu çalışmada MCF-7 HÜCRE KÜLTÜRÜ (insan göğüs kanseri hücresi) hücreleri kullanıldı.

3.4.MCF-7 Hücrelerinin Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi

Hücre kültür bankasından (ATCC, ABD) aldığımız donmuş haldeki MCF-7 insan göğüs kanseri hücreleri oda sıcaklığında çözdürülerek 75 ml flask içerisine aktarıldı. Flask'ın içerisine daha önceden hazırlanmış olan DC₅ (25 ml) ilave edildi ve flasklar, Nuair marka bir %5 CO₂ - %95 O₂ inkübatörüne (Plymouth, MN, ABD) yerleştirildi. Günlük olarak hücrelerin durumu Soif marka (Soif Optical Inc., Çin) bir inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi ve üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC₅ çekilerek tazesıyla değiştirildi. Bu işlem üç gün aralıklarla sürekli tekrar edildi.

Sayıları artmaya devam eden hücreler flaskın tabanını tamamen kaplayarak üst üste tabakalar oluşturmaya başladılar. 15. günün sonunda flasklardaki medyum çekildi ve yerine 3 ml tripsin ilave edilerek inkübatöre yerleştirildi. 2-3 dakikada bir flasklar hafifçe sallanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Tüm hücreler flaskın yüzeyinden ayrıldıktan sonra flaskların içerisine 12 ml DC₅ ilave edildi ve dikkatli şekilde tritürasyon (süspansiyonun pipet içerisine çekilip boşaltılarak yapılan ayrıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılması sağlandı.

Hücreler bir hemositometre kullanılarak sayıldı. Her flaska 5x10⁶ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu konulup üzerlerine DC₅ ilave edildi (toplam hacim 25 ml olacak şekilde) ve tüm flasklar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin ekimleri, beslenmeleri ve deneyler steril bir Class II Laminair Flow (Biolaf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi (34,35).

3.5. Kullanılacak hücre sayısı ve madde dozlarının belirlenmesi

MCF-7 göğüs kanseri hücreleri, flasklara tripsin ilave edilerek yerlerinden söküldü ve hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edildi. Tüplerdeki tripsin-medyum karışımı alınarak yerine DC₅ ilave edildi ve tritürasyon ile hücrelerin *single cell suspension* haline gelmeleri sağlandı. Hemositometre kullanılarak hücreler

sayıldı ve hücre sayısı deney için gerekli olan 1×10^6 / ml hücreye ayarlandı. Dozların belirlenmesinde ön denemeler yapıldı ve aşağı yukarı yöntemi kullanıldı (36). Bu şekilde dozların 7,5 ve 15 μM olmasına karar verildi.

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar (L1, L2 ve metal kompleksleri) 7,5 μM , 15 μM konsantrasyonlarda ilave edildi. Negatif kontrol tüplerine aynı miktarda serum fizyolojik, *vehicle* tüplerine de aynı miktarda DMSO ilave edildi ve tüpler inkübatöre yerleştirildi. Hücre süspansiyonlarındaki DMSO miktarı %1'den fazla değildi. 24 saat sonra tüpler inkübatörden çıkarılarak tritürasyon yapıldı ve hücre süspansiyonu % 0.4 trypan blue ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak rasgele seçilen 100 adet hücre hemositometrede sayıldı. Hücre canlılığı oranı yüzde olarak ifade edildi. Aynı işlem 48 saat sonra da tekrar edildi ve deney sonlandırıldı. Süre sonlarında antioksidan ölçümler için numuneler alındı. Bu işlemler üç kez farklı haftalarda tekrarlandı. Antioksidan vitaminler ve MDA analizi için gerekli ön işlemler yapılarak analizler yapıldı.

3.6. Örneklerin Analizleri

3.6.1. C Vitamini ve MDA Analizi

Kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücrelerin üzerine Krebs Ringer Hepes (KRH = 20 mM hepes, 128 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM MgSO_4 , 1,4 mM CaCl_2 pH = 7,4) tamponundan 2mL (37) ve 0.5 M HClO_4 'den 0.5 mL ilave edilerek çalkalandı ve ultrasonik su banyosunda bekletildi. Hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi. Askorbik asit ve MDA analizi Karatepe (38)'e göre HPLC 'de analiz edildi.

Analizler hareketli faz olarak 30 mM KH_2PO_4 - metanol (% 82,5 – 17,5; pH : 4) karışımında 250 nm'de İnertsil 5 μ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu kullanılarak akış hızı 1 mL/dakikada yapıldı. C vitamini için geri kazanım % 95, MDA için geri kazanım % 98.8 olarak bulundu.

3.6.2. A ve E Vitamini Analizi

A ve E vitamini analizi için ise; hücrelerin üzerine Krebs Ringer Hepes (KRH = 20 mM hepes, 128 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM MgSO_4 , 1,4 mM CaCl_2 pH= 7,4) tamponundan 2mL (37) ve 0,5 ml etil alkol ilave edilerek çalkalandı

ve ultrasonik su banyosunda bekletildi. Hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra, üzerine 0.3 mL n-hekzan ilave edildi ve karıştırılarak santrifüjlendi. Hekzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hekzan fazına ekstrakte edilmektedir. Santrifüj sonunda hekzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine tekrar 0.3 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hekzan fazı cam tüpteki hekzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hekzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalıntı 100 µL metanolde çözüldü (39). Bu çözelti HPLC ile analiz edildi. Örneklerdeki E vitamini 296 nm ve A vitamini 326 nm dalga boyunda İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu ve metanol hareketli fazında akış hızı 1 mL/dak. olacak şekilde analizlendi (40). A vitamini için geri kazanım % 92, E vitamini için ise % 96 olarak bulundu.

İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler, SPSS istatistik program ile yapıldı. Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler One-way Anova analizi LSD testi yapılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Elde edilen bulgular parametrelerin her birinde uygulama boyunca grupların kontrol grubu ile kıyaslarını gösterecek tablolar halinde verildi.

Maddelerle muamele edilmiş hücrelerin MDA, antioksidan vitaminler C, A, E düzeylerine ait karşılaştırmalar Tablo 4-2,3,4,5’de verilmiştir.

Maddelerle muamele edilmiş gruptaki canlı hücre sayılarının ortalamaları Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Hücrelerin uygulama süreleri ve doza göre canlılık durumları.

Gruplar	24s	24 s	48 s	48 s		24 s	24 s	48 s	48 s
n=3	7,5µM	15µM	7,5µM	15µM	n=3	7,5µM	15µM	7,5µM	15µM
K	3,83	3,83	2,33	2,33	K	3,83	3,83	2,33	2,33
L1	5,55	4,17	5,33	3,53	L2	7,33	1,83	10,66	4,53
L1-Cu	8,83	7,33	11,66	16	L2-Cu	14,16	15,53	16,50	31,26
L1-Ni	5,66	3,33	4,33	2,53	L2-Ni	5,17	8,00	4,66	2,16
L1-Co	5,33	4,17	5,33	3,33	L2-Co	7,66	2,50	5,00	2,66
L1-Zn	5,33	6,67	2,83	5,83	L2-Zn	6,16	4,30	5,17	2,50
L1-Mn	8,17	7,16	3,33	4,83	L2-Mn	7,5	4,00	5,50	2,83

4.1. Uygulamalardaki Farklı Gruplar Arası Karşılaştırmalar

4.1.1. MDA Düzeyleri

Gruplara ait ortalama MDA düzeyleri Tablo 4.2’de verilmiştir. MDA düzeylerinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

4.1.2. C Vitamini Düzeyleri

Gruplara ait ortalama C vitamini düzeyleri Tablo 4.3’de verilmiştir. C vitamin düzeylerinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Tablo 4.2. MDA (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri

a : p < 0.05; b : p < 0.01; c : p < 0.001

MDA (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)	MDA (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)
K	0,69±3E ⁻²	0,69±3E ⁻²	0,73±3,6E ⁻²	0,73±3,6E ⁻²	K	0,69±3E ⁻²	0,69±3E ⁻²	0,73±3,6E ⁻²	0,73±3,6E ⁻²
L1	0,71±2,3E ⁻²	0,77±8E ⁻²	0,84±0,11	0,76±9,7E ⁻²	L2	0,80±5,5E ⁻²	0,79±6,9E ⁻²	0,87±3,6E ^{-2a}	0,82±7,1E ⁻²
L1-Cu	0,87±0,14 ^a	0,79±0,12	0,86±9,5E ⁻²	0,86±0,10	L2-Cu	0,85±0,1 ^a	0,85±9,1E ^{-2a}	0,94±0,10 ^b	0,97±8,5E ^{-2c}
L1-Ni	0,69±5E ⁻²	0,74±3,9E ⁻²	0,82±5,9E ⁻²	0,77±8,1E ⁻²	L2-Ni	0,72±7,0E ⁻²	0,77±8,7E ⁻²	0,86±6,5E ⁻²	0,79±0,10
L1-Co	0,76±0,10	0,74±3,3E ⁻²	0,85±0,11	0,79±6,2E ⁻²	L2-Co	0,78±6,7E ⁻²	0,76±7,6E ⁻²	0,79±0,10	0,84±5,1E ⁻²
L1-Zn	0,72±6E ⁻²	0,73±5,6E ⁻²	0,77±2,0E ⁻²	0,73±4,6E ⁻²	L2-Zn	0,69±2,4E ⁻²	0,76±7,6E ⁻²	0,79±1,5E ⁻²	0,81±7,3E ⁻²
L1-Mn	0,77±7E ⁻²	0,78±6,9E ⁻²	0,91±0,2	0,84±7,3E ⁻²	L2-Mn	7,62±4,4E ⁻²	0,79±5,3E ⁻²	0,84±4,9E ⁻²	0,80±4,8E ⁻²

Tablo 4.3. C Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri

Vit C (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)	Vit C (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)
K	27,96±2,6	27,96±2,6	27,01±2,0	27,01±2,0	K	27,96±2,6	27,96±2,6	27,01±2,0	27,01±2,0
L1	25,73±0,5 ^a	26,19±1,6	24,71±2,1	22,82±1,5 ^c	L2	25,05±0,8 ^a	25,57±1,0 ^a	23,22±1,5 ^b	22,79±1,0
L1-Cu	25,75±0,6 ^a	25,69±0,4	23,09±0,6 ^b	22,85±1,3 ^c	L2-Cu	24,24±1,0 ^b	23,99±0,6 ^b	22,18±1,5 ^c	20,19±0,9 ^c
L1-Ni	25,84±0,6 ^a	26,13±1,3	25,42±1,4	24,63±1,1 ^a	L2-Ni	26,25±1,0	26,44±1,0	24,39±0,6 ^a	24,55±0,5
L1-Co	25,67±0,4 ^a	26,04±1,3	24,72±1,2	25,26±0,5	L2-Co	25,66±1,5	25,26±0,5 ^a	24,38±1,5 ^a	23,89±1,3
L1-Zn	26,51±1,2	27,04±2,2	26,11±0,9	25,27±0,9	L2-Zn	26,46±1,0	26,27±0,9	26,15±1,3	24,70±1,7
L1-Mn	25,90±1,1	25,98±0,7	26,37±1,9	24,33±1,0 ^a	L2-Mn	26,64±1,3	26,53±1,2	23,92±0,7 ^a	23,49±1,3

a : p < 0.05; b : p < 0.01; c : p < 0.001

4.1.3. A Vitamini düzeyleri

4.1.4. A Vitamini Düzeyleri

Gruplara ait ortalama vitamin A düzeyleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Vitamin A düzeylerinde grup karşılaştırmalardaki farklılıklar anlamlı bulunmuştur.

4.1.4. E Vitamini Düzeyleri

Gruplara ait ortalama E vitamin düzeyleri Tablo 4.5’de verilmiştir. E vitamini düzeylerinde grup kıyaslamalarında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir.

Tablo 4.4. A Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri

Vit A (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15µM)	Vit A (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)
K	7,49±1,34	7,49±1,34	6,23±8,7E ⁻³	6,23±8,7E ⁻³	K	7,49±1,34	7,49±1,34	6,23±8,7E ⁻³	6,23±8,7E ⁻³
L1	5,5±1,27 ^a	4,91±6,8E ^{-3b}	4,89±7,3E ⁻³	4,72±5,3E ^{-3a}	L2	6,22±1,51	4,38±1,33 ^b	4,38±9,4E ^{-3a}	3,41±1,4 ^b
L1-Cu	5,28±7,4E ^{-3a}	5,10±1,2 ^b	4,17±6,6E ^{-3b}	4,35±1,17 ^a	L2-Cu	4,77±2,3E ^{-3b}	4,17±1,56 ^c	3,23±6,6E ^{-3c}	3,05±7,9E ^{-3c}
L1-Ni	6,72±8,4E ⁻³	6,45±1,1	5,33±1,0E ⁻³	4,74±5,7E ^{-3a}	L2-Ni	6,39±4,8E ⁻³	5,69±6,4E ^{-3a}	4,30±5,0E ^{-3a}	4,72±2,8E ⁻³
L1-Co	7,01±8,4E ⁻³	6,69±7,6E ⁻³	4,77±9,2E ^{-3b}	4,87±6,9E ⁻³	L2-Co	5,57±6,8E ^{-3a}	4,33±9,0E ^{-3c}	4,32±9,6E ^{-3a}	3,95±6,5E ^{-3b}
L1-Zn	7,14±4,1E ⁻³	6,77±7,6E ⁻³	6,09±3,0E ⁻³	5,48±9,7E ⁻³	L2-Zn	6,73±6,5E ⁻³	6,11±6,3E ⁻³	5,39±7,9E ⁻³	5,12±8,2E ⁻³
L1-Mn	6,30±5,4E ⁻³	6,39±7,3E ⁻³	4,48±4,5E ^{-3b}	4,77±3,9E ^{-3a}	L2-Mn	5,64±1,1 ^a	5,12±4,2E ^{-3a}	4,24±9,8E ^{-3a}	4,73±9,1E ⁻³

a : p < 0.05; b : p < 0.01; c : p < 0.001

Not: Bu tablodaki ortalama±standart sapma değerleri E⁻² ile çarpılmış şekilde sunulmaktadır.

Tablo 4.5. E Vitamini (mg/L) Düzeylerinin Zamana ve Dozlara Göre Ortalama Değerleri

Vit E (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)	Vit E (n=3)	24 saat (7,5 µM)	24 saat (15 µM)	48 saat (7,5 µM)	48 saat (15 µM)
K	2,09±0,16	2,09±0,16	1,81±5,7E ⁻²	1,81±5,7E ⁻²	K	2,09±0,16	2,09±0,16	1,81±5,7E ⁻²	1,81±5,7E ⁻²
L ₁	1,87±0,48	1,75±0,25 ^a	1,41±0,13 ^b	1,40±8,1E ^{-2c}	L ₂	1,55±0,16 ^b	1,44±0,28 ^c	1,48±8,6E ^{-2b}	1,37±6,3E ^{-2c}
L ₁ -Cu	1,54±0,11 ^a	1,78±0,14 ^a	1,44±0,13 ^b	1,18±5,4E ^{-2c}	L ₂ -Cu	1,53±0,13 ^b	1,48±0,16 ^c	1,25±0,2 ^c	1,16±0,13 ^c
L ₁ -Ni	1,85±0,51	1,71±9,7E ^{-2b}	1,70±0,31	1,63±0,2 ^a	L ₂ -Ni	1,64±0,22 ^a	1,53±0,10 ^c	1,57±9,7E ^{-2a}	1,45±0,13 ^c
L ₁ -Co	1,88±0,12	1,87±0,11	1,63±4,9E ⁻²	1,51±9,3E ^{-2b}	L ₂ -Co	1,78±0,16	1,57±0,16 ^b	1,53±0,2 ^a	1,45±7,4E ^{-2c}
L ₁ -Zn	1,92±0,38	1,87±8,9E ⁻²	1,65±9,7E ⁻²	1,69±5,3E ⁻²	L ₂ -Zn	1,92±0,12	1,82±8,6E ⁻²	1,68±0,2	1,66±0,19
L ₁ -Mn	1,90±0,26	1,73±3,1E ^{-2a}	1,59±7,5E ⁻²	1,61±0,13 ^a	L ₂ -Mn	1,77±0,29 ^a	1,78±0,16 ^a	1,46±0,1 ^b	1,33±8,4E ^{-2c}

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrenel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrenel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır (24).

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranlarına zarar verirler ve değişik hastalıklarla etkilerini gösterirler. Organizmada bu bileşiklerin zararlı etkilerine karşı küçük molekül ağırlıklı radikal tutucuları ve enzimlerden oluşan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin reaktif yapıları ve çok kısa ömürlü olmaları doğrudan tayinlerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (41).

Bu araştırmada hücelere uygulaması yapılan Schiff bazı türevleri ve metal komplekslerinin bazı antioksidan ve oksidan parametrelerin düzeyleri üzerinde olan etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında farklı etkilere sahip oldukları görülmüştür.

MDA düzeylerinin kıyaslanması

Yapılan çalışmada kontrol grubu ile ligand ve metal komplekslerinin kıyaslamalarında MDA düzeylerinde istatistiksel farklılıklar gözlemlendi. (Tablo 4.2).

Tablo'ya bakıldığında L1-Cu, L2 ve L2-Cu gruplarında, MDA düzeylerinin kontrolden yüksek çıktığı görülmektedir. Bu sonuç bakır komplekslerinin lipit peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. Özellikle hücre sayılarına bakıldığında bakır komplekslerinin hücre ölümünü artırdığı görülmektedir.

C vitamini düzeylerinin kıyaslaması

C vitamini için Kontrol ile diğer grupların kıyaslamalarında, C vitamini düzeylerinin istatistiksel olarak değiştiği gözlemlendi (Tablo 4.3). Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi Zn kompleksleri hariç bütün maddelerin, C vitamini düzeylerinde istatistiksel olarak azalma meydana getirdiği görülmektedir.

A vitamini düzeylerinin kıyaslaması

Kontrol ile diğer grupların karşılaştırmalarında yine Zn grupları hariç, A vitamini (Tablo 4.4), düzeylerinde istatistiksel azalma gözlemlendi. Zn komplekslerinde de azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark görülmedi.

E vitamini düzeylerinin kıyaslaması

Kontrol ile diğer grupların karşılaştırmalarında yine Zn grupları hariç, E vitamini (Tablo 4.5), düzeylerinde istatistiksel azalma gözlemlendi. Zn komplekslerinde de azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark görülmedi.

Sonuç

Ölçülen biyokimyasal değerlere bakıldığında deneylerde kullanılan Schiff bazlarının ve bunun metal komplekslerinin farklı davranışlarda bulunduğu görülmektedir.

Serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyi ve GSH-Px enzim aktivitesinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olur (21,42,43).

Jeon ve diğ. (2002) antioksidan özellik gösteren maddeleri (naringin ve probukol) diyet ile tavşanlara verdiklerinde bu maddelerin plazma MDA ve A vitamini düzeyini etkilemediğini, E vitamini düzeyini ise, kullanımını azaltarak yükselttiğini gözlemişlerdir (44).

Brandt ve diğ. (1997) sürekli stres altındaki ratların plazma vitamin A düzeylerini ölçmüşler ve on günlük süreç içerisinde vitamin A düzeylerinin $p < 0.001$ düzeyinde azaldığını gözlemişlerdir (45).

Bölümümüzde yapılan bir çalışmada tiyosemikarbazon türevi ihtiva eden Schiff bazı türevi ve Cd(II) metal kompleksi ratlara yüksek dozlarda derialtına enjekte edildiğinde, Cd(II) metal kompleksinin oksidatif stres oluşturarak, serumda antioksidan vitaminlerden A ve E'nin düzeylerinde azalma, serum MDA düzeyinde ise yükselme meydana getirdiği, testis dokusunda ise hasar oluşturduğu görülmüştür (11). Yine başka bir çalışmada, bu Schiff bazı türevi ile Zn(II) ve Cu(II) metal kompleksleri deri altı uygulandığında, ligandın antioksidan parametreleri etkilemediği, Cu(II) kompleksinin Cd(II) kompleksinde olduğu gibi serum vitamin düzeylerini azaltıp, MDA düzeyini ve ayrıca eritrosit GSH-Px enzim aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Zn(II) kompleksinin ise her hangi bir oksidatif stres oluşturmadığı ve serum E vitamini düzeyinde ise bu vitaminin kullanımını azaltarak artışa neden olup bir antioksidan gibi davrandığı, fakat tüm bileşiklerin serumda metiyonin ve izolösin gibi bazı esansiyel amino asitlerin düzeylerini artırdığı ve karaciğer, böbrek ve adren dokularında her hangi bir hasar oluşturmadığı belirlenmiştir (12).

Bu çalışmada, ölçülen parametreler ve deney süresince canlı hücre sayılarına bakıldığında, özellikle Cu ve Zn kompleksleri daha çok dikkat çekmektedir.

Cu(II), farklı organların fonksiyonları ve normal gelişimi için esansiyeldir. Hipokupremiya (düşük bakır miktarı), erken doğanlarda düşük doğum ağırlığına sebep olmaktadır. Ayrıca bakır, lizil oksidaz, sitokrom oksidaz ve Zn-Cu süperoksit dismutaz gibi birçok enzimin fonksiyonu için gereklidir (46). Bakır, potansiyel bir hepatotoksin olarak bilinmektedir. Karaciğer hasarı oluşturması hücre membranı yağ asitlerinin dahil edilebileceği lipit peroksidasyonuna bir delil olabilir. Cu(II), diğer mekanizmalar ile birlikte, hemoglobin (Hb) ile etkileşim ve Haber-Weiss reaksiyonunda ferrik demirin

sübstitüsyonu ile lipid peroksidasyonunu başlatmaya sebep olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizleyebilir (47).

Karataş ve diğ. (2002) balıklarla yaptıkları bir çalışmada Cu(II) tuzu, bir tiyazol türevi ve bu bileşiğin Cu(II) kompleksinin serbest radikal ürettiğini, antioksidan özellik gösteren A, E, C vitaminlerinin doku konsantrasyonlarındaki önemli bir azalma ile gözlemişlerdir. Bulgularımız bu literatürler ile uyumludur (48).

Novelli ve diğ. (49) sıtmayı önleyici ilaçlarda Schiff bazlarının bazı metal komplekslerinin aktif oksijen ürettiğini Byrnes ve diğ. (50) ise tiyosemikarbazon-Cu kompleksinin oksidatif strese sebep olduğu savını ileri sürmüşlerdir. Güçlü bir antioksidan olan E vitamini düzeylerindeki azalma Cu kompleksinin oksidatif stres oluşturduğunun bir delili sayılabilir.

Antioksidan parametreler açısından bakıldığında Cu gruplarında ki en yüksek MDA düzeyi ile en düşük vitamin A ve E değerleri Cu komplekslerinin çalışılan antioksidan parametreleri en fazla etkilediğini düşündürmektedir.

Bu veriler ışığında Cu komplekslerinin ortamda oksidatif stres oluşturarak serbest radikal oluşumunu artırdığı ileri sürülebilir. Cu-kompleksinde Cu(II)'nin indirgenme-yükseltgenme potansiyelinin kompleksin indirgenme-yükseltgenme potansiyelini etkileyerek serbest radikal üretimini tetiklediği daha muhtemel görülmektedir. Özellikle L₂-Cu kompleksinde, kompleksin yapısına iki molekül ligand girmektedir. Buda aynı konsantrasyonda ki L₁ ve L₂ komplekslerine bakıldığında L₂ kompleksinde daha az bakır olacağı anlamına gelmektedir. Buradan ligandın yapısının en az bakır toksisitesi kadar etkili olabileceği sonucuna varılabilir.

Zn(II), vücuttaki farklı organların fonksiyonları ve düzenli gelişimi için gerekli olan bir eser elementtir. Çinko eksikliği negatif azot dengesi, psikiyatrik semptomlar, organizmanın savunma sisteminde zayıflama, yara iyileşmesinde gecikme ve gelişim bozukluğu ile görülebilir. Deney hayvanlarında, çinko eksikliğinin lenf dokusunda önemli etkilere sebep olduğu belirtilmiştir. Yapılan araştırmalar, çinkonun lenfosit hücrelerinin çoğalmasında ve hücre ürünlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (46).

Zn-komplekslerinde de aynı şekilde metalin vücut için gerekliliği ve düzenleyici etkisinin kompleksin davranışını etkilediği açıktır.

Yine bütün komplekslerin oksidatif stresi artırıcı yönde davrandıkları sonucuna varılabilir.

Schiff bazı türevlerinin araştırılan birçok farmakolojik özelliklerine ilave olarak araştırdığımız bu parametrelerinde literatür bilgisine katkıda bulunacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

- 1- R., Bakhtiar, E., Ochiai. 1999 Pharmacological application of inorganic complexes. *General Pharm.* 32; 525-540.
- 2- Liberta, A.E., West, D.X., 1992, Antifungal and Antitumour Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes, **Biomaterials**, 5, 121-126.
- 3- Z.,Y., Yang, R.,D., Yang, F.,S., Li, K.,B., Yu. 2000 Crystal Structure and Antitumor Activity of some Rare Earth Metal Complexes with Schiff Base. *Polyhedron*, 19; 2599-2604.
- 4- A., Das, M.,D., Trousdale, S., Ren, E.,J., Lien, 1999 Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 and Adeno Virus Type 5 by Heterocyclic Schiff Base of Aminohydroxy Guanidine Tosylate. *Antiviral Research.* 44; 201-208.
- 5- R., Fioravanti, M., Biava, S., Donnaramma, G.,C., Simonetti, A., Villa, A.,P., Puglia, D., Deiddo, C., Maullo, R., Pompei. 1996 Synthesis and Microbiological Evaluations of (N-Heteroaryl)Arylmethamines and their Schiff Base. *IL Farmaco*, 51(10); 643-652.
- 6- B., Sur, S.,P., Chatterjee, P., Sur, T., Maity, S., Roychoudhury. 1990 Studies on the Antiplasticity of Schiff Bases Containing 5-Nitrofurans and Pyrimidine. *Oncology*, 47; 433-438.
- 7- M.,L., Pires dos Santos, A.,F., Alairo, A.,S., Mangrich, A.,M.,C., Ferreira. 1998 Antioxidant and Prooxidant Properties of some di-Schiff Base Copper(II) Complexes. *J. of Inorg. Biochem.* 71; 71-78.
- 8- Cory, J.G., Cory, A.H., Rappa, G., Lorico, A., Liu, M.C., Lin, T.S., Sartorelli, A.C., 1995, Structure - Function Relationships for a New Series of Pyridine - 2 - Carboxaldehyde Thiosemicarbazones on Ribonucleotide Reductase Activity and Tumour Cell Growth in Culture and in vivo, *Adv. Enz.Regul.*,35,55-68.
- 9- Cory, J.G., Carter, G.L., Bacon, P.E., Tang, A., Lien, E.J. (1985) Inhibition of ribonucleotide reductase and L1210 cell growth by N-hydroxy-N'-aminoguanidine derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 34,1124-1130.
10. Z., Durackova, M.A., Mendiola, M.T., Sevilla, A., Valent. 1999 Thiohydrazone Copper (II) Complexes. The Relationship between Redox Properties and Superoxide Dismutase Mimetic Activity, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48; 109-116.

- 11- Öner H. , M. Karatepe, F. Karatas, J. Öner, İ. Yılmaz, A. Cukurovalı, “Effects on the Rat Testes of Thiosemicarbazone Derivative Schiff Base (4-(1-Phenylmethylcyclobutane-3-yl)-2-(2-Hydroxybenzylidenehydrazino) Thiazole) and its Cadmium (II) Complex.” *Cell Biochem. and Function*, 23(6), 427-433 (2005)
- 12- Karatepe, M., F. Karatas, Antioxidant, Pro-Oxidant Effect of the Thiosemicarbazone Derivative Schiff Base (4-(1-Phenylmethylcyclobutane-3-Yl)-2-(2 Hydroxybenzylidenehydrazino) Thiazole) and its Metal Complexes on Rats.” *Cell Biochem. And Function*, 24(6), 547-554 (2006)
- 13- Bulut, H., M. Karatepe, H. Temel, M. Şekerci, M. Koparır, “Studies on the Antiviral and Cytotoxic Activity of Schiff bases derived from 1,2-bis-(o-and p-aminophenoxy)ethane and salicylaldehyde,” *Asian Journal of Chemistry*, 14(7), 2793-2796 (2005).
- 14- H., Temel, S., İlhan, M., Sekerci, R., Ziyadanogullari 2002 The synthesis and spectral characterization of new Cu(II), Ni(II), Co(III), and Zn(II) complexes with Schiff base. *Spectroscopy Letters*. 35 (2); 219-228.
- 15- V., Çakır, S., İlhan, M., Sekerci, R., Ziyadanoğullari. 2003 Spectroscopic and conductance studies of new transition metal complexes with a Schiff base derived from 4-methoxybenzaldehyde and 1,2-bis(p-aminophenoxy)ethane. *Spectroscopy Letters*. 36(5-6); 429-440.
- 16- Stoian, I., Oros, A., Moldoveanu, E., 1996, Apoptosis and Free Radicals, *Biochem. and Mol. Med.*, 59, 93-97.
- 17- Wolf, R., Wolf, D., Ruocco, V., 1998, Vitamin E : The Radical Protector, *J. of Eur. Academy of Derm. and Ver.*, 10, 103-117.
- 18- Betteridge, D.J., 2000, What is Oxidative Stress?, *Metabolizm*, 49, 3-8.
- 19- Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001, Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System, *Free Rad. Biol. and Med.*, 31(11), 1287-1317.
- 20- Kılınç, K., 1985, Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri, *Biyokimya Dergisi*, 10 : 60-89.
- 21- Diplock, A.T., 1991. Antioxdant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *Am. J. Chim Nutr.*, 53: 1895-1935.
- 22- Halliwell, B., Gutteridge, W.M.C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Medicine Press, 246-351.

- 23- Repine, J.E., 1991, Oxidant - Antioxidant Balance : Some Observation From Studies of Ischemia Reperfusion in Isolated Perfused Rat Hearts, *The Am. J. of Med.*, 91, 45-53.
- 24- Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., 2001, Oxidative Stress and Antioxidants in Epilepsy, *Clinica Chimica Acta*, 303, 19-24.
- 25- Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U., 2000, Serbest Radikaller, *Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi*, 1, 52-58.
- 26- Köse, K., Doğan, P., 1992, Lipid Peroksidasyonu, *Erciyes Üniv. Tıp Dergisi*, Ek 1, 340-350.
- 27- Nikolai, E.P., Tatyana, V.L., Tatyana, A.K., Lowell, P.K., 2001, Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction : Antioxidants or Pro - Oxidants? *Free Rad. Bio. and Med.*, 31(3), 398-404.
- 28- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in Health and Disease, *J. Clin. Pathol.*, 54 (3), 176-86.
- 29- Kennedy, T.A., Liebler, D.C., 1991. Peroxyl Radical Oxidation of α -Caratone: Formation of α -Caratone Epoxides, *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 290-295.
- 30- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı, Palme Yayıncılık, 151-187, Ankara.
- 31- Emerk, K., Onat, T., 1997, *Temel Biyokimya*, 2. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık ve Tic. Ytd. Şti., İzmir - Türkiye.
- 32- Akkuş, İ., 1995, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya.
- 33- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., Blanco, I., Millan, I., Rojas-Hidalgo, E., 1998, Carotenoids, Retinol and Tocopherols in Patients with Insulin - Dependent Diabetes Mellitus and Their Immediate Relatives, *Clin. Sci. (Colch.)*, 94, 2, 189-195.
- 34- Offing, E.O., Martelli, S., 1997, Steochemistry and Antitumour Activity of Platinum Metal Complexes of 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones, *Transition Metal Chem.*, 22, 263-69.
- 35- Ferrari, B.M., Capacchi, S., Pelosi, G., Reffo, G., Tarasconi, P., Albertini, R., Pinelli, S., Lungni, P., 1999, Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of Helicin Thiosemicarbazone Monohydrate and a Copper (II) Complex of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone, *Inorganica, Chimica Acta*, 286, 134-141.
- 36- Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yashimura, Y., Kawada, J., Kubota, S., 1990, Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4-Triazole-3-Thiones and Thiosemicarbazones on Iodide Uptake by The Mouse Thyroid; The Relationship

- Between Their Structure and Antithyroid Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, 38 (9), 2595-6.
- 37- Li, X., Huang, J., May, J.M., 2003, Ascorbic acid spares α -tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 656-661.
- 38- Karatepe, M. "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC/UV." *LC-GC North America*. 22, 362-5 (2004).
- 39- Çetinkaya, N., and Özcan, H., 1991. Investigation of Seasonal Variations in Cow Serum Retinol and β -Carotene by High Performance Liquid Chromatographic Method, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 100 A, No: 4, pp. 1003-1008.
- 40- Catignani, G.L., 1983. Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plasma by Liquid Chromatography, *Clin. Chem.*, 29(4), 708-712.
- 41- Matez, J.M., Gomez, P.C., Casto, N.I., 1999, Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clin. Biochem.*, 32, 595-603.
- 42- Bott, A.B., Green, M.A., 1991, Effect of Glutathione Depletion on The Biodistribution of Cu (PTSM) in Rats, *Int. J. Rad. Appl. Inst. B.*, 18 (18), 865-9.
- 43- Novelli, E.L., Silva, A.M., Monteiro, J.P., Sacomani, L.B., Novellif, J.L., 1997, Free Radical Production by Azomethine H : Effects on Pancreatic and Hepatic Tissues, *Free Radic. Res.*, 26 (4), 319-324.
- 44- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S., 2002, Comparison of Antioxidant Effects of Naringin and Probuco in Cholesterol-Fed Rabbits, *Clin. Chimica Acta*, 317, 181-190.
- 45- Brandt, R.B., Doyle, B.A., Chan, W., Poland, J.L., Seibel, H.R., 1997, The Effect of Running Stress on Plasma Vitamin A Levels in Rats, *Food and Chemical Tox.*, 35, 459-463.
- 46- Al-Bader, A., Mathew, T.C., Khoursheed, M., Asfar, S., Al-Sayer, H., Dashti, H.M., 2000, Thioacetamide Toxicity and Spleen : Histological and Biochemical Analysis, *Anat. Histol. Embryol.*, 29, 3-8.
- 47- Sokol, R.J., Devereaux, M.W., Traber, M.G., Shikes, R.H., 1989, Copper Toxicity and Lipid Peroxidation in Isolated Rat Hepatocytes : Effect of Vitamin E., *Pediatric Res.*, 25 (1), 55-62.
- 48- Karataş, F., Obek, E., Karatepe, M., Saydam, S., Saatçı, Y., 2002, An Investigation of Vitamin Levels of The Carp (*Cyprinus Carpio L.*) Muscle Tissue Subjected to Thiazole Copper (II) Complex, *Pak. J. of Biological Sci.*, 5(11), 54-56.
- 49- Novelli, E.L., Silva, A.M., Novellif, J.L., Curi, P.R., 1995, Reactive Oxygen Generation by Azomethine H : A New Antimalarial Drug., *Can. J. Physiol. Pharma*, 73 (8), 1189-1194.

- 50- Byrnes, R.W., Mohan, M., Antholine, W.E., Xu, R.X., Petering, D.H., 1990, Oxidative Stress Induced by a Copper Thiosemicarbazones Complex, *Biochemistry*, 29, 7046-7053.

ÖZGEÇMİŞİM

01.07.1983 tarihinde Elazığ' da doğdum. 1997 'de Nahit Ergene İlköğretim Okulu, 2000' de Mehmet Akif Ersoy Lisesi ve 2004 yılında ise Fırat Üniversitesi Kimya Bölümünü bitirdim.

Daha sonra F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde Kimya (biyokimya) ana bilim dalında Yüksek Lisans eğitime başladım. Üniversite mezunları için açılan polislik sınavlarına girip, 2006 yılında İstanbul' da polis memuru olarak göreve başladım ve halen bu görevi devam ettirmekteyim.

Haluk ÇAKMAK