

**BAZI İLAÇ ETKİN MADDELERİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTE/KAPASİTELERİNİN ÇEŞİTLİ
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE KEMOMETRİK
HESAPLAMALARLA SINIFLANDIRILMASI**

Onur ŞENOL

Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi - 2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI İLAÇ ETKİN MADDELERİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTE/KAPASİTELERİNİN ÇEŞİTLİ
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE KEMOMETRİK
HESAPLAMALARLA SINIFLANDIRILMASI**

Onur ŞENOL

**Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**



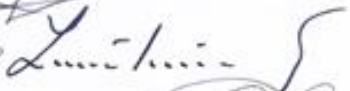


**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI İLAÇ ETKİN MADDELERİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTE/KAPASİTELERİNİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE KEMOMETRİK HESAPLAMALARLA
SINIFLANDIRILMASI

Onur ŞENOL

Tez Savunma Tarihi :

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Reşat APAK 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zühal GÜVENALP 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Tijen NALBANTOĞLU ÖNKOL 
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MILOĞLU 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Antioksidan	4
2.2. Reaktif Oksijen Türleri	5
2.3. Reaktif Azot Türleri	5
2.4. Antioksidan Bileşikler	7
2.5. Oksidatif stres kaynaklı hastalıklar	7
2.5.1. Kardiyovasküler rahatsızlıklar	7
2.5.2. Merkezi Sinir Sistemi Rahatsızlıkları	8
2.5.3. Kanser Oluşumu.....	9
2.5.4. Antioksidan Etki Mekanizması.....	9
2.6. Kolinesteraz	10
2.6.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri:	11
2.7. Lipid Peroksidasyonu.....	11
2.8. Antioksidan Ölçüm Yöntemleri	12
2.8.1. Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi	12
2.8.1.1. Avantajları.....	13
2.8.1.2. Dezavantajları	14

2.8.2. FRAP Yöntemi.....	14
2.8.2.1. FRAP Yöntemi Avantajları.....	15
2.8.2.2. Dezavantajları	15
2.8.3. ABTS/TEAC Yöntemi	15
2.8.3.1. ABTS Yöntemi Avantajları	16
2.8.3.2. ABTS Yöntemi Dezavantajları	16
2.8.4. DPPH Yöntemi	16
2.8.4.1. DPPH Avantajları	18
2.8.4.2. Dezavantajları	18
2.9. Kemometri	19
2.9.1. Çoklu Kalibrasyon Yöntemleri	19
2.9.2. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (PLS)	20
2.10. Çalışmada Kullanılan İlaçlar.....	24
2.10.1. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyon ve Etkileri.....	24
2.10.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörleri.....	25
2.10.2.1. Kaptopril	26
2.10.2.2. Enalapril	27
2.11. Peptit Yapılı Olmayan Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri	27
2.11.1. Kandesartan.....	29
2.11.2. Eprosartan	29
2.11.3. Irbesartan.....	30
2.11.4. Losartan.....	31
2.11.5. Olmesartan	32
2.11.6. Telmisartan.....	33
2.11.7. Valsartan	33

2.12. β -Adrenerjik Reseptör Agonistleri.....	34
2.12.1. β_2 Seçici Adrenerjik Reseptör Agonistleri	34
2.12.1.1. Terbutalin	35
2.12.1.2. Formoterol.....	36
2.12.1.3. Salmeterol	37
2.12.1.4. Ritodrin	38
2.12.1.5. Salbutamol	39
2.12.1.6. Ebselen.....	40
2.13. Spektroskopik Yöntemler	41
2.13.1. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri	42
2.13.2. Elektromanyetik Spektrum Diagramı	43
2.13.3. Işığın Absorplanması	43
2.13.4. Atomik Absorpsiyon Spektrumları	44
2.13.5. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	44
2.13.6. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar	47
2.13.7. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri.....	47
3. MATERYAL VE METOD.....	49
3.1. Antioksidan Kapasite Tayininleri	49
3.2. Çalışmada Kullanılan İlaç Etkin Maddeleri.....	49
3.3. AChE ve BuChE İnhibisyon Aktivitesi Tayininleri	50
3.4. Aletler ve Cihazlar	51
4. BULGULAR	52
4.1. CUPRAC Antioksidan Tayin Yöntemi.....	52
4.2. ABTS Antioksidan Tayin Yöntemi	54
4.3. FRAP.....	56

4.3.1. Lipid Peroksidasyonu.....	58
4.4. Anti-kolinesteraz Aktivite.....	59
4.5. Kemometrik Analizler.....	60
4.5.1. Hiyerarşik Küme Analizi	60
4.5.2. Kısmi En Küçük Kareler – Diskriminant Analizi (PLS-DA)	61
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70
EKLER.....	83
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	83
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	84

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında ve akademik kariyerimin tamamında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı ve şukranlarımı sunarım.

Antioskidan aktivite çalışmalarına rehberlik eden, her zaman ufkumu aan değerli hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a saygı ve şukranlarımı sunarım.

Deney prosedürlerini hazırlamamda bana yardımcı olan Analitik Kimya anabilim dalı ğretim ye yardımcısı Arş. Gör. Emrah YAMAN'a, spektrofotometrik ölçümlerde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na ve asetil kolinesteraz aktivite çalışmalarında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Kadir zden YERDELEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca yanımda olan ve olmaya devam edecek olan değerli eşim Berna ÖZMEN şENOL'a, sevgili ailem Yücel ve Nihal Fikren şENOL'a ve evimizin yeni yesi Almila bebeğimize sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Onur şENOL

ÖZET

Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Antioksidan Aktivite/Kapasitelerinin Çeşitli Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kemometrik Hesaplamalarla Sınıflandırılması

Amaç: Antioksidan özellik gösterebileceği düşünülen farklı ilaç etkin maddelerinin in-vitro antioksidan, asetilkolinesteraz ve lipid peroksidasyon özelliklerinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi ve ölçülen değerlere göre kemometrik sınıflandırma yapılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Antioksidan deneylerinde troloks referans maddesinin CUPRAC, FRAP ve ABTS radikallerine vermiş olduğu yanıtlar belli derişim aralıklarında hesaplanmış ve verilen yanıt karşılık derişim grafikleri çizilmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntemler ilaç etkin madesi numunelerine uygulanmış ve örneklerin troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Lipid peroksidasyon inhibisyonu deneyinde ilaçların eklendiği numunedeki malondialdehit miktarı spektroskopik ölçümlerle saptanmıştır. Anti kolinesteraz aktivite çalışmasında ise donepezil referans maddesine karşı yüzde anti kolinesteraz aktivite 15 ilaç için saptanmış ve değerler MATLAB programına aktararak kemometrik sınıflandırılması ve kategorizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: İncelenen sonuçlara göre en yüksek antioksidan kapasite β agonistleri olan terbutalin, fomoterol, salmaterol, salbutamol ve ritodrin etkin maddelerinde gözlenmiştir. Lipid peroksidasyon çalışmalarında en yüksek inhibisyon düzeyi kaptopril ve enalapril etkin maddelerinde saptanmıştır. Anti kolinesteraz aktivite deneylerinde ise en yüksek değerler irbesartan ve ebselen molekülleri için belirlenmiştir.

Sonuç: Yapılan çalışma sonucunda ilaç etkin maddelerinin in-vitro antioksidan, antikolinesteraz ve lipid peroksidasyon değerleri belirlenmiş ve kemometrik yöntemlerle ilaç grupları sınıflandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite, asetilkolinesteraz aktivite, kemometri, lipid peroksidasyonu

ABSTRACT

Determination of Antioxidant Activity/Capacity of Some Pharmaceutical Formulation with Several Methods and Classify Pharmaceuticals by Chemometric Calculations

Aim: It is aimed to evaluate in-vitro antioxidant, anticholinesterase and lipid peroxidation of different pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods and establish a chemometric classification in accordance with obtained data.

Material and Method: In antioxidant activity assays, response of trolox reference against ABTS, CUPRAC and FRAP radicals were calculated in different concentration range and absorbance against concentration graphs were plotted. After that developed method were applied onto real pharmaceuticals and trolox equivalent antioxidant capacity of real samples were measured. In Lipid peroxidation inhibition assay, Malondialdehyde level of each pharmaceutical were determined by spectrophotometric methods. Furthermore, Donezepil equivalent anticholinesterase activity were evaluated for 15 different pharmaceutical and data were transferred to MATLAB software programme for chemometric classification and charecterisation.

Results: According to the data, the highest measured antioxidant activity value belonged to β agonists which are terbutalin, fomoterol, salmaterol, salbutamol and ritodrin. The highest value for lipid peroxidation inhibition were observed in kaptopril and enalapril. In addition to this, The highest value were reported from ebselen and irbesartan in anticholinesterase activity experiments.

Conclusion: According to the results, in-vitro antioxidant, antikolinesterase and lipid peroxidation inhibition levels of each pharmaceuticals were determined and drug groups were classified with respect to the chemometric methods.

Key Words: Antioxidant activity, asetilcholinesterase activity, chemometry, lipid peroxidation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit)
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AChE	: Asetilkolinesteraz
AT₁	: Anjiyo Tensin I
COPD	: Kronik Obstruktif Pulmoner Hastalık
DMAA	: Düşük Molekül Ağırlığına Sahip Antioksidan
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-Pikril-Hidrazil
FRAP	: Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GSH	: Glutasyon
HCA	: Hiyerarşik Küme Analizi
IR	: Infrared
KOAH	: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığının
MDA	: Malondialdehit
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PCA	: Temel Bileşenler Analizi
PLS	: Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi
PLS-DA	: Kısmi En Küçük Kareler – Diskriminant Analizi
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TBA	: Tiyobarbitürik Asit

TEAC	: Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TPTZ	: 2,4,6 Tripidil-S-Triazin
UV	: Ultra Viyole
UV-Visible	: Ultraviyole-Görünür Bölge Absorpsiyon



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PLS izdüşüm projeksiyonu.....	20
Şekil 2.2. Kaptopril etkin maddesinin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.3. Enalapril etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.4. Kandesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.5. Eprosartan etkin maddesinin kimyasal yapısı	30
Şekil 2.6. Irbesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2.7. Losartan etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 2.8. Olmesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı	32
Şekil 2.9. Telmisartan etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	33
Şekil 2.10. Valsartan etkin maddesinin kimyasal yapısı	34
Şekil 2.11. Terbutalin etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 2.12. Fomoterol etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	37
Şekil 2.13. Salmeterol etkin maddesinin kimyasal yapısı	38
Şekil 2.14. Ritodrin etkin maddesinin kimyasal yapısı	39
Şekil 2.15. Salbutamol etkin maddesinin kimyasal yapısı	40
Şekil 2.16. Ebselen etkin maddesinin kimyasal yapısı.....	41
Şekil 2.17. Elektromanyetik dalga	43
Şekil 2.18. Elektromanyetik spektrum bölgeleri	43
Şekil 2.19. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonel enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı.....	45
Şekil 2.20. Absorblayan bir çözeltiye giren P0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması	46
Şekil 4.1. Derişime karşılık absorbans grafiği.....	53
Şekil 4.2. Derişime Karşılık yüzde inhibisyon grafiği	55

Şekil 4.3. Derişime karşılık absorbans grafiği	57
Şekil 4.4. Hiyerarşik küme analizi dendogramı.....	60
Şekil 4.5. PLS-DA skor grafiği.....	62



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Antioksidan kapasite tayininlerinde kullanılan kimyasal maddeler	49
Tablo 3.2. Çalışmada incelenen ilaç etkin maddeleri.....	50
Tablo 3.3. AChE ve inhibisyon aktivitesi tayininlerinde kullanılan kimyasal maddeler.....	50
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	51
Tablo 4.1. Troloks derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri	52
Tablo 4.2. Kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri	53
Tablo 4.3. CUPRAC yöntemi için ortalama eşdeğer troloks miktarları	53
Tablo 4.4. Derişime karşı gelen ortalama inhibisyon değerleri	54
Tablo 4.5. Kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri	55
Tablo 4.6. ABTS yöntemi için ortalama eşdeğer troloks miktarları	55
Tablo 4.7. Derişime karşı gelen ortalama absorbans değerleri	56
Tablo 4.8. Kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri	57
Tablo 4.9. Ortalama eşdeğer troloks miktarları.....	57
Tablo 4.10. Yüzde lipid süpürme gücü	58
Tablo 4.11 Yüzde antikolinesteraz inhibisyon değerleri.....	59
Tablo 4.12. PLS-DA istatistiki değerleri.....	61
Tablo 4.13. PLS-DA regresyon modeli bileşenleri	61
Tablo 4.14. Yöntem korelasyon matrisi	62

1. GİRİŞ

Serbest radikal olarak da adlandırılan ve kararlı olmayan moleküllerin yıkıcı etkilerinden hücreleri koruyan bileşikler antioksidan bileşikler olarak adlandırılır. Antioksidan bileşiklere β -karoten, likopen, vitamin C, E, A, kersetin örnek gösterilebilir.¹ Bu tür bileşikler serbest radikalleri stabilize eder ve olası zararlarını ortadan kaldırırlar. Oksidasyon tepkimelerine neden olan moleküllerin etkilerinin azaltılması veya oksidasyonun engellenmesi işlemlerine de antioksidan denir. Oksidasyon, elektronların bir atom ya da molekülden ayrılmasını sağlayan kimyasal tepkimelerdir. Oksidasyon tepkimeleri sonucunda serbest radikaller üretilir ve bunun devamında zincirleme tepkimeler meydana gelerek canlı hücrelere zarar verir. Antioksidanlar bu zincirleme tepkimede serbest radikali ortadan kaldırarak durdurur ve radikal yerine kendisi okside olarak oksidasyon tepkimesini gerçekleştirir. Bu sebeple, antioksidan bileşikler genellikle tiyoller, askorbik asit ve polifenoller gibi indirgeme ajanlarını içerirler.¹

Oksidasyon tepkimeleri yaşam için hayati öneme sahip olmasına rağmen zararlı etkileri de olabilmektedir. Bu yüzden, bitkiler ve hayvanlar kompleks sistemler oluşturmuşlardır ve çok farklı tipte antioksidanlara sahiplerdir (glutatyon, E ve C vitamini ile katalaz, süperoksit dismutaz ve farklı peroksidaz enzimleri vb). Normalden düşük seviyede antioksidan molekülünün bulunması ve antioksidan enzim inhibisyonu oksidatif stres meydana getirir. Bunun sonucunda da hücre hasarı veya hücre ölümü meydana gelir.

Oksidatif stres birçok önemli hastalığın sebebi olduğundan dolayı antioksidan moleküllerin etkisi farmakolojik olarak geniş bir biçimde incelenmektedir. Özellikle, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar oksidatif stresin en önemli inceleme konularını oluşturmaktadır. Fakat bazı hastalıklarda oksidatif stresin sebep mi yoksa sonuç mu olduğu net olarak açıklanamamıştır. Birçok hastalığın önlemesi amacıyla bazı antioksidan bileşikler gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. İlk yapılan çalışmalar

gıda katkı maddesi olarak kullanılan antioksidan bileşiklerin sağlık yönünden faydalı olduğu belirtilse de daha sonra yapılan çalışmalar ile bunların çok önemli bir yararının olmadığı hatta aşırı kullanımının zararlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte doğal antioksidanlar endüstride, gıda ve kozmetikte, kauçuk ve petrol endüstrisinde degradasyonu önlemede de kullanılmaktadır.²

Yapılan bu çalışmada antioksidan özellik gösterebileceği düşünülen farklı ilaç etkin maddelerinin tesbit edilmesi, daha sonra öngörülen farmasötik preparatların in-vitro antioksidan, asetilkolinesteraz ve lipid peroksidasyon özelliklerinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi ve bu ilaç etkin maddelerinin ölçülen antioksidan, lipid peroksidasyon ve asetil kolinesteraz değerlerine göre kemometrik olarak sınıflandırılarak bu etkin maddelere ait bir indeksin oluşturulması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte, ilaç etkin maddelerinin primer terapötik hedeflerinden farklı özelliklerinin saptanması ve bu sekonder terapötik etkilerden faydalanarak farklı hastalıkların tedavisinde kullanılması için ön fikir elde edilmesi ile yeni türevlendirilen bileşiklerin hızlı, basit ve tekrarlanabilir yöntemlerle aktivite tayinlerinin yapılarak aynı özellikteki diğer ilaçlarla karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Yapılan çalışma bu yönleriyle hem yeni geliştirilen moleküllerin aktivite tayinlerinin gerçekleştirilmesi, hem de daha önce sentezlenmiş moleküllerin farklı özelliklerinin saptanması ve bu özelliklerin anlamlı bir fark yaratıp yaratmadığının matematiksel olarak açıklanmasına dayanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antioksidan

Yükseltgemeye sebep olan bileşiğe oranla çok daha düşük derişimde olup oksidasyon tepkimelerini anlamlı derecede azaltan bileşiklere antioksidan denir. Normalde bir bileşğin antioksidan olarak tanımlanabilmesi için 100/1 derişiminde olması gerekmektedir. Antioksidan bileşik ile serbest radikalın meydana getirdiği tepkime antioksidan aktivite olarak tanımlanır. Antioksidan kapasite ise antioksidan bileşiklerden oluşan bir karışımın radikalle yaptığı tepkime olarak tanımlanır. Antioksidan aktivite tek bir antioksidan molekülünün serbest radikalle yaptığı tepkime hızından belirlenirken antioksidan kapasite ise süpürülen serbest radikal miktarından belirlenir.³

Toksik oksijen türleri/serbest radikal üretebilme potansiyeline sahip tepkimeler gerçekleştirebilen kimyasal bileşiklere pro-oksidanlar denir. Bu türleri yok eden, süpüren, davranışlarını tersine çeviren ya da etkilerini baskılayan bileşiklere ise antioksidanlar denir. Normal bir hücrede, prooksidanlar ile antioksidanlar denge halindedir. Fakat bu denge oksidan türleri üretimindeki artış ya da ortamdaki antioksidan bileşiklerin azalmasına bağlı olarak pro-oksidanlar lehine bozulabilir. Bu durum oksidatif stress olarak adlandırılır ve hücreye ciddi biçimde hasar verir. Birçok hastalığın etipatogenezinde oksidatif stres rol almaktadır.⁴⁻⁷

Son yıllarda, kontrol edilemeyen oksidatif stresi engellemeye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar aterosikleroz, karsinogenez, nörodejeneratif rahatsızlıklar, kronik enflamasyon hastalıkları, radyasyon hasarı, yaşlanma ve diğer patobiyolojik hastalıkların başlangıcında ve gelişme evrelerinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur.⁴⁻⁹

Oksidanlar ve serbest radikaller çok kısa bir yarı ömre sahiptirler. Bu yüzden çok reaktif bileşikler olup DNA, lipidler ve proteinler gibi makromoleküllere zarar verici

etkileri vardır. Bu türler reaktif oksijen türevli (ROS) veya reaktif azot türevli olabilmektedir (NOS). ROS türleri süperoksit (O_2^-), hidroksil (HO^\cdot), hidroperoksil (HO_2^\cdot), peroksil (ROO^\cdot) ve alkoksiller (RO^\cdot) ile serbest radikal olarak hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), ozon (O_3), ve singlet oksijen (1O_2)'dir. Azot türevli reaktif türler ise nitric oksit (NO), peroksinitrit ($ONOO^-$), azot dioksit (NO_2) ve dinitrojen trioksit (N_2O_3)'tür.¹⁰

2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Ekzojen reaktif oksijen türü kaynakları elektromanyetik radyasyon, kozmik radyasyon, sigara dumanı, egsoz gazı, Ultra Viyole (UV) ışınları, ozon, ve kısa dalga boyundaki elektromanyetik ışınlardır. Endojen reaktif oksijen türü kaynakları ise mitokondriyel elektron taşıma zinciri, fagositoz, peroksizomda yağların beta-oksidasyonu, amino asitlerin oto oksidasyonu katekolaminler, hemoglobin iskemi reperfüzyonudur. Süperoksit radikalleri hücrel genetik mekanizmaya önemli bilgilerin sinyalleme ve iletişiminden sorumlu metabolitleri düzenlemede görev alır.¹¹ Stres, toksinler, doku yaralanmaları, ilaçlar ve fazla miktarda spor yapma sonucu O_2^- radikalinin aşırı düzeyde artmasına ve buna bağlı olarak birçok kronik enflamasyonun ortaya çıkmasına sebep olur.^{7,12} Hidroksil radikali 10^{-5} yarılanma ömrüne sahip zararlı etkisi olan bir başka radikaldir. Haber-Weiss tepkimesi ile H_2O_2 ve O_2^- tepkime sonucu oluşur.¹³ Bazı HO^\cdot radikalleri fagositik hücrelerdeki $HOCl$ vasıtasıyla üretilirler. H_2O_2 zayıf düzeyde reaktif ve hücre zarından kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. HO^\cdot 'ya dönüşerek hücre zarının farklı bölgelerine saldırır. Bu radikal ayrıca geçiş metallerinin varlığında farklı serbest radikallerin oluşumu reaksiyonlarında da rol alır.¹⁴

2.3. Reaktif Azot Türleri

Azot türevi olan reaktif türler içinde en önemlisi nitrik oksit molekülüdür. Molekül ağırlığı 30 Dalton olan molekül dünya üzerindeki en küçük on molekülden birisidir. İlk

başlarda önemsiz bir kirlilik olarak bilinen NO bileşiğinin birçok hastalığın altında yatan etmenlerden birisi olduğu rapor edilmiştir.¹⁵⁻¹⁷

NO oksidasyon, substitüsyon ve zincirleme tepkimelerine hızlı bir şekilde girebilmektedir. Özellikle hücre içindeki tiyoller olmak üzere birçok bileşiğin yapısında özellikle düşük molekül ağırlığına sahip glutatyon ve sistein gibi moleküllerde NO grubu bulunur ve bu hedef grup birçok tepkimenin başlamasını sağlar.¹⁸ Bu yüzden çift tarafı keskin bir bıçak gibidir ve azlığı da çokluğu da vücutta pek çok rahatsızlığın ortaya çıkmasına sebep olur. Bu rahatsızlıklar iskemi, gastrointestinal sistem (GİS) rahatsızlıkları, akalazyaya, Hirschprung's sendromu, hipertropik pilorik stenosis olarak sıralanabilir.¹⁹

Peroksinitrit (ONOO^-) bir diğer güçlü oksidan moleküldür. Tirozin nitrillemesi, tiyol oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA sarmalının kırılımı, guanozin nitrillemesi/oksidasyonu ve hücre ölümlerine sebebiyet vermektedir. (ONOO^-) moleküllerinin yoğun NO ortamında verdikleri tepkime sonucu NO_2 açığa çıkmasını sağlarlar. Daha sonra NO_2 molekülleri N_2O_3 'e dönüşürler ve bu da nitrozatif stresi oluşturur.²⁰

Hücre içindeki toplam ROS ve RNS türlerinin üretimi aşırı miktarda arttığında ve antioksidan bileşiklerin sayısı düşük kaldığında oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar. Bu stres şartları hafif olabileceği gibi ciddi bozukluklara da sebebiyet verebilirler. Oksidatif stresin lipid peroksidasyonu, Deksiriboz Nükleik Asit (DNA) ve protein yıkımı gibi çeşitli yıkımlara sebep olduğu ve bu yıkımlar sonucunda da ciddi rahatsızlıkların meydana geldiği yapılan bir çok çalışma ile rapor yapılmıştır. Orta düzey oksidatif stres ise hücrelerin apoptosis ile yenilenmesine, DNA'nın kendini onarmasına ve dokuların korunmasına olanak tanıdığı için yararlı olabileceği belirtilmektedir.²¹⁻²⁴

2.4. Antioksidan Bileşikler

ROS ve RNS'lerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak ve bu bileşikleri ortadan uzaklaştırmak için çeşitli antioksidan koruyucu sistemler vücutta yer almaktadır. Bu antioksidanları 3 farklı grupta inceleyebiliriz. İlk grup antioksidanlar O_2^- radikalini sönmüleme, H_2O_2 bozunmasını sağlama ve metal iyonlarını zararlı etkilerini engellemeden sorumludurlar. Antioksidan enzimler (süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz) ile bazı protein ve mineraller bu gruba dahildirler.²⁵⁻²⁸ İkinci grup antioksidanlar süpürücü etkiye sahiptirler ve oksidan molekülleri süpürerek ortamdaki uzaklaştırırlar. Bu sayede oksidan/antioksidan dengesinin korunmasına yardımcı olurlar. Glutatyon (GSH), C vitamini, ürik asit, albümin, billurbin, tokoferol, karotenoidler ve flavonoidler bu gruba dahil bileşiklerdir. Genelde vücut tarafından sentezlenmeyen günlük diyetle vücuda alınan bileşiklerdir. Özellikle lipid peroksidasyonunu engellemede rol oynarlar.^{29, 30} Üçüncü gruptaki antioksidanlar ise DNA,³¹ oksidasyona uğramış lipidler ve proteinleri onarmakla sorumlu olan enzimlerdir. Lipaz, proteaz, DNA onarım enzimleri, transferaz ve metiyonin sulfoksit reduktaz enzimleri bu grupta ki antioksidanlardır.³²

2.5. Oksidatif stres kaynaklı hastalıklar

2.5.1. Kardiyovasküler rahatsızlıklar

Epidemiyolojik çalışmalar özellikle C ve E vitaminlerinin kardiyovasküler rahatsızlıkların önlenmesinde koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir. C vitamini eksikliğinin yüksek tansiyon ve koroner sendroma sebep olduğu rapor edilmiştir. Taddei ve arkadaşlarının³³ yapmış olduğu çalışmada düşük C vitamini seviyesinin tip III RNS türlerini artırdığı ve NO üretiminde artışa sebep olduğunu göstermiştir. Vücutta NO miktarının artmasıyla da damarların daraldığı ve yüksek tansiyonun ortaya çıktığı, C vitamini alımıyla NO seviyesinin azaldığı ve bununla birlikte damarların genişleyerek

vazodilatasyon yoluyla tansiyonun düşürüldüğü gösterilmiştir.³³ Ayrıca E vitamini alan hastalarda LDL düzeyi serbest radikallerin oksidasyonundan korunduğu için daha yüksek kalmış ve koroner rahatsızlık, anjin, kalp krizi ve ateroskleroz riski, E vitamini almayan hastalara göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir.³⁴⁻³⁹

2.5.2. Merkezi Sinir Sistemi Rahatsızlıkları

Yüksek derecede oksijen tüketimi ve düşük glutatyon düzeyi sebebiyle serbest demir iyonu ve reaktif moleküllerin derişimi artar ve nöron hücreleri oksidatif strese karşı savunmasız kalır. Oksidatif stres sebebiyle antioksidan savunma sisteminin zayıflamasıyla Alzheimer,^{40, 41} Parkinson,⁴² Beyin tümörü,⁴³ ve Down's sendromu⁴⁴ gibi hastalıkların meydana geldiği tespit edilmiştir.

Nörodejeneratif hastalıklar birçok farklı sinir sistemi rahatsızlığından oluşan heterojen bir grup hastalıktır. Beyin, çevresel sinir sistemi hücrelerinden kaynaklı farklı etkenleri olan hastalıklardır. Büyük çoğunluğu kalıtsal olmakla birlikte toksik metabolik ve diğer enfeksiyon kaynaklı olabilmektedir. Morbidite ve mortalitesi sebebiyle sağlık, sosyal ve finansal olarak topluma büyük bir yük getirmektedir. Nöropatolojik olarak beynin spesifik bir alanında spesifik bir nöron popülasyonunun karakterize abnormaliteler göstermesiyle açıklanır. Dejenere olan nöron kümeleri farklı hastalıkların oluşmasına sebep olurlar. Son çalışmalarda bazı spesifik genlerin farklı nörodejeneratif hastalıklara sebep olduğu, etyolojik faktörleri ve patojenik mekanizmaları belirlenmiştir. Nörobilimlerin 3 temel amacı vardır. 1. Nörodejeneratif hastalığın temel içeriğini anlama 2. Spesifik morfolojik özelliklerin tanınması ve hastalıkla genel bir koorelasyon kurulması 3. Genetiğinin anlaşılması ve tedavi opsiyonları ile klinik özelliklerinin her bir hasta için belirlenmesidir.⁴⁵

2.5.3. Kanser Oluşumu

Son yıllarda kanser çalışmalarının gelişmesinde en büyük etkenlerden birisi DNA hasarı meydana getiren oksijen türevli radikallerin mekanizmasının keşfedilmesidir. Serbest radikaller DNA sarmalına saldırıp hasar verdiklerinde gen dizininde silinme, amplifikasyon ya da yeniden düzenlenmeye sebep olur. Bu DNA hasarları da birçok kanserin ana sebebidir.⁴⁶⁻⁴⁸

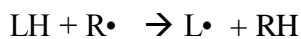
Bunların dışında oksidatif stres böbrek yetmezliği,⁴⁸ enflamasyon,^{49,50} diabet,⁵⁰ solunum yolları rahatsızlıkları,⁵¹ enfeksiyonlar,⁵¹ yaşlanma,⁵² ve karaciğer bozuklukları⁵³ gibi hastalıkların ortaya çıkmasında veya gelişmesinde etkin rol oynadığı da rapor edilmiştir.

2.5.4. Antioksidan Etki Mekanizması

Düşük molekül ağırlığına sahip antioksidan (DMAA) molekülleri hücre zarından kolayca geçer, oksidatif hasarla ilgili bölgeye taşınır ve daha sonra hücre tarafından yeniden üretilirler.^{54,55} İnsan dokularında, hücresel DMAA'lar farklı kaynaklardan elde edilirler. Glutasyon, nikotinamid, karnozin hücre tarafından üretilirken, ürik asit ve bilirubin metabolik faaliyetlerin yan ürünü olarak ortaya çıkar. Tokoferol, askorbik asit ve birçok polifenol ise besinler vasıtasıyla alınırlar.

Serbest radikallerce meydana gelen oksidasyon olayı çok basamaklı bir tepkime şeklinde oluşur. Bu tepkimenin aşamaları başlangıç (initiation), çoğalma (propagation), ilerleme (branching) ve sonuç (termination) bölümlerinden oluşur.⁵⁶

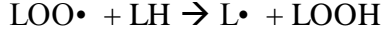
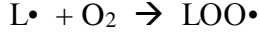
Başlangıç:



Bu tepkimede LH lipid gibi bir substrat molekülünü temsil ederken R. oksidasyonu başlatıcı serbest radikali temsil etmektedir. Lipid oksidasyonu sonucu son

derece reaktif bir lipid radikali oluşur (L•) ve bu radikal hızlı bir şekilde oksijenle tepkimeye girerek lipid peroksil radikalini açığa çıkarır (LOO•).

Yayılma:



Peroksil radikalleri zincirleme tepkime taşıyıcısı olarak görev alır. Lipid molekülünü oksidasyona uğratarken, lipid hidroperoksitlerin oluşumuna sebep olurlar. Lipid hidroperoksitleri alkol, aldehit, alkilformat, keton ve hidrokarbonlar ile alkoksi radikallerin yıkımında rol oynar.

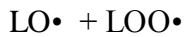
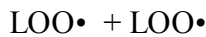
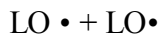
İlerleme:



Lipid hidroksiperoksitlerinin yıkımında bazı geçiş metalleri de görev almaktadır.

Sonuç:

Sonlandırma tepkimeleri farklı radikallerin tepkimeye girmesi ve radikal özelliklerini kaybetmeleriyle neticelenir.⁵⁷



2.6. Kolinesteraz

Kolinesteraz nörotransmitter olan asetilkolinin kolin ve asetik asite dönüşümünü sağlayan tepkimeyi katalize eden enzimlerin genel adıdır. Bu tepkime sayesinde kolinerjik nöronların aktivasyondan sonra dinlenme durumuna geçmelerini sağlar. Kolinesteraz enzimleri iki tiptir.

1. Asetilkolinesteraz (AChE); birçok sinir ve kas hücresinde bulunabilen bir iletim enzimidir. Aktif AChE aktivitesi motor nöronlarda sensör nöronlara göre daha fazladır. Kırmızı kan hücrelerinin membranlarında da bulunur. Enzim çok farklı moleküler yapılarda bulunabilir. Memeli beyinlerinde çoğunlukla tetrametrik G4 formunda bulunur.
2. Pseudokolinesteraz; plazma kolinesterazı olarak bilinir. İlk olarak karaciğerde bulunmuştur. AChE'den farklı olarak bütirikolini daha hızlı hidroliz eder.

2.6.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri:

Asetilkolinesteraz inhibitörleri, kolinesteraz inhibe ederek enzimin asetilkolin bağlarını kırmasını engeller. Böylece nörotransmitter aktivite seviyesi ve zamanı artar. AChE geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Başlıca kolinesteraz inhibitörleri: rivastigmin, donepezil, galantamin, karbamatlardır.⁵⁸

2.7. Lipid Peroksidasyonu

Lipidler serbest radikallerin zararlı ve yıkıcı etkilerine en fazla tepki veren biyomoleküllerdir. Serbest radikaller hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolayca tepkimeye girer ve peroksidasyon ürünlerini meydana getirirler. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif olarak yıkımı lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu kendi kendini sürekli bir döngüyle sürdüren zincir tepkime şeklinde ilerler ve oldukça zararlı etkilere sahiptir. Hücre zarında serbest lipid radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının en önemli özelliklerinden birisi olarak bilinir. Serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonu "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" şeklinde isimlendirilir. Hücre zarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ

asitlerindeki hidrojen atomlarının konjuge çift başlardan çıkarılması ve bunun sonucunda kararlı durumdaki yağ asit zincirinin bir lipid radikaline dönüşmesiyle başlar. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıma uğradığında önemli bir bölümü biyolojik olarak aktif olan aldehitlere dönüşür. Bu bileşikler hücre düzeyinde metabolize edilmezlerse başlangıçtaki etki alanlarından difüze olarak hasarı hücrenin bütün bölümlerine yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) molekülü oluşur. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun özgül veya nicel bir indikatör olmamakla beraber lipid peroksidasyonu derecesiyle birbirine yakın bir ilişki gösterir. Bu sebeple, biyolojik numunelerde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyesini belli eden bir ayıraç olarak kullanılır.

2.8. Antioksidan Ölçüm Yöntemleri

2.8.1. Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi

Antioksidanların kimyasal çeşitliliği bu maddelerin ayrılmasını ve miktarlarının belirlenmesini özellikle bitki matrisinde çok zorlaştırır. Bu yüzden, bitki ekstraktlarındaki toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için yeni bir yöntemin geliştirilmesi büyük bir önem arz eder. Standart bir ölçüm yönteminin yetersizliğinden dolayı, bitkilerdeki toplam antioksidan düzeyi belirlenip sınıflandırılmamıştır. Bu çalışmada, bakır(II)-neokuproin yükseltgenme aracından faydalanarak vitamin C, E ve besin maddelerindeki antioksidan seviyesini belirlemeye yönelik basit, geniş kullanım alanına sahip bir yöntem geliştirilmiş ve literatüre sunulmuştur. Polifenollerin bakır iyonunu indirgemesi olayı ölçüldüğünden dolayı yöntem Apak ve çalışma grubunca bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini veya kısaltılmış şekliyle CUPRAC olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntem Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (FRAP) yöntemine göre daha avantajlı olabilmektedir. Çünkü bakırın redoks kimyasına bakıldığında daha hızlı bir kinetiğe sahip olduğu görülmektedir. Yöntemin içeriğine bakıldığında; asit hidrolizi

sonucu yahut direk antioksidan çözeltilisinin kendisi bakır (II) klorür, neocuproin ve pH 7'deki asetat tamponu ile muamele edilir ve 450 nm dalga boyunda 30 dakikalık bekleme sonrasında absorbans ölçümleri gerçekleştirilir. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin gibi maddeler ile hızlı bir şekilde tepkimeye girerken, naringin ve naringenin gibi bazı maddelerin tepkimeleri geç tamamlandığı için bekleme süresi uzundur. Tepkimenin tam olarak gerçekleşmesi için yavaş olan tepkimeleri hızlandırmak adına 50 °C'de 20 dakikalık bir inkübasyon süresi öngörülmüştür. Sentetik karışımların CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri ölçülür ve Trolox antioksidan kapasitesine karşılık kapasite değerleri hesaplanır. Elde edilen teorik değerler ile karşılaştırılır. Yöntem genel olarak incelendiğinde amonyum asetat ile pH'sı 7'ye getirilmiş Cu(II) Neocuproin kompleksinin Cu(I)Neocuproin'e antioksidan özellikli maddeler vasıtasıyla indirgenmesi ve bu redoks tepkimesi sonucu oluşan bakır kompleksinin 450 nm'de absorbans vermesine dayanır.⁵⁹ Bu yöntem şu ana kadar 800 atıf almış olup "web of science" verilerine göre 150 kadar çalışmada bu yöntemle başvurulmuştur. Yapılan çalışmalarda endemik bitkiler ve gıda örneklerinde antioksidan tayinler gerçekleştirilirken, çeşitli modifikasyonlarla serum ve plazma örneklerinde de antioksidan aktivite tayinleri gerçekleştirilebilmektedir.⁶⁰⁻⁶²

2.8.1.1. Avantajları

CUPRAC yöntemi değerleri Trolox eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAC) değerleri ile kıyaslanabilir fakat FRAP yöntemindeki değerlerden daha yüksek sonuçlara sahiptir.⁵⁹ CUPRAC yönteminde Cu(II,I)-neocuproin çiftinin 0.60V'luk bir redüksiyon potansiyeline sahip olması, biyolojik öneme sahip ve gıdalarda bolca bulunan çoğu antioksidanın 0.2-0.6 V arasında yer alan redoks potansiyelini karşılamaya dolayısıyla bunları okside etmeye yeterlidir. Ayrıca, yönteminin çok düşük redoks potansiyeline sahip olması, antioksidan özellik göstermeyen şeker ve sitrik asit gibi bileşiklerin pozitif

sonuç vermesini engeller ve bu sayede yöntemin seçiciliği diğer yöntemlere kıyasla daha yüksektir.^{63, 64} Bununla birlikte fizyolojik pH olan 7.4 değerine çok yakın olan ve amonyum asetat tamponu ile sağlanan pH 7.0'de yapılan ölçümler de yöntemin bir diğer avantajıdır.

Bu avantajlarının yanı sıra, tiyol bazlı antioksidanları kolayca belirleyebilmesi, ABTS ve DPPH'a kıyasla daha stabil bir ajan kullanması, absorbansa karşılık derişim grafiğinin daha geniş bir aralıkta lineer kalması, rutin laboratuvar ölçümleri için çok kolay erişilebilir bir yöntem olması, fizyolojik pH'da (7.4) ölçüm yapılmasına olanak tanınması gibi özellikleri de bu yöntemi öne çıkaran diğer unsurlardır.⁶³

2.8.1.2. Dezavantajları

Yöntem kompleks moleküllerin tepkime zamanlarının seçiminde bazı problemler yaşamaktadır.⁶⁴

2.8.2. FRAP Yöntemi

CUPRAC yöntemi gibi elektron transferine dayanan bir antioksidan kapasite/aktivite tayin yöntemidir. Ana yöntemine bakıldığında; FRAP çözeltisi asetat tampon ile pH'ı 3.6'ya getirilmiş çözelti içerisinde 40 mM'lık HCl içerisinde hazırlanmış 2.5 mL ve 10 mM TPTZ çözeltisi ile 2.5 mL 20 mM'lık $FeCl_3 \cdot H_2O$ ile hazırlanır. Final çözeltide 1.67 mM Fe(III)'e karşılık sadece 0.83 mM TPTZ bulunur. Böylece Fe(III) ile TPTZ arasında ideal stokiyometrik oran elde edilmiş olur FRAP değerlerinin ölçülebilmesi için öncelikle 300 μ L FRAP çözeltisi 37 °C sıcaklığa getirilip 593 nm dalga boyunda kör numunesi olarak ölçülür. Daha sonra bu çözeltiye 10 μ L örnek ve 30 μ L su eklenir. Eklemeden sonra her 15 saniyede bir ölçüm alınmak kaydıyla 4 dakika boyunca seri ölçümler gerçekleştirilir. 4 dakikalık süre içerisindeki absorbans değişimi hesaplanır ve bu değişim örnek derişimiyle doğrusal bir korelasyona sahiptir. 1 mol FRAP birimi

yaklaşık olarak 1 mol Fe (III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesine eşdeğerdir. Askorbik asit, ürik asit ve tokoferolün FRAP birimleri eşdeğer olup 2.0'ye eşittir.⁶⁵

2.8.2.1. FRAP Yöntemi Avantajları

Frap yöntemi hızlı, ucuz, basit ve sağlamlığı yüksek sonuçlar veren, çok komplike ölçüm cihazları gerektirmeyen bir antioksidan aktivite tayin yöntemidir. Frap ölçümleri otomatik, yarı-otomatik ve manuel olarak yapılabilir.

2.8.2.2. Dezavantajları

Fe(II) iyi bilinen bir proksidan molekülüdür. En tehlikeli serbest radikal olarak bilinen HO· Radikalini oluşturmak üzere H₂O₂ ile tepkime verebilir. Yönteme göre, bir bileşiğin Fe(III)'den Fe(II) üretebilme gücü bu bileşiğin "antioksidan gücü"ne eşdeğerdir. Fakat demir indirgeme özelliğine sahip her bileşik antioksidan değildir ve böyle bir genelleme antioksidan olmayan bileşiklerin de antioksidan olarak kabul edilebilmelerine yol açacaktır.⁶⁶ Redoks potansiyeli Fe(III)/Fe(II) çiftinden daha düşük olan herhangi bir molekül kolaylıkla Fe(III)'ü indirgeyecek ve antioksidan olup olmamasına bakılmaksızın bu yöntemde pozitif sonuç verecektir. FRAP ölçümlerinin en büyük handikaplarından birisi de glutatyon gibi bazı çok önemli antioksidanların bu ölçüm yönteminde negatif sonuç vermesidir. FRAP yöntemi ayrıca tiyoller ve fenollerin ölçümünde de diğer yöntemlere kıyasla başarısız kalmaktadır.⁶⁷

2.8.3. ABTS/TEAC Yöntemi

İlk olarak 1993 yılında Miller ve Evans'ın yapmış oldukları çalışmada kullanılan bu yöntem ABTS radikalinin ABTS⁺ radikal katyonuna yükseltgenmesi esasına dayanan elektron transfer (ET) temelli bir antioksidan kapasite tayin yöntemidir. Orijinal yönteme bakıldığında 7 mmol ABTS amonyum suda çözülür ve 2.45 mmol potasyum persulfat ile oda sıcaklığında 12-16 saat süresince enkübe edilir. Daha sonra elde edilen koyu mavi çözelti pH 7.4'de etanol ya da tampon çözelti ile 734 nm dalga boyundaki absorbans

değeri 0.7'ye gelene kadar seyreltilir 1 mililitrelik seyreltilmiş çözelti 10 µL örnek ile karıştırılır ve karıştırma işleminden 1, 4 ve 6 dakika sonra absorbans okuma işlemi tekrarlanır. Absorbans değerlerindeki farklılığa karşı derişim grafiği çizilir ve bir kalibrasyon eğrisi elde edilir. Daha sonra elde edilen veriler 1mM derişimindeki troloks maddesinin verilerine oranlanır ve troloks cinsinden toplam antioksidan değerleri her bir antioksidan madde için hesaplanmış olur.^{65, 68}

2.8.3.1. ABTS Yöntemi Avantajları

ABTS^{•+} radikali hem suda hem de inorganik ortamlarda çözünebilme özelliğine sahiptir ve iyonik kuvvetten etkilenmez ve bu sayede hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin antioksidan aktivitesi bu yöntemle ölçülebilir.⁷⁰

ABTS uygulaması kolay bir yöntemdir ve birçok laboratuvar tarafından kullanılmaktadır. Absorpsiyon maksimum değerleri su ortamında 414, 752 ve 842 nm iken, etanol ortamında 414, 730 ve 873 nm olarak belirlenmiştir.⁶⁹ Yöntemin bir diğer avantajı ise çok geniş bir pH aralığında ölçüme imkan verebilmesidir.⁷⁰

2.8.3.2. ABTS Yöntemi Dezavantajları

Yöntemin en önemli sınırlamalarından birisi, prensibi gereği örneğin oksidatif işlemi inhibe etmesini değil radikalle tepkimeye girmesi ölçülür. Bu sebeple birçok fenolik bileşimin tepkimeye girmesi uzun bir süre alır. Genelde belirlenmiş bir zamanda alınan ölçümler hesaba katıldığı için bazı tepkimeler tam olarak gerçekleşmeden ölçüm alınarak hata yapılmış olabilir.⁶⁵ Yöntemin bir diğer handikapı ise biyolojik sistemlerde bahsedilen radikalın olmayışı ve bu sebeple biyolojik sistemlerdeki tepkimeleri tam olarak simüle edememesidir.

2.8.4. DPPH Yöntemi

Bu yöntemde difenil-1 pikril hidrazil isimli radikal antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılır. Bu madde az sayıdaki stabil ve satın alınabilir azot radikallerinden olup

515 nm dalga boyunda absorbans vermektedir. İndirgenme esnasında DPPH çözeltisi rengini kaybetmekte ve spektrofotometrede kolay bir şekilde ölçümü yapılabilir. DPPH yöntemi yakından incelendiğinde; orijinal DPPH prosedürüne göre 3.9 mL 25 mg/L derişimindeki DPPH çözeltisi metanol içerisinde hazırlanır ve 0.1 mL hacmindeki örnek çözeltisi ile karıştırılır. Absorbans değeri stabil kalıncaya dek hazırlanan final çözelti spektrofotometre cihazında 515 nm dalga boyunda ölçülür. Bu ölçüm bazı örneklerde 30 dakikaya kadar çıkabilmektedir. Tepkimeye girmeyen % DPPH miktarı aşağıdaki formülle saptanır:⁷¹

$$\%DPPH = (DPPH_{\text{kalan}}/DPPH_{\text{ilk eklenen}}) \times 100$$

DPPH yüzdesi ile antioksidan madde derişimi arasında bir koorelasyon mevcuttur. DPPH düzeyinde %50'lik bir azalma EC₅₀ ibaresiyle ifade edilir ve herhangi bir maddenin DPPH miktarını %50ye indirmesi için gereken süre kinetik eğriden hesaplanır. Bu hesaplanan değer ise T_{EC50} şeklinde adlandırılır. Sanchez ve Moreno yapmış oldukları çalışmada bu değere 5 dakikadan erken ulaşan maddeleri hızlı, 5-30 arası ulaşanları orta düzey 30 dakikadan daha uzun sürede bu değere ulaşanları ise yavaş antioksidanlar olarak sınıflandırmıştır. Daha sonra yapmış oldukları çalışmada antiradikal verimlilik (AE) parametresini belirlemişler ve bu parametreyi aşağıdaki denklem ile formülize etmişlerdir:

$$AE = (1/EC_{50})T_{EC50}$$

Bazı antioksidan özellikli maddelere karşı tepkime vermemesi veya çok uzun sürede yanıt vermesi, DPPH ile antioksidan madde arasındaki tepkime kinetiğinin DPPH derişimiyle lineer olarak değişmemesi ve eugenol gibi bazı antioksidanlarla geri dönüşümlü tepkime vermesi gibi handikaplarına rağmen bu yöntemle antioksidan kapasite tayini yaygın olarak kullanılan yöntemler arasındadır.

Sonuç olarak antioksidan kapasite tayini yöntemlerine bakıldığında; bütün yöntemlerin belirli alanlarda bir diğerine karşı üstünlüğü varken, aynı zamanda hepsinin kimyasal özelliklerindeki farklılıklardan ve tepkime kinetiklerinden dolayı çeşitli dezavantajları da mevcuttur. Bu yüzden bütün yöntemler dikkatli bir şekilde incelenip, ölçümü ve tayini yapılacak numune için hangi yöntemin en güvenilir olduğu; hangi yöntemin kimyasal ve kinetik özelliklerinin sahip olunan örnek için uygun olduğunun saptanması için var olan yöntemlerin ana prosedürleri detaylı bir şekilde incelenmeli ve gerekli görülen yerlerde bu yöntemler çeşitli modifikasyonlarla geliştirilip uygun bir antioksidan kapasite tayin yöntemi örneğe uygulanmalıdır.⁷¹

2.8.4.1. DPPH Avantajları

DPPH yönteminin en önemli avantajı çok kolay ve hızlı sonuç veren bir sistem olmasıdır. Basit bir spektrofotometre ile onlarca ölçüm dakikalar içinde sonlandırılabilir.⁷²

2.8.4.2. Dezavantajları

Yöntemin bazı sınırlamaları mevcuttur ve bu yüzden çok kolay ve ucuz bir sistem olmasına rağmen geniş bir kullanım alanına sahip olamamıştır. En önemli handikaplarından birisi DPPH sadece organik çözücüler içinde çözünebildiği için sadece organik çözücülerde çözünebilen antioksidanların aktivitelerinin ölçülmesine imkan tanınmaktadır.⁶⁹ Ayrıca DPPH radikalının peroksil radikalleriyle çok küçük bir benzerliği vardır. Bu yüzden peroksil radikalleri ile çok hızlı bir şekilde tepkimeye giren bazı antioksidanlar DPPH ile ya tepkimeye girmezler ya da tepkimeler çok yavaş gerçekleşir. Bu yüzden EC₅₀ değeri, tepkime kinetiği ve diğer hesaplamalar genelde sorun yaratır. Bunlara ek olarak 515 nm dalga boyunda girişim gösterebilen bazı moleküllerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi de yöntemin bir diğer sınırlamasıdır. Ayrıca eugenol gibi bazı maddeler geri dönüşümlü tepkimeler verirler.⁶⁵

2.9. Kemometri

Kemometri kelime anlamı olarak, istatistik ve matematiksel yöntemlerin bilgisayar ve yazılım alanındaki gelişmelerle desteklenerek endüstrinin ve akademinin farklı alanlarındaki kimya uygulamaları için kullanılan bir terimdir. Kemometri kavramı ilk olarak 1972 yılında Svante Wold ve Bruce Kowalski tarafından ortaya atıldı. Kemometri temel olarak matematik ve istatistiksel yöntemleri kullanarak kimyasal verilerden en yüksek düzeyde bilgi toplama ve optimum deney prosedürlerini seçme ya da tasarlamayı amaçlayan bir kimya disiplini'dir.⁷³

Kemometri özellikle analitik kimya olmak üzere; adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi birçok disiplinde çalışma olanağı bulmuştur. Eczacılık alanında ilaç etkin maddelerinin ve özellikle kombine ilaçların analizi, ilaç sentezinde tepkime koşullarının optimizasyonu ve yapı etki çalışmalarında kemometrik yöntemlere başvurulmaktadır.⁷⁴

Klasik konvansiyonel yöntemlerden farklı olarak farklı analitik cevaplarının tek bir veri seti üzerinde hesaplanması, bu sayede birden çok analitin aynı anda ölçümüne imkân tanınması ve bunun yanı sıra karmaşık veri setlerini yorumlayabilme kapasitesi sayesinde birçok farklı disiplinde uygulama alanı bulmuştur.⁷⁴

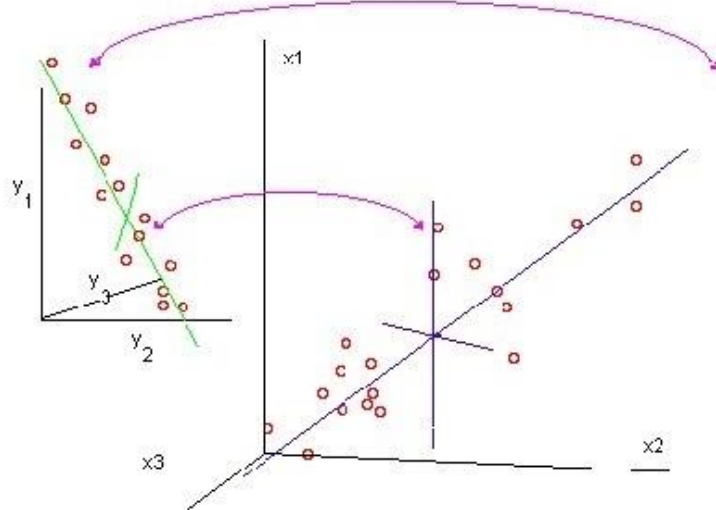
2.9.1. Çoklu Kalibrasyon Yöntemleri

Çoklu kalibrasyon yöntemleri kemometrinin en geniş uygulama alanlarından bir tanesidir. Birçok bileşiğin miktar, aktivite tayinlerinde ve elde edilen sonuçların değerlendirilip yorumlanmasında başvuru olan bir yöntemdir. Çoklu kalibrasyon tekniği ile basit kalibrasyon yöntemlerinden farklı olarak birçok dalga boyunda elde edilen ölçümler alınarak bir kalibrasyon modeli meydana getirilebilir. Bununla birlikte, geçerlilik testleri yapılmış yöntemlerle, kromatografik hesaplamalara ve yöntemlere ihtiyaç duymadan hızlı, basit ve ucuz ölçüm imkânı tanıyan spektroskopik yöntemlerle birden çok analitin

miktar tayinleri gerçekleştirilebilir. Ayrıca, tayin edilecek madde miktarı tam olarak bilinmeyen, safsızlık ve girişim ihtimali yüksek olan gerçek numunelerin analizlerinde klasik yöntemlere göre çok daha iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir.⁷⁵

2.9.2. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (PLS)

PLS yöntemi çoklu kalibrasyon teknikleri içerisinde en fazla tercih edilen yöntemdir. Yöntemin algoritmasına bakıldığında, PLS tekniği ile çevre, çözücü etkisi, seyreltme, analizci hatası gibi parametreler dikkate alınarak derişim matrisine de faktör analizi işlemi uygulanır. Yöntemin iki matrisin izdüşümü arasındaki bağıntıyı temel olarak numuneler ile veri setlerindeki değişkenler arasında ilişki kurar (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. PLS izdüşüm projeksiyonu

Sistemin algoritması aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

X = Spektral Absorbans Matrisi

Y= Derişim Matrisi

T = Skor Matrisi

U = Derişim Skor Matrisi

P = Spektral Yükleme Matrisi

Q = Derişim Yükleme Matrisi

E ve F = Bias Matrisi

n : Örnek sayısı

m : Dalga boyu sayısı

p : Bilinen bileşikler ise; PLS yönteminde yukarıda da belirtildiği gibi X ve Y için ayrı ayrı bağıntılar hesaplanır ve bu iki bağıntı arasında bir kolerasyon kurulması amaçlanır. PLS yöntemi temel olarak bu iki matrisin iz düşümlerine hesaplar ve bir iç bağıntı denklemini oluşturarak korelasyon eşitliği kurar (Şekil 1.1.). X ve Y için hesaplanan bağıntılar aşağıdaki denklemlerle bulunur.

$$X = TP^1 + E$$

$$Y = UQ^1 + F$$

Burada E ile F hem deney kaynaklı hataları hem de model uyumsuzluklarını göstermektedir.

Bu iki bağıntının kolerasyonu ise $U = TW$ matrisinin hesaplanması ile elde edilir.

Hesaplamalarda $I X - TP^1 I$ ve $I x Y - UQ^1 I$ eşitliklerini en düşük düzeye indirinceye kadar X ve Y matrislerinin değerleri hesaplanır ve bu eşitliklerin en düşük olduğu faktör değerlerinde işlem sonlandırılır. Bu değerde hesaplanan bağıntı esas alınarak regresyon modeli oluşturulur.

Daha sonra bileşenlerin dış çarpım vektörleri X ve Y matrislerinden çıkarılarak rezidü matris elde edilir. İkinci ana bileşenleri bulmak için X ve Y matrisleri rezidü matrisle yer değiştirir ve bu işlemler yeterli minimum değere ulaşana kadar diğer özvektörler çıkarılmaya devam eder.

PLS algoritması aşağıda formülize edilmiştir.

$$X_0 = X - 1x^1 \text{ ve } Y_0 = Y - 1y^1$$

$$X_{a-1} = u_a w_a^1 + E$$

$$W_a = c X_{a-1}^1 u_a$$

$C = w_a$ 'nın boyutunu 1'e eşitlemek için gerekli skala faktörü

$$C = (u^t X_{a-1} X_{a-1}^t u_a)^{-0,5}$$

$$X_{a-1} = t_a w_a^t + E$$

$w_a^t w_a = 1$ olduğundan

$$t_a = X_{a-1} w_a$$

$$X_{a-1} = t_a p_a^t + E$$

$$P_a = X_{a-1}^t t_a / t_a^t t_a$$

$$Y_{a-1} = t_a q_a + F$$

$$q_a = Y_{a-1}^t t_a / t_a^t t_a$$

$$Y_{a-1} = u_a q_a^t + F$$

$$u_a = Y_{a-1} q_a (q_a^t q_a)^{-1}$$

Faktör çarpımları X ve Y matrislerinden çıkarılır ve böylece yeni X ve Y matrisleri elde edilir.

$$E = X_{a-1} - t_a p_a^t$$

$$F = Y_{a-1} - u_a q_a$$

Bu işlemler sonucunda yeni X matrisi E yeni Y matrisi ise F ile gösterilir. Bu işlemlere en uygun değerler elde edilinceye kadar devam edilir. PLS yöntemini klasik çoklu kalibrasyon yöntemlerinden ayıran en önemli özellik ortogonal vektörlerin yukarıda belirtilen algoritma şeklinde matristen çıkarılmasıdır. Bu sayede lineer bağımlılık en aza iner ve bu sebeple oluşan dezavantajlar elimine edilir. PLS yönteminde ana bileşenler X matrisinden alındıktan sonra Y matrisiyle birleştirilir. Bu nedenle, PLS yönteminin özellikle verilerin sistemin tümünü kapsamadığı durumlarda tahmin gücü diğer çoklu kalibrasyon tekniklerine göre daha yüksektir.⁷⁶

Kümeleme ve sınıflandırma amaçlı yöntemlerin tamamı çok değişkenli bir veri analiz yöntemi olan temel bileşenler analizine (PCA) dayalıdır. PCA incelenen çok

sayıdaki değişkeni, değişkenler arası korelasyonu engelleyerek onların doğrusal kombinasyonlarından oluşan daha az sayıda bileşenlere indirgeyen bir yöntemdir. PCA temelli yöntemler, verilen bir örnek sistemi üzerinde çok sayıda değişken değerinden yola çıkarak sözkonusu örnekleri çeşitli guruplara kümeleyerek sınıflandırabilir. PCA modeli, n sayıda örnek (gözlem) ve p sayıda değişkenin ölçüldüğü bir A veri matrisinin ($A_{n \times p}$) eşitlik 1'deki gibi temel bileşenlerine ayrıştırılması ile kurulur.

$$A = T \times B + EA \quad (1)$$

Burada T $n \times q$ skor matrisi ve B $q \times p$ yükleme matrisi olup q sayısı A matrisinin PCA çözümlemesi için gerekli minimum temel bileşen sayısına eşittir. T matrisinin her bir sütun vektörü ile B matrisinin her bir satır vektörü A matrisinin bir temel bileşeni olarak adlandırılır. Eşitlik 1'dende anlaşılacağı gibi, PCA'nın temel prensibi, A matrisini kendisinden daha küçük iki matrise dönüştürülmesi işlemidir. Bu işlem tekil değerli ayrışmaya dayalı olarak yapılmaktadır. Genellikle birinci ve ikinci temel bileşenler toplam varyansın büyük bir bölümünü kapsadığından; ilk iki temel bileşen birbirine karşı grafiğe geçirilmesiyle, iki boyutlu düzlemde bütün değişkenlerin etkisi dâhilinde örneklerin kümelendirilmesi mümkün olmaktadır. Eğer örneklere göre bir kümeleme yapmak istenirse, T matrisinin ilk iki sütun vektörü birbirine karşı grafiğe geçirilir. Diğer taraftan, sistemdeki değişkenlerin dağılımına göre bir guruplandırma istendiğinde B matrisinin ilk iki satır vektörü birbirine karşı grafiğe geçirilmektedir. Bunun yanında, Hiyerarşik Küme Analizi (HCA) yöntemi PCA'dan elde edilen skor vektörlerini kullanarak, birbirine en çok benzerlik gösteren örneklerden başlayarak Euclidian mesafe hesaplamaları ile hiyerarşik öbikleme işlemini gerçekleştirmektedir.

2.10. Çalışmada Kullanılan İlaçlar

2.10.1. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyon ve Etkileri

Arteriyel kan basıncının kısa ve uzun süreli düzenlenmesinde Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS) önemli bir işlev görür. Anjiyotensin II'nin plazma derişimlerinde hafif bir yükselme kan basıncını akut olarak artırır; molar derişimde, anjiyotensin II noradrenalinden yaklaşık 40 kez daha aktiftir ve arteriyel kan basıncının akut olarak yükselmesi için EC₅₀'si yaklaşık 0.3 nmol/L olarak saptanmıştır. Tek doz intravenöz Anjiyotensin II enjeksiyonu sonucunda, sistemik kan basıncı akut olarak saniyeler içinde artmaya başlar, büyük bir hızla doruğa ulaşır ve dakikalar içerisinde eski seyrine geri döner. Anjiyotensin II'ye bu hızlı baskılayıcı yanıt akut hipotansif nedenlerle (kan kaybı ve vazodilatasyon) yüz yüze kalındığında arteriyel kan basıncının sürdürülmesine yardımcı olacak bir yanıt olan total periferik dirençteki hafif bir artma yoluyla açıklanabilir. Her ne kadar, anjiyotensin II kardiyak kontraktileti doğrudan artırırsa (kardiyak miyositlerde voltaja bağımlı Ca²⁺ kanallarını açarak) ve dolaylı olarak (sempatik tonusu kolaylaştırmak, adrenerjik iletiyi artırmak ve adrenal katekolamin salgısını artırmak) arttırsa da, arteriyel kan basıncındaki hızlı artma baroreseptör refleksi mekanizmasını aktive ederek, sempatik tonusu düşürüp, vagal tonusu artırır. Böylece fizyolojik duruma bağılı olarak anjiyotensin II kardiyak kontraktileti, kalp hızını ve kardiyak dışı atımı arttırabilir, azaltabilir ya da değiştirmez. Bu nedenle, kardiyak outputtaki değişikliklerin anjiyotensin II tarafından ortaya çıkarılan hızlı presör yanıtta hemen hiç katkısı yoktur.

Anjiyotensin II ayrıca, arteriyel kan basıncının uzun süreli kararlı hale getirilmesine yardımcı olan yavaş presör yanıtta da neden olur. Anjiyotensin II'nin başlangıçtaki subpressör dozlarının sürekli infüzyonu arteriyel kan basıncını kademeli olarak arttırır, maksimum etki elde edebilmek için günler gerekir.

Anjiyotensin II, tedavide tek başına kullanımı kısıtlı olan ve bu amaçla el altında bulundurulmasına gerek olmayan bir maddedir. Ancak, klinik ilgi daha çok Renin-Anjiyotensin sistemi inhibitörleri üzerinde odaklanmıştır.⁷⁷

2.10.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörleri

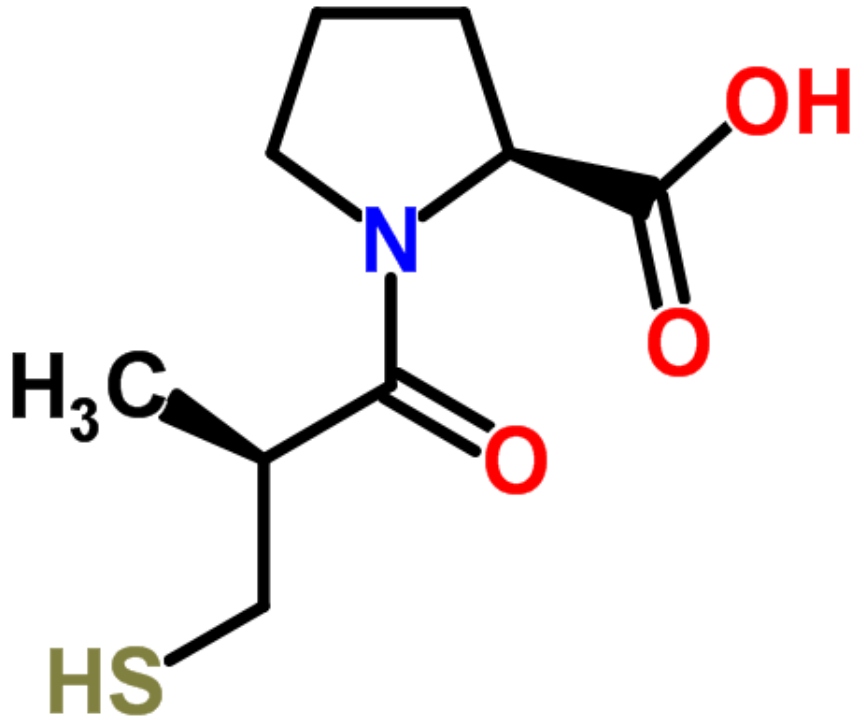
1960'lerde, Ferreira ve çalışma arkadaşları, çıngıraklı yılan zehrinin bradikinine verilen yanıtları güçlendiren bazı faktörler içerdiğini buldular. Bu faktörlerin, bradikini inaktive eden bir enzim olan kininaz II'yi inhibe eden peptit yapılı bir aile olduğu kanıtlanmıştır. Erdös ve çalışma arkadaşları da ACE ve kininaz II'nin aynı enzim olduğunu, güçlü bir pressör madde olan anjiyotensin II'nin sentezi ile güçlü bir vazodilatör olan bradikininin yıkımını katalize ettiklerini saptadılar.⁷⁸

Bradikinin etkisini güçlendiren faktörlerin keşfini takiben, nonapeptid teprotid sentez edilip insanlar üzerinde denendi. Esansiyel hipertansiyonlu pek çok hastada kan basıncını, saralazin benzeri, parsiyel agonistik aktiviteli, peptit yapılı anjiyotensin II antagonistlerine göre çok daha uzun süreli olarak düşürdü. Teprotidin, kalp yetmezliği olan hastalarda da yararlı etkileri gösterildi. Sonuçta, bu anahtar gözlemler, oral yoldan aktif ACE inhibitörlerinin araştırılmasının önünü açtı.

D-benzil Süknisik asit tarafından inhibe edildiği bilinen karboksipeptidaz A ile benzerlikleri ve substratları üstüne ACE'nin etkisi hakkında sonuç çıkarıp, teprotidin inhibitör etkisinin analizini içine alan akılcı bir yaklaşımla, oral yoldan etkili bir ACE inhibitörü olan kaptopril geliştirildi. Ondetti ve arkadaşları ACE tarafından ayrılan dipeptit uzunluğuyla benzetilen süksinik amino asitler tarafından meydana getirilebilen ACE inhibisyonunu tartıştılar. Bu hipotezin doğruluğu kanıtlandı ve kompetitif ACE inhibitörü olan bir seri merkaptto alkanoil türevinin sentezine yol açtı. En aktif olanı kaptopril olarak tespit edildi. ACE inhibitörleri anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü etkin biçimde bloke ettiği saptanmıştır.⁷⁹

2.10.2.1. Kaptopril

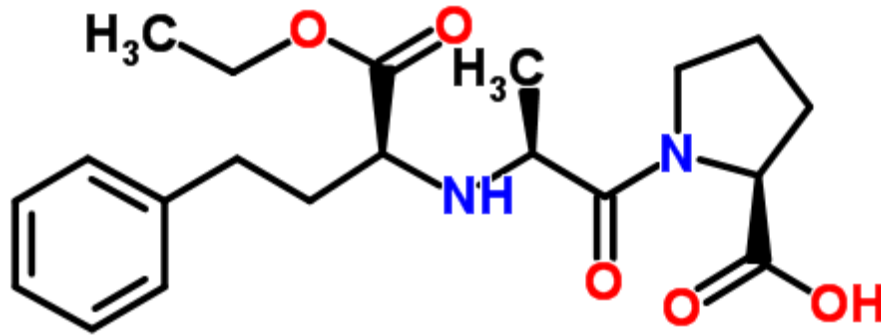
Kaptopril piyasaya ilk verilen K_i değeri 1.7 nM olan güçlü bir ACE inhibitörüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı onaylanmış, sülfidril grubu içeren tek ACE inhibitörüdür. Oral yoldan verildiğinde süratle emilir. Biyoyararlanımı yaklaşık %75 kadardır. Plazma doruk derişimine bir saat içerisinde ulaşır. Yarılanma ömrü yaklaşık 2 saat olup vücuttan hızlı bir şekilde atılır. Büyük bir kısmı değişmeksizin idrar yoluyla (%40-50), geri kalan kısmı ise kaptopril disülfid ve kaptopril-sistein disülfid olarak atılır. Oral dozu, günde iki ya da üç kez 6.25-150 mg aralığındadır. Kalp yetmezliği olan olgularda günde 3 kez 6.25 mg, hipertansiyonlu olgularda ise günde 2 kez 25 mg tedavinin başlangıcı için uygun dozlardır. Günlük oral dozun 150 mg'nin üzerine çıkarılması önerilmez. Gıda maddeleri ile alındığında kaptoprilin oral biyoyararlanımı %25-30'a kadar düşer. Bu nedenle ilaç yemeklerden bir saat önce verilmelidir.⁸⁰



Şekil 2.2. Kaptopril etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.10.2.2. Enalapril

Enalapril maleat karaciğerde esterazlar tarafından hidroliz edilerek aktif dikarboksilik asit olan Enalaprilat'e dönüştürülen bir ön ilaçtır. Enalaprilat K_i değeri 0.2 nM olan çok güçlü bir ACE inhibitörüdür. Bir prolin yerini tutucu içermesine karşın, enalaprilat dipeptitten daha çok bir tripeptidin analogu olan kaptoprilden farklıdır. Enalapril oral olarak verildiğinde hızla emilir. Oral biyoyararlanımı yaklaşık %60 civarındadır (gıda alımıyla azalmaz). Enalapril bir saat içerisinde plazma doruk derişimine ulaşırken, enalaprilat bu düzeye ancak 3-4 saat sonra ulaşır. Enalapril'in yarılanma ömrü yalnızca 1-3 saattir. İlacın neredeyse tümü değişmeksizin ya da enalaprilat olarak böbreklerden elimine edilir. Enalapril'in günlük oral dozu 2.5-40 mg arasında belirlenir (tek ya da bölünmüş dozlar halinde). Kalp yetmezliğinin tedavisinde 2.5, hipertansiyon tedavisinde ise 5 mg günlük doz başlangıç tedavisi için uygundur. Diüretik alan, sıvı ve Na^+ kaybı olan hipertansiyonlu olgularda günlük doz 2.5 mg'dir.⁸¹



Şekil 2.3. Enalapril etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11. Peptit Yapılı Olmayan Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri

Anjiyotensin II reseptör antagonistleri tedavi değerlerini geliştirmek için yapılan çalışmaların 1970'li yılların ilk yarısında başlanmış ve bu başlangıç çalışmaları daha çok anjiyotensin analogları üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak saralazin, I-Sarkozin, 8-İzolusin anjiyotensin II ve diğer 8- pozisyonunda yan zincir içeren anjiyotensinlerin güçlü reseptör antagonistleri olmakla beraber, peptit yapılı tüm anjiyotensin II reseptör

antagonistlerinin, oral biyoyararlanımlarının düşük olması ve parsiyel agonistik aktivite göstermeleri gibi sorunlar nedeniyle klinik önemlerinin olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle araştırmalar peptit yapılı olmayan reseptör antagonistleri üzerinde yoğunlaşır.

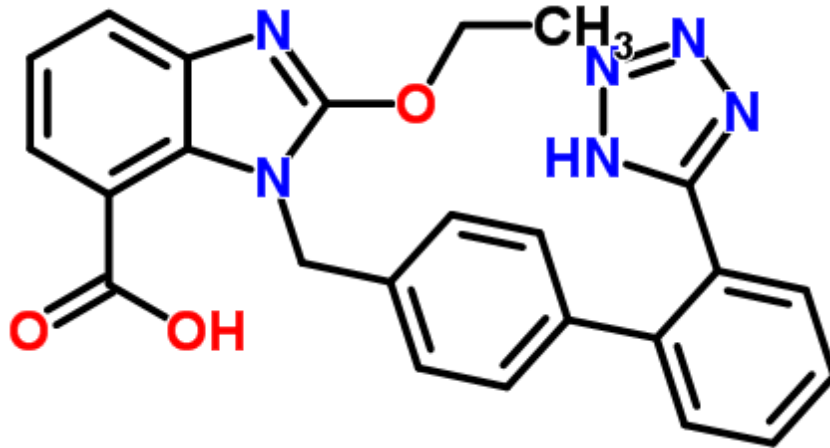
Peptit yapılı olmayan anjiyotensin reseptör antagonistlerinin gelişimiyle ilgili başlangıç çalışmalarının başarısız olmasına karşın 1980'lerin başında sıçanlarda Anjiyotensin II'nin pressör yanıtını azaltan imidazol-5-asetik asit türevi bir seri maddenin açıklanması bu konuda önemli bir atılım oldu. Bu çalışmada çok zayıf etkili olmalarına karşın, parsiyel agonistik aktivite göstermeyen selektivitesi yüksek ve peptit yapılı olmayan anjiyotensin II reseptör antagonisti iki bileşik, S-8307 ve S-8308 tanımlandı. İlaç tasarımında yol gösterici bir örnek olarak bu bileşiklerin moleküler modellerinin çıkarılması, anjiyotensin II etkin kısmının (biyolojik aktiviteden sorumlu moleküler yapı) daha yakından taklit edilmesi hipotezini düşündürür. Bu çalışmaların sonunda, farklı basamaklarda yapılan değişikliklerin açıklanmasıyla oral, aktif, güçlü, seçici ve peptit yapılı olmayan bir Anjiyo Tensin I (AT₁) reseptör antagonisti olan losartan geliştirilmiştir. Losartanın klinik kullanımı 1995 yılında onaylandı. O günden bu yana, klinik kullanıma altı AT₁-reseptör antagonisti daha girdi. Tümü onaylanan bu bileşikler ya bifenil metil türevi ya da tienilmetilakrilik asit türevleridir. Parsiyel agonistik aktiviteden yoksun olmalarına karşın, söz konusu AT₁-reseptör antagonistlerini peptit yapılı olmayan AT₁-reseptör agonistleri sentez edilebildi. Metil grubu gibi küçük yapısal bir değişiklik sonrası güçlü bir antagonistin agoniste dönüştürülebileceği gösterildi.

Bu ilaçlar anjiyotensin II'nin oluşturduğu damar düz kaslarında kasılma, hızlı pressör yanıtları, yavaş pressör yanıtları, susuzluk, vazopresin salgılanmasını, aldosterone salgılanmasını, sürrenal medulladan katekolamin salgılanmasını, noradrenerjik nörotransmisyonu arttırmasını, sempatik tonusu arttırmasını, böbrek

fonksiyonlarını değiştirmesini ve hücresel hipertrofi ve hiperplaziyi hem in-vivo hem de in-vitro olarak güçlü ve seçici bir biçimde inhibe ederler.^{81,82}

2.11.1. Kandesartan

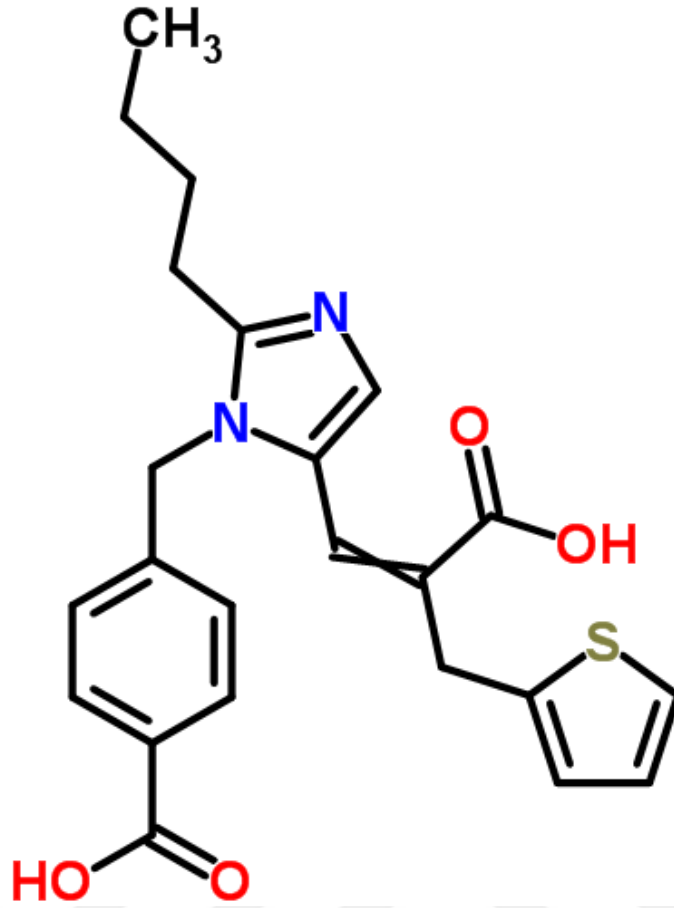
Kandesartan sileksetil mide bağırsak kanalından emilimi sırasında bütünüyle aktif şekli olan kandesartana hidrolize olan inaktif ester yapılı bir ön ilaçtır. Oral uygulamayı izleyen 3-4 saat içerisinde doruk plazma düzeyine ulaşır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 9 saattir. Kandesartanın plazma klerensinin % 33'ü böbrekler, % 67'si safra yoluyla sağlanır. Plazma klerensi hafif ve orta dereceli karaciğer yetersizliğinden etkilenmemekle birlikte böbrek yetmezliğinden etkilenir. Kandesartan oral yoldan günde 1 ya da 2 kez 4-32 mg arasındaki dozlarda kullanılır.⁸³



Şekil 2.4. Kandesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.2. Eprosartan

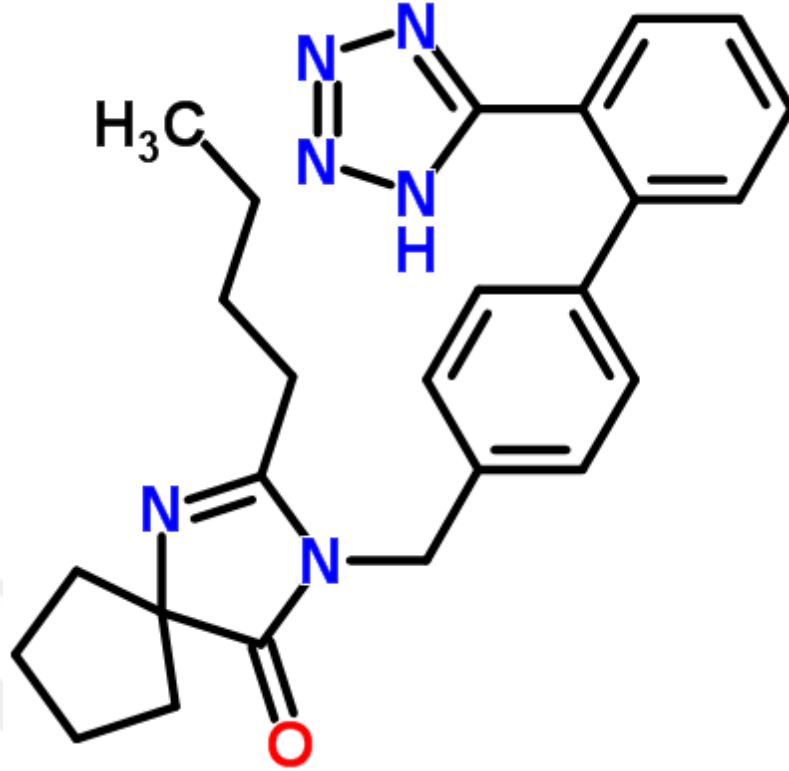
Oral uygulamadan yaklaşık 1-2 saat sonra plazma doruk düzeyine ulaşır. Plazma yarılanma ömrü 5-9 saat kadardır. Eprosartan glukuronid konjugatına metabolize edilir. Hem anabilesik hem de glukuronid konjugatı böbrek ve safra yoluyla elimine edilir. Plazma klerensi hem böbrek hem de karaciğer yetersizliğinden etkilenir. Eprosartanın önerilen dozu 400-800 mg/gün olarak tespit edilmiştir. Günlük doz bir defa ya da ikiye bölünerek alınır.⁸⁴



Şekil 2.5. Eprosartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.3. Irbesartan

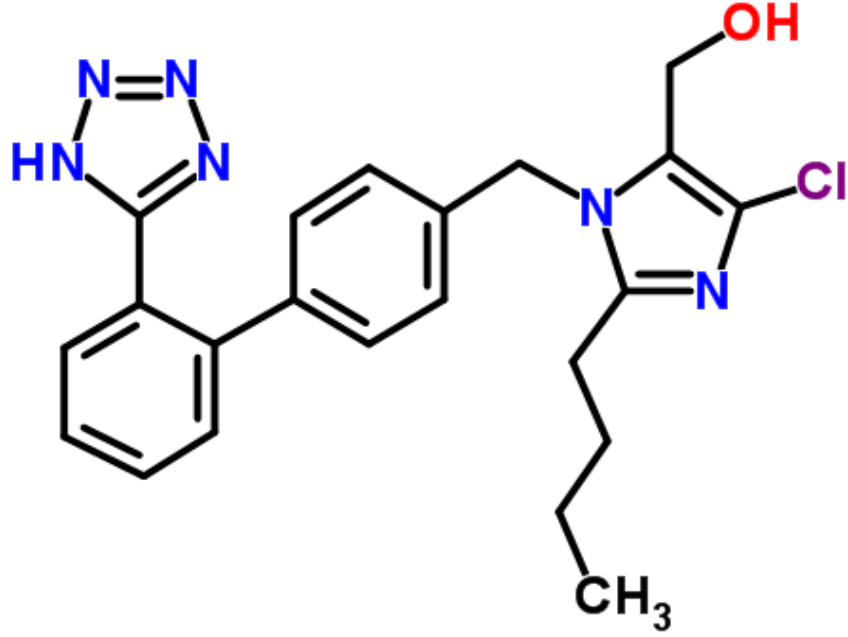
Oral uygulamayı takiben yaklaşık 1.5-2 saat içinde doruk plazma düzeyine ulaşır. Plazma yarılanma ömrü 11-15 saat kadardır. Irbesartan da eprosartan gibi glukuronid konjugatına metabolize edilir. Ana bileşik ve konjugat böbreklerden % 20, safra yoluyla % 80 oranında atılır. Irbesartanın plazma klerensi böbrek yetmezliğiyle hafif ve orta dereceli karaciğer yetersizliğinden etkilenmez. Irbesartanın oral dozu günde bir defa 150-300 mg'dir.⁸⁵



Şekil 2.6. Irbesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.4. Losartan

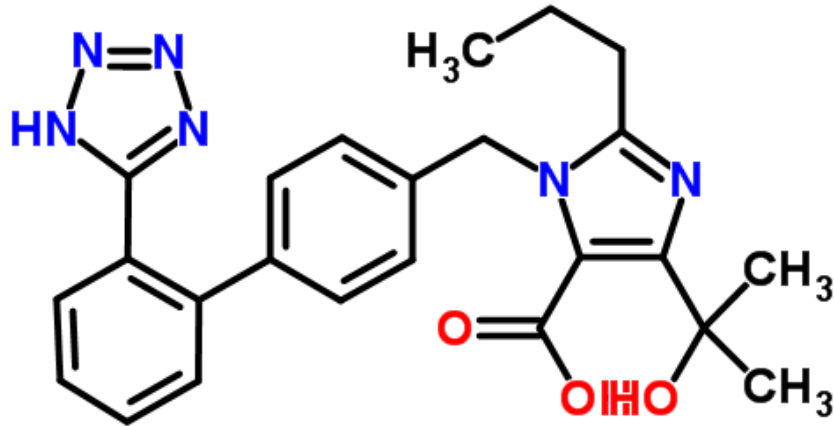
Oral yoldan kullanılan losartanın yaklaşık %14 kadarı, losartandan çok daha güçlü bir AT₁-reseptör antagonisti olan 5-karbosiklik asit metaboliti EXP3174'e dönüşür. Losartanın EXP3174 ve diğer inaktif metabolitlerine dönüşmesine CYP2C9 ve CYP3A4 aracılık eder. Oral kullanımdan sonra losartan 1 saat, EXP3174 ise 3 saat içinde doruk plazma düzeyine ulaşır. Losartanın plazma yarılanma ömrü 2.5 saat, EXP3174'ün ise 6-9 saat aralığındadır. Plazma klerensleri ise losartanın 600 mL/dk, EXP3174'ün 50 mL/dk olarak bulunmuştur. Losartanın böbrek klerensi 75 mL/dk, EXP3174'ün 25 mL/dk'dir. Karaciğerde metabolize olup safra yoluyla atılırlar. Günlük kullanımı bir kerede ya da ikiye bölünerek 25-100 mg aralığındadır.^{86, 87}



Şekil 2.7. Losartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.5. Olmesartan

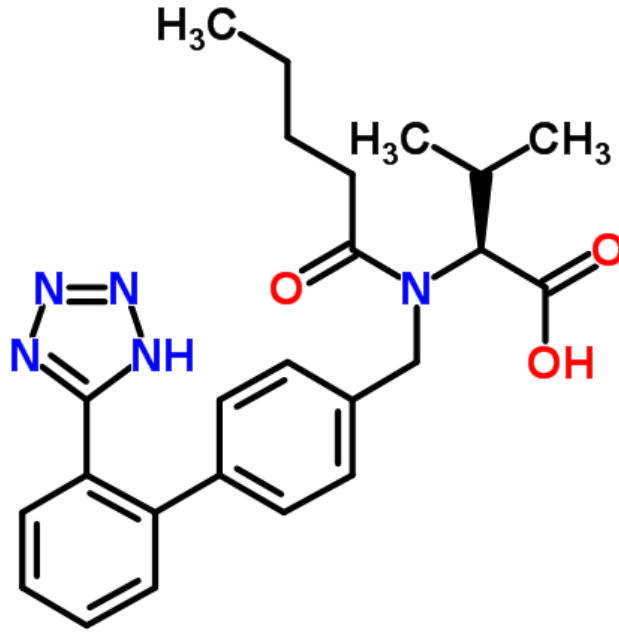
Olmesartan, mide bağırsak kanalından emildiği süre içerisinde, bütünüyle aktif şekli olan olmesartana dönüşen ester yapısında inaktif bir ön ilaçtır. Oral kullanımı izleyen 1.4-2.8 saat içerisinde doruk plazma düzeyine erişir. Plazma yarılanma ömrü 10-15 saat arasındadır. Olmesartanın plazma klerensi böbrek ve safradan atılarak gerçekleşir. Böbrek yetmezliği ve karaciğer hastalıklarında olmesartanın plazma klerensi düşse de hafif ya da orta dereceli yetersizliklerde doz ayarlanması gerekmez. Olmesartan medoksomil, oral yoldan günde tek doz, 20-40 mg olarak kullanılır.^{88, 89}



Şekil 2.8. Olmesartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.6. Telmisartan

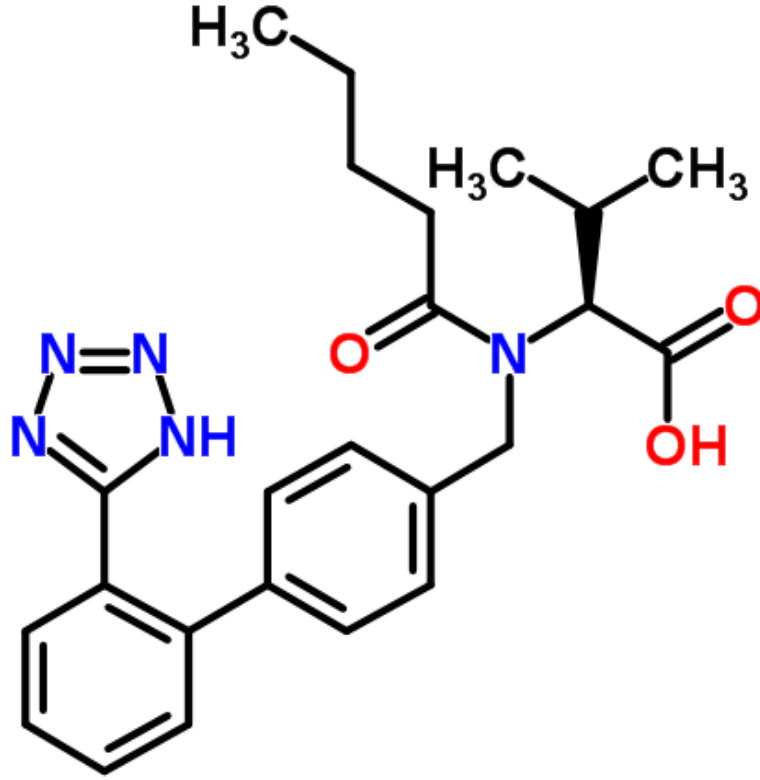
Oral uygulamada yaklaşık 0.5-1 saat sonra doruk plazma düzeyine ulaşır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 24 saattir. Telmisartan dolaşımından esas olarak safra yoluyla ve değişmeksizin atılır. Plazma klerensi, böbrek yetmezliğinde değişmemekle birlikte karaciğer yetmezliği olanlarda değişir. Oral yoldan önerilen dozu günde bir kez 40-80 mg'dır.^{90, 91}



Şekil 2.9. Telmisartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.11.7. Valsartan

Oral uygulamayı izleyen yaklaşık 2-4 saat içinde doruk plazma düzeyine ulaşır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 9 saattir. Emilimi gıda maddeleriyle önemli derecede azalır. Karaciğerden safra yoluyla atılır (total klerensin yaklaşık % 70'i). Plazma klerensi böbrek yetersizliği olan hastalarda değişmemekle birlikte karaciğer yetersizliği olan hastalarda değişir. Oral yoldan, günlük 80-320 mg arası tek doz olarak önerilir.^{92, 93}



Şekil 2.10. Valsartan etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12. β -Adrenerjik Reseptör Agonistleri

β -Adrenerjik Reseptör Agonistleri pek çok klinik ortamda uygulanmasına karşın, günümüzde astım (geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu) hastalarında görülen bronkokonstrüksiyonunun ya da kronik obstruktif akciğer hastalığının (KOAH) tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca erken doğum kasılmaları ile şokta görülen tam kalp durmasının tedavisinde ve cerrahi sonrası görülen kardiyak dekompenstasyonun kısa süreli tedavisi ile konjestif kalp yetmezliği yada miyokart infarktüsü görülen hastalarda da kullanım alanı bulunmaktadır.

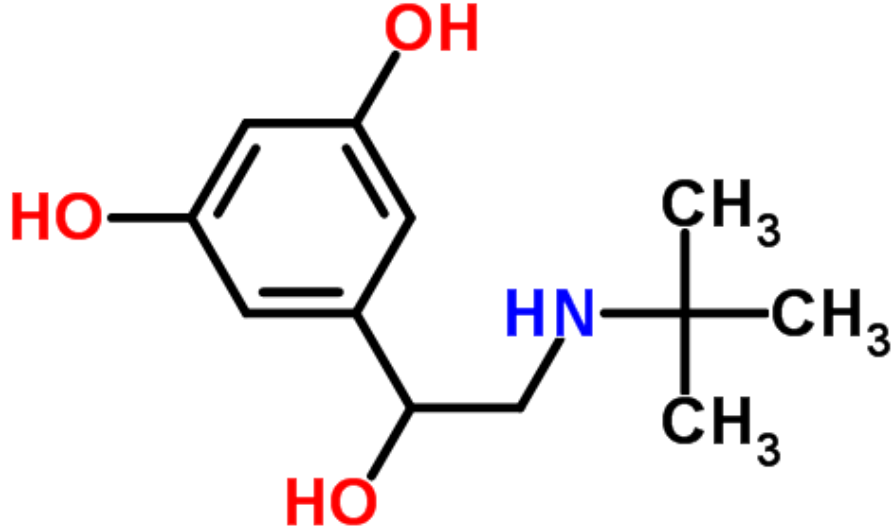
2.12.1. β_2 Seçici Adrenerjik Reseptör Agonistleri

Astım tedavisinde β reseptör agonistlerinin belli başlı yan etkilerinden birisi kalpteki β_1 reseptörlerinin uyarılması sonucu ortaya çıkar. Bu sebeple, β_1 reseptörlerinden ziyade β_2 reseptörlerine afinite gösteren ilaçlar geliştirilmiştir. Ancak bu seçicilik mutlak anlamda değildir ve bu ilaçların yüksek derişimde verilmeleri halinde kaybolmaktadır.

Astım tedavisinde bazı β_2 seçici agonistlerinin faydalarını arttıran ikinci bir strateji ise daha düşük dozda metabolizma ve yüksek oranda oral biyoyararlanımı (katekolaminlere kıyasla) mümkün kılan yapısal bazda gerçekleştirilmiş değişikliklerdir. Hidroksil gruplarını, fenil halkasının 3 ve 5 numaralı pozisyonlarına yerleştirmek ya da 3 numaralı pozisyona hidroksil grubu yerine farklı bir bileşik eklenmesi, gerçekleştirilen yapısal modifikasyonlardan bazılarıdır. Bu değişiklikler: metaprotenol, terbutalin ve albuterol gibi COMT substratı olmayan ilaçların oluşmasına sebep olmuştur. Katekolaminlerin amino grubundaki büyük parçalar, α reseptörlerine daha az, β reseptörlerine ise daha fazla etki edilmesine ve MAO metabolizmasının azalmasını sağlamıştır. Pulmoner β_2 reseptörleri üzerindeki aktivasyonu yoğunlaştırmak için gerçekleştirilen son strateji ise ilacın aerosol halinin düşük dozlar halinde inhalasyon yoluyla uygulanmasıdır. Bu sayede bronşlardaki β_2 reseptörleri etkin bir şekilde uyarılmış olurken, ilacın sistemik derişimi son derece düşük düzeyde kalmış olur. Sonuç olarak, oral tedaviyi sınırlayabilecek kardiyak β_1 reseptörlerinin veya tremorlara sebep olabilecek iskelet kasındaki β_2 reseptörlerinin uyarılması potansiyeli daha düşüktür.⁷⁷

2.12.1.1. Terbutalin

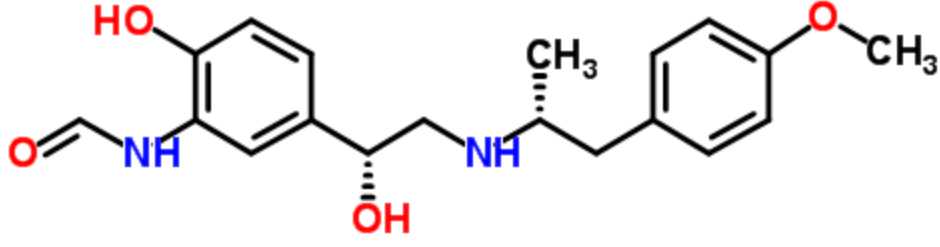
Terbutalin β_2 seçici bronkodilatör özellikli bir bileşiktir. Bir rezorsinol halkası taşıdığından COMT metilasyonunda substrat olarak kullanılamaz. Oral, subkutan ya da inhalasyon yolu ile alınımında etki gösterir. İnhalasyon veya parenteral yolla uygulandıktan sonra hızla etkisini gösterir; inhalasyon ile verilmesi sonrası etkisi 3-6 saat arası devam edebilir. Oral uygulaması halinde etkisini göstermesi 1-2 saati bulur. Terbutalin akut bronkospazm ve obstruktif hava yolu hastalıklarının uzun süreli tedavisinde kullanılır.⁹⁴



Şekil 2.11. Terbutalin etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12.1.2. Formoterol

Etkisi uzun süreli olan, β_2 seçici agonisti olan bir bileşiktir. Terapötik dozunun inhalasyon şeklinde uygulanması ile bronkodilasyon birkaç dakika içinde kendini gösterir ve etkisi 12 saate kadar devam eder. Yüksek oranda lipofilik özelliktedir ve β_2 reseptörlerine yüksek oranda afinite gösterir. Diğer pek çok β_2 seçici agonistlerinden farklı olarak gece astımı gibi durumlarla karşı karşıya kalındığında son derece faydalı olan uzun etki süresidir. Formoterol'ün uzun etki süresinin altında yatan neden plazma membranlarındaki çift lipid tabakasının arasına girebilmesi ve buradan düşük düzeyde difüze olarak β_2 reseptörleri üzerindeki uyarıcı etkisini göstermesidir. FDA tarafından astım, bronkospazm tedavisi, egzersiz-kaynaklı bronkospazmın profilaksisi ve kronik obstruktif pulmoner hastalık (KOPH) tedavisinde kullanılması onaylanmıştır. Kısa etkili β_2 agonistleri, glukokortikoidler (inhale veya sistemik) ve teofilin ile aynı anda kullanılabilir.⁹⁴



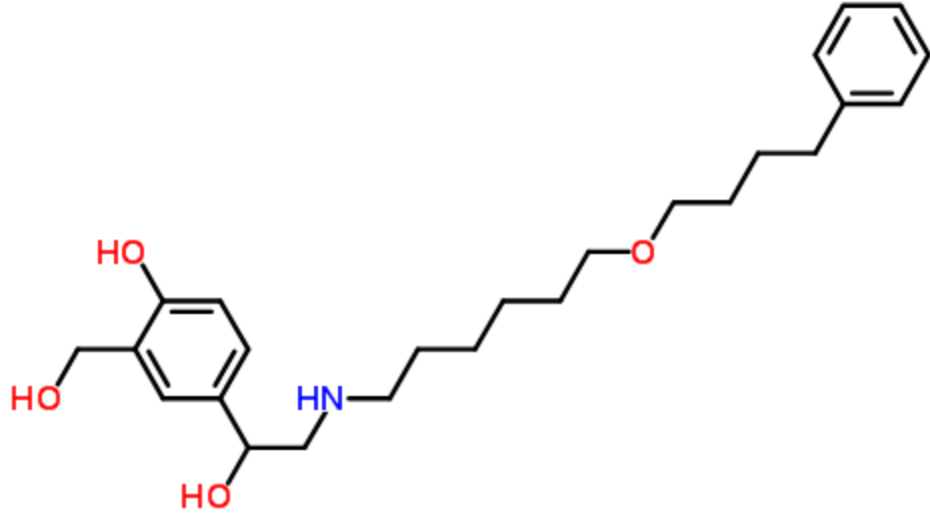
Şekil 2.12. Fomoterol etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12.1.3. Salmeterol

12 saatten daha fazla etki süresine sahip bir seçici β_2 reseptör agonistidir. Albuterole kıyasla reseptörlere karşı en az 50 kat daha güçlü bir seçicilik göstermektedir. Semptomatik rahatlama sağlar ve akciğerlerde rahatlama yolu açarak KOAH hastalarının yaşam kalitesini yükseltir; bu açıdan bakıldığında, bir kolinerjik antagonist olan ipratropium kadar etkili ve oral teofilinden ise daha fazla etkilidir. İnhalasyon ipratropiyum ya da teofilin ile birlikte kullanılırsa; ilave etkiler göstermektedir. Formoterol gibi yüksek derecede lipofiliktir ve uzun bir etki süresine sahiptir; bu uzun süreli etki salmeterolün, β_2 reseptörlerinin spesifik bir bölümüne bağlandığını göstermektedir. Anti-enflamatuar etkisi de mevcut olabilir. Salmeterol, CYP3A4 tarafından metabolize ederek primer olarak dışkı ile atılan α -hidroksi salmaterole dönüştürülür. İnhalasyon salmaterolün etkisini göstermesi nisbeten uzun sürdüğünden, akut bronkospazm nöbetlerinde monoterapi olarak kullanılması pek uygun değildir. Salmeterol ve formoterol, anti-enflamatuar ajanlar ve diğer standart tedavi yöntemlerinin uygulanmasına karşın semptomların devam ettiği gece astımı hastaları için tercih edilen ilaçlardır.⁹⁵

Formoterol gibi, salmeterol de genelde iyi tolere edilir. Ancak akciğer dışındaki β_2 reseptörlerine etki ederek kalp atım hızını ve plazma glukoz derişimini artırma, titremeler meydana getirme ve plazma potasyum derişimini düşürme gibi semptomlara sebep olabilir. Salmeterol günde iki dozdan fazla kullanılmamalıdır. Ani semptomları

ortaya çıkarsa kısa süreli etkiye sahip bir β_2 agonisti ile tedavi edilmesi gereken akut astım semptomlarında başvurulmamalıdır.⁹⁵

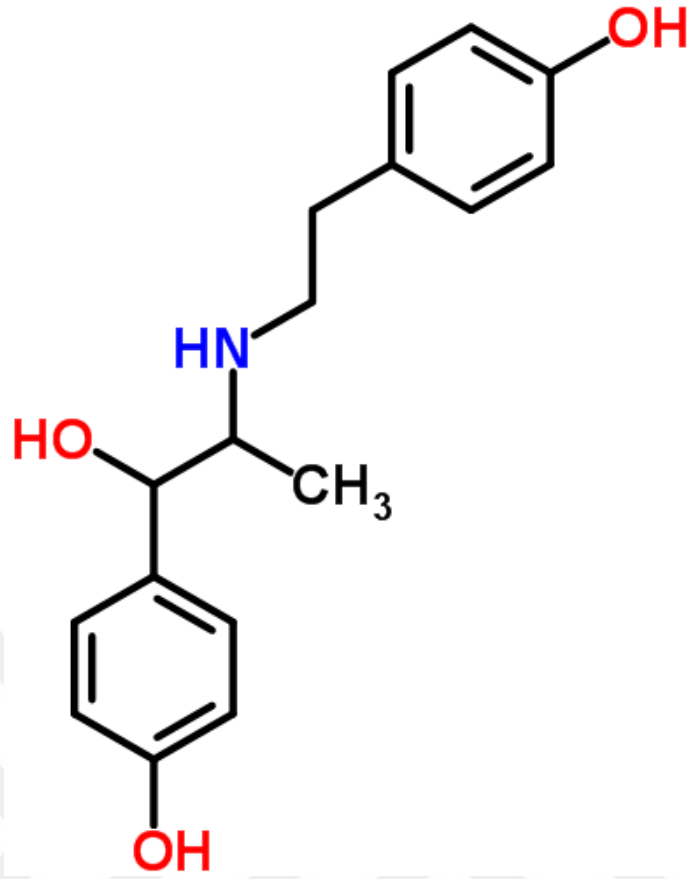


Şekil 2.13. Salmeterol etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12.1.4. Ritodrin

Ritodrin özellikle uterus gevşetmek için geliştirilmiş olan bir seçici β_2 reseptör agonistidir. Ancak farmakolojik özellikleri yine de bu grup içindeki diğer ajanlara benzemektedir.

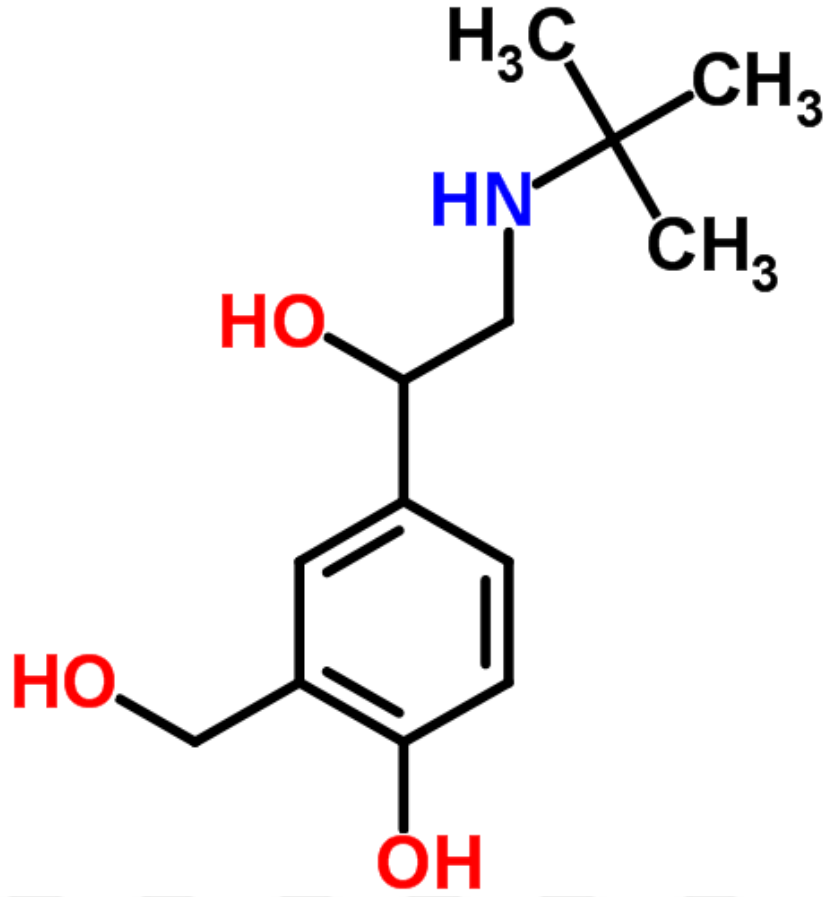
Ritodrin oral uygulamasının ardından hızla ancak kısmi olarak (% 30) emilir ve ilacın % 90'lık bölümü idrarla inaktif konjugatlar halinde atılır: ritodrinin yaklaşık % 50'si, intravenöz uygulaması sonrası değişmeden atılır. Ritodrinin farmakolojik özellikleri kompleks yapıdadır ve özellikle hamilelerde henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.⁹⁶



Şekil 2.14. Ritodrin etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12.1.5. Salbutamol

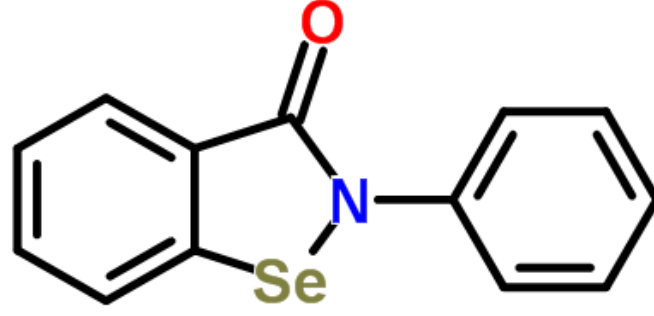
Salbutamol seçici bir β_2 adrenoreseptör uyarıcısıdır. İnhalasyon işlemi takiben bronşlara etki eder ve β_1 ve β_2 uyarıcısı olarak işlev görür. 48 saat içerisinde % 77-97'lik kısmı idrar ile atılır. Yaklaşık % 60'lık kısmı 4-o-ester metaboliti şeklinde vücuttan atılır. İlk alımdan sonra kanda görülmesi için 2-3 saat geçmesi gerekir. Plazmada bulunma oranı son derece düşüktür.⁹⁷



Şekil 2.15. Salbutamol etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.12.1.6. Ebselen

Ebselen (2-fenil-1,2-benziselenazol3(2H)-on) olarak isimlendirilen, toksik olmayan seleno-organik bir etkin maddedir. Anti-inflamatuvar, anti-aterosklerotik ve antioksidan özelliklere sahiptir. Tiyollere ve hidroperoksitlere karşı yüksek bir afinite gösterir. Antioksidan bileşikler olarak bilinen tokoferol ve probucol gibi bileşikler serbest radikalleri süpürme özelliği gösterirken ebselen molekülü direk olarak organik hidroksiperoksi-lipidlere karşı süpürücü etkisini gösterir. Genel mekanizma olarak bu özelliği ile alışlagelmiş antioksidanlardan farklı bir yol izler. Lipid peroksidasyon özelliği diğer antioksidan moleküllere karşı görece düşüktür.⁹⁸



Şekil 2.16. Ebselen etkin maddesinin kimyasal yapısı

2.13. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan; geniş bir analitik yöntemler grubu olarak isimlendirilmişlerdir. Spektroskopik yöntemler birçok amaca hizmet edebilirler. Örneğin; organik ve inorganik bileşiklerin nitel ve nicel analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin saptanmasında ayrıca yeni sentezlenen ya da keşfedilen bileşiklerin molekül yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemlere sıklıkla başvurulmaktadır. Spektroskopi kavramı geçmişte görünür bölge ışınlarının farklı dalga boylarına ayrılması ve bunun sonucunda spektrumlarının elde edilmesi kavramı olarak kullanılırken günümüzde teknolojinin ilerlemesi ve yeni spektroskopik yöntemlerin keşfiyle birlikte elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen genel bir bilim dalı olarak tanımlanmıştır. Daha önce spektroskopi temel olarak yalnızca elektromanyetik ışın ile madde arasında olan etkileşimler bağlı olarak madde hakkında bilgi edinmemizi sağladı; ancak günümüz için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir.⁹⁹

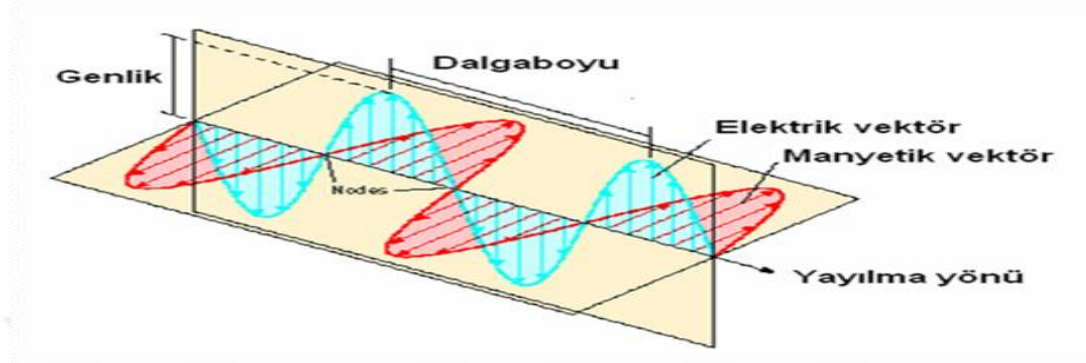
Elektromanyetik ışın dalgası ve parçacık yapısında bulunan uzayda çok büyük bir hızla hareket eden, pek çok yapıya girebilen bir enerji şekli olarak tanımlanmıştır. Eğer çalışmada, elektromanyetik ışının madde (atom veya moleküller) tarafından yayılımı irdeleniyorsa; yayılma (emisyon) buna karşın soğurulması inceleniyorsa; soğurma (absorpsiyon) spektroskopileri olarak isimlendirilir. Işının moleküller tarafından

soğurulması moleküldeki atomların büyüklüğü, türü, moleküler yapısı gibi özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin saptanması, bulunması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Spektroskopik analizlerde yöntemin prensibine göre madde üzerine dalga boyu 110 nm den 30000 nm'ye kadar değişen farklı ışınlar gönderilebilir. Bütün bu dalga boylarında ışın yapabilecek ve hangi dalga boylarının yayılım yahut soğurma olduğunu saptayabilecek tek bir cihazın tasarlanması mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan birbirinden farklı cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarında ışın yapan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-30000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları adı verilir. Bu cihazların geçerli olduğu alandaki spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole-Görünür Bölge Absorpsiyon (UV-Visible), Infrared (IR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.¹⁰⁰

2.13.1. Elektromanyetik Işın (Radyasyon) ve Genel Özellikleri

Işın veya elektromanyetik ışın (radyasyon) uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji şeklidir. Uzayda ışık dalga şeklinde hareket eder. Elektromanyetik ışın hem dalga hem de tanecik özelliklerini taşıyabilmektedir. Elektromanyetik ışın klasik sinus dalga boyu özellikleriyle açıklanabilecek bazı parametrelere sahiptir. Bunlar; dalga boyu, frekans, periyot, hız, dalga sayısı, kırınım ve genliktir. Elektromanyetik ışının soğurma ve yayılma ile ilgili özellikleri için dalga teorisi tek başına yeterli olamamaktadır. Soğurma ve yayılma özellikleri için parçacık modeli geliştirilmiştir. Bu modele göre elektromanyetik ışın, enerjileri ışın frekansı ile ilişkili olarak değişebilen ve foton adı verilen parçacıklar veya dalga paketlerinden oluşmuştur ve maddesel özellikler göstermektedir.

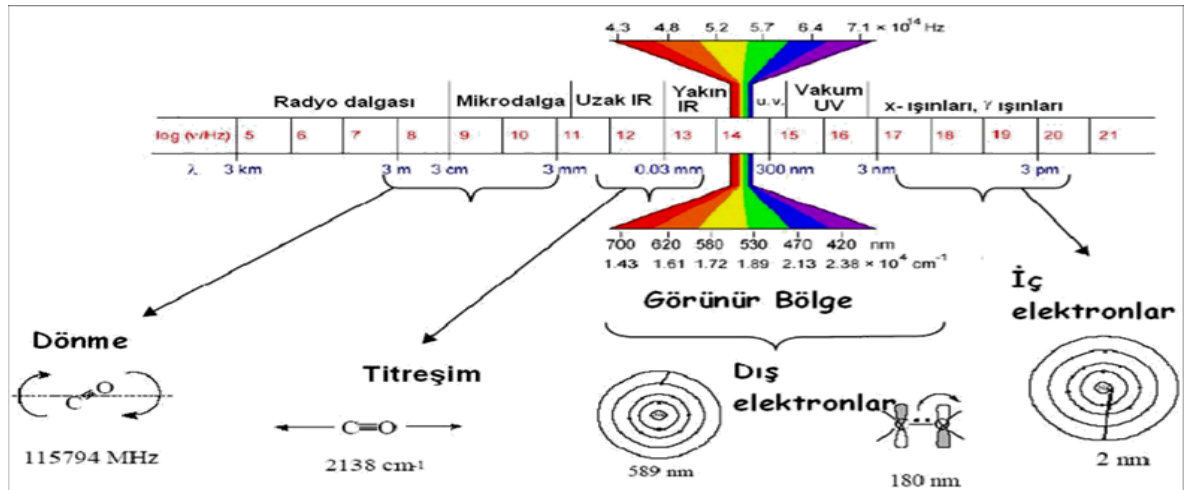
Elektromanyetik ışın elektriksel alan ve manyetik vektörlerin ikisine de sahiptir. Bu iki alan sinusoidal özellik gösterir ve bu iki vektör hem ışının yayılma yönüne hem de birbirlerine dik açıdadır. Madde ile elektromanyetik ışının etkileşmesi bu iki vektör sayesinde oluşur (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Elektromanyetik dalga

2.13.2. Elektromanyetik Spektrum Diagramı

Şekil 2.18’de görüldüğü gibi elektromanyetik spektrum, çok geniş bir dalga boyu ve frekans (enerji) aralığını içine almaktadır. Spektroskopik ölçümlerin esas aldığı bölgeler Şekil 2.18’te gösterilmiştir.¹⁰¹



Şekil 2.18. Elektromanyetik spektrum bölgeleri

2.13.3. Işının Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, şeffaf ve saydam bir ortamdaki geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu gözlemlenir. Bu olaya ışının

absorplanması denir. Absorpsiyon yoluyla ışın enerjisi, maddenin atom, iyon ve moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekülün 8-10 saniye kadar ömrü vardır. Bundan sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir.¹⁰²

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları genel olarak iki kısma ayrılır.¹⁰²

- ✓ Atomik Absorpsiyon Spektrumları
- ✓ Moleküler Absorpsiyon Spektrumları

2.13.4. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

Polikromatik bir UV-Görünür Bölge ışını tek atomlu civa veya sodyum gazı gibi bir ortamdan geçirilirse demetten bazı ışınların kaybolduğu görülür. Sodyum buharından ışın geçirilirse sarı ışının kaybolduğu görülür. Sarı ışının sodyum atomları tarafından adsorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir.¹⁰² Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon spektroskopisi denir.¹⁰²

2.13.5. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

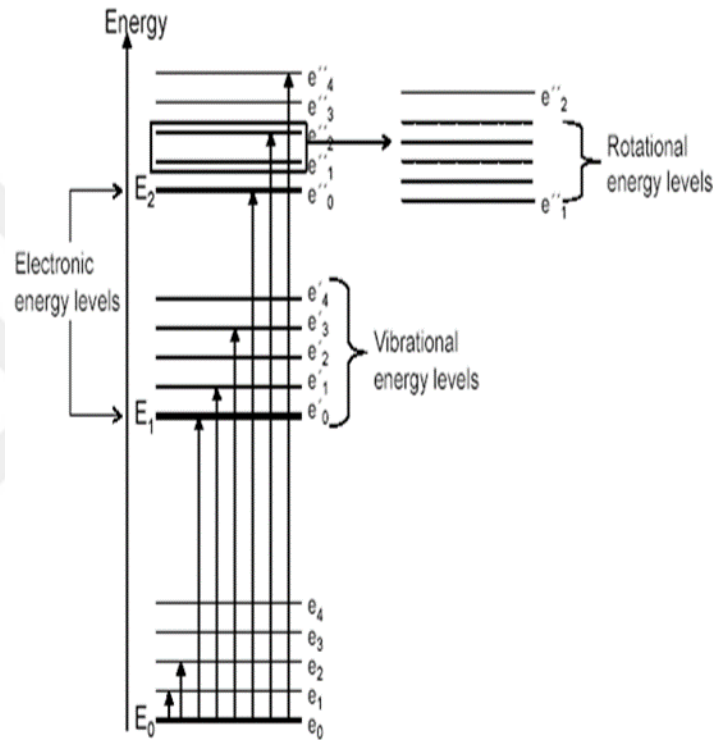
Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış olan 3 tip geçiş görülür. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve

dönme geçişleridir. Bir molekülün toplam enerjisi E_T ;

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir.^{99, 100}

Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir (Şekil 2.19).



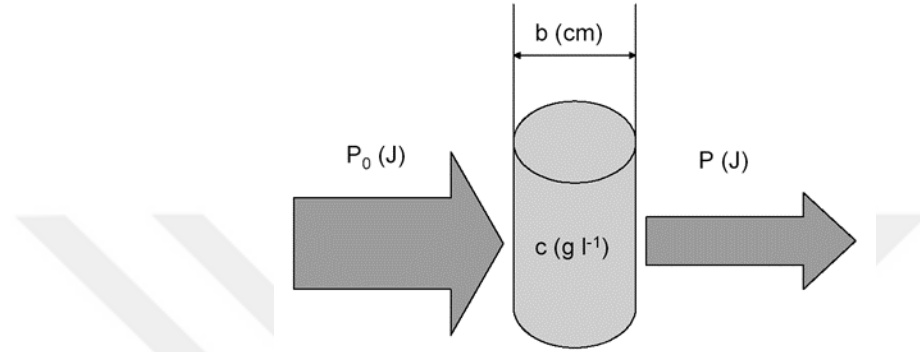
Şekil 2.19. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonel enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

Elektronik geçişler dalga boyları 200-800 nm arasında olan UV ve görünür bölge ışınlarıyla gerçekleşir.

Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden en önemli olan farkı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir. Bir molekülün UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumu,

molekölün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.

Bir maddenin çözeltisinden polikromatik bir ışın demeti geçirildiğinde, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar (Şekil 2.20).^{99, 102}



Şekil 2.20. Absorblayan bir çözeltiye giren P₀ şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye P₀ şiddetinde giren ışın çözeltiyi P şiddetinde terk eder. Fotonlarla ışın absorblayan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak ışının gücü P₀'dan P'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin ortamdaki geçme oranına geçirgenlik (T) adı verilir.^{99, 102}

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0}$$

şeklinde formüle edilir. Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorbans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = \frac{P}{P_0} 100$$

Bir çözeltinin absorpsiyonu, ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

şeklinde verilir ve burada ϵ molar absorptivite katsayısı olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir.¹⁰²

$$P = P_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot b \cdot c}$$

2.13.6. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunu sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen bir kanundur. Bunun nedeni yüklü taneciklerin birbirinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmeleridir. Yük dağılımı değişen bir taneciğin absorplama kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorpsiyon arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur. Sapmalar;

- 1- Cihazdan gelen sapmalar
- 2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar
- 3- Analizci hatasından gelen sapmalar

şeklinde üçe ayrılabilir.^{99, 102}

2.13.7. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorpsiyon ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrofotometreleri, 110 nm'den 1000 nm arasında değişen

dalga boylarında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığı kritiktir. Düşük dalga boyu yüksek enerji barındıran bu yöntemle çalışan cihazlar vakum özellikli ve oldukça pahalı cihazlardır. Bu sebeple, çok özel araştırmalar dışındaki çalışmalarda genellikle laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak iki farklı lamba kullanılır ve bunlar döteryum ve tungsten lambalarıdır. Döteryum lambası yaklaşık olarak 160-400 nm aralığında ışın üretmek için, Tungsten lambası ise 350-2500 nm arasında ışın üretmek için tercih edilmektedir.^{99, 102}

UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır;

- 1- Tek ışınlı spektrofotometreler
- 2- Çift ışınlı spektrofotometreler

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Antioksidan Kapasite Tayininleri

Antioksidan ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan kimyasallar ve bu kimyasalların tedarik edildiği yerler Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Antioksidan kapasite tayininlerinde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Amonyum tiyosiyanat	Sigma-Aldrich
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich
2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)	Sigma-Aldrich
Demir II klorür ($FeCl_2$)	Sigma-Aldrich
1,1-Difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich
Amonyum Asetat	Sigma-Aldrich
6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Trolox)	Sigma-Aldrich
Neokuproin	Sigma-Aldrich
Tripridil-s-Triazin (TPTZ)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$)	Sigma-Aldrich
Demir (III) Klorür	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibazik	Sigma-Aldrich
Etanol (Analitik Grade)	Sigma-Aldrich
Metanol (Analitik Grade)	Sigma-Aldrich

3.2. Çalışmada Kullanılan İlaç Etkin Maddeleri

Antioksidan, antikolinesteraz ve lipid peroksidasyon değerlerine bakılan ilaç etkin maddelerinin isimleri ve tedarik edildikleri birimler Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.2. Çalışmada incelenen ilaç etkin maddeleri

İlaç Etkin Madesi	Firma
Valsartan	Sigma-Aldrich
Olmesartan	Sigma-Aldrich
Telmisartan	Sigma-Aldrich
Terbutalin	Sigma-Aldrich
Irbesartan	Sigma-Aldrich
Ritodrin	Sigma-Aldrich
Losartan	Sigma-Aldrich
Candesartan	Sigma-Aldrich
Salbutamol	Sigma-Aldrich
Fomoterol	Sigma-Aldrich
Amlodipin	Sigma-Aldrich
Ebselen	Sigma-Aldrich
Salmaterol	Sigma-Aldrich
Enalapril	Sigma-Aldrich
Kaptopril	Sigma-Aldrich

3.3. AChE ve BuChE İnhibisyon Aktivitesi Tayininleri

Tablo 3.3. AChE ve inhibisyon aktivitesi tayininlerinde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Asetilkolinesteraz (AChE, E.C. 3.1.1.7, electric eel)	Sigma-Aldrich
5,5-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma-Aldrich
Asetiltiyokolin iyodid (ATCI)	Sigma-Aldrich
Butiriltiyokolin iyodid (BTCl)	Sigma-Aldrich
Neostigmin bromür	Sigma-Aldrich
Tris Tamponu	Sigma-Aldrich

3.4. Aletler ve Cihazlar

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz	Marka
Etüv	Memmert Typ. UM 500
pH metre	Mettler Toleo
Hassas terazi	Scaltec SBA 31
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex RK 255 H
UV Spektrometresi	Thermo Scientific Multiskan GO
Vorteks	Isolab Vortex Mixer VM-20

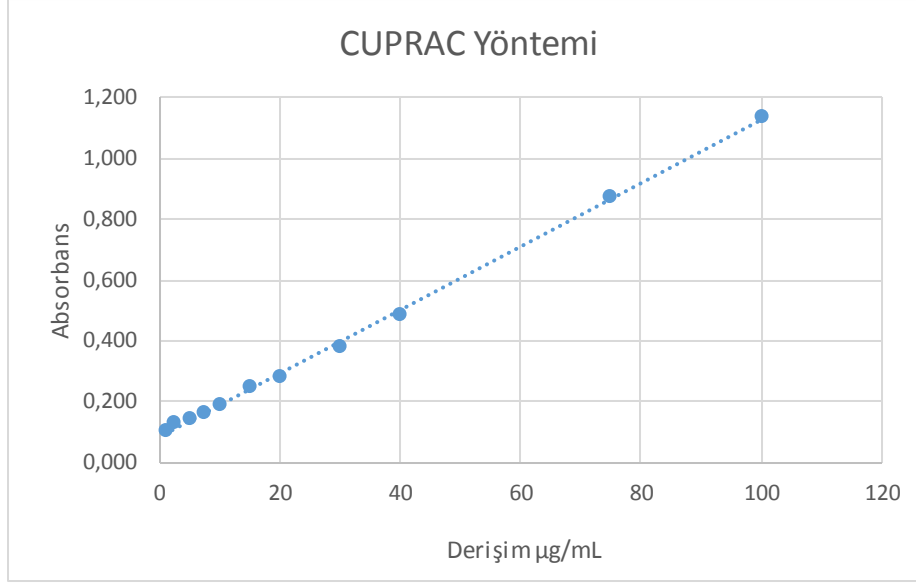
4. BULGULAR

4.1. CUPRAC Antioksidan Tayin Yöntemi

Öncelikle CUPRAC reaktifi hazırlamak için 0.4262 gram $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 250 mL saf su içerisinde çözüldü (10 mM). Daha sonra asetat tamponu hazırlamak üzere 19.27 gram NH_4Ac 250 mL suda çözüldü. 7.5 mM neocuproin çözeltisi 0.039 gram Neocuproin bileşiğinin 25 mL'lik balon jodede %96 saflıkta etanol ile hazırlanmasıyla elde edildi. Daha sonra 60 μL CuCl_2 , 60 μL asetat tamponu, 60 μL neocuproin çözeltisi ve 66 μL numuneden oluşan çözelti karıştırıldı. 30 dakika inkübe edildi ve 450 nm dalga boyunda ölçümleri alındı. Yöntem Cu(II) Neocuproin kompleksinin ortamdaki antioksidan etki gösteren bileşikler vasıtasıyla Cu(I) Neocuproin'e dönüşmesi ve bu kompleksin 450 nm dalga boyunda verdiği absorbansa dayanmaktadır. Kontrol numunesi olarak Troloks kullanıldı. Her bir derişimde 6 farklı Troloks numunesi alındı ve absorbansları okundu. Her bir derişime karşı gelen ortalama absorbans değerleri Tablo 4.1'de verildi. Derişime karşı absorbans grafiğinin lineer olduğu 1-100 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığının kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.1) ve istatistiksel hesaplamaları yapıldı (Tablo 4.2). Daha sonra ilaç numuneleri 6'şar örnek olacak şekilde aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri hesaplandı. Ortalama eşdeğer troloks miktarları Tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4.1. Troloks derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri

Derişim $\mu\text{g/mL}$	1	2.50	5.00	7.50	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00	75.00	100.00
A	0.104	0.127	0.144	0.162	0.188	0.248	0.284	0.382	0.483	0.873	1.139
B	0.106	0.132	0.148	0.164	0.191	0.249	0.274	0.390	0.482	0.876	1.142
S	0.109	0.134	0.140	0.163	0.196	0.248	0.281	0.392	0.481	0.875	1.145
O	0.112	0.125	0.142	0.170	0.192	0.254	0.283	0.391	0.491	0.871	1.136
R	0.113	0.126	0.150	0.161	0.183	0.240	0.288	0.384	0.488	0.872	1.146
B	0.115	0.122	0.148	0.164	0.191	0.241	0.296	0.374	0.480	0.876	1.140
A											
N											
S											



Şekil 4.1. Derişime karşılık absorbans grafiği

Tablo 4.2. Kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Yöntem	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
CUPRAC	1-100	$y = 0.0104x + 0.0855$	4×10^{-4}	7×10^{-5}	0.9988

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R²: korelasyon katsayısı

Tablo 4.3. CUPRAC yöntemi için ortalama eşdeğer troloks miktarları

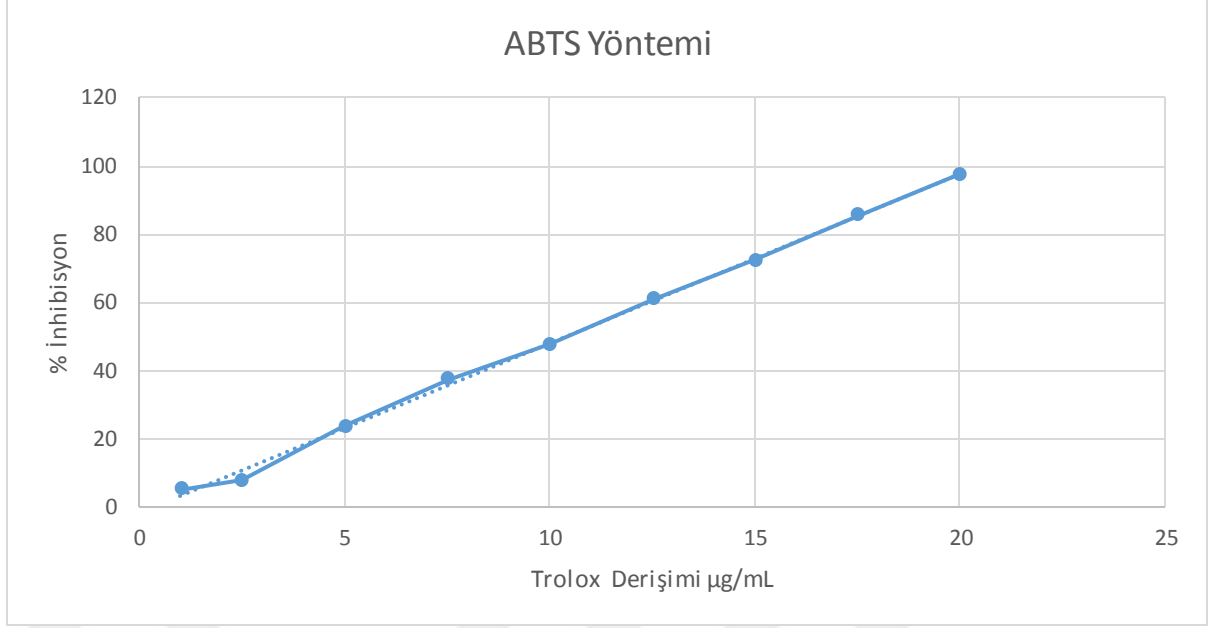
İlaçlar	Trolox eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
Valsartan	11.93
Olmesartan	20.19
Telmisartan	3.96
Terbutalın	17.93
Irbesartan	8.42
Ritodrin	15.27
Losartan	4.47
Candesartan	2.14
Salbutamol	6.43
Fomoterol	25.09
Eprosartan	0.00
Ebselen	0.00
Salmaterol	17.93
Enalapril	6.10
Kaptopril	2.60

4.2. ABTS Antioksidan Tayin Yöntemi

ABTS•+ giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmaya göre belirlenmiştir. Öncelikle 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltime 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS•+ elde edildi. ABTS•+ çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.700 ± 0.025 ayarlandı. Farklı derişimlerdeki (1-40 µg/mL) ekstrelerinin stok çözeltilerinden 140 µL pleyte alınmış ve üzerine 100 µL ABTS•+ çözeltisi ilave edildikten sonra çalkalanıp 30 dakika inkübe edilmiştir. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi. Kontrol numunesi olarak Troloks kullanıldı. Her bir derişime karşı gelen ortalama inhibisyon değerleri Tablo 4.4'de verildi. Derişime karşı inhibisyon grafiğinin lineer olduğu 1-20 µg/mL çalışma aralığının kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.2) ve istatistiksel hesaplamaları yapıldı (Tablo 4.5). Daha sonra ilaç numuneleri 6'şar örnek olacak şekilde aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri hesaplandı. Ortalama eşdeğer troloks miktarları Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.4. Derişime karşı gelen ortalama inhibisyon değerleri

Derişim µg/mL	1	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
	5.187	7.854	23.639	37.462	47.611	61.014	72.296	85.640	97.444
	5.213	7.850	23.608	37.412	47.650	61.040	72.282	85.624	97.440
% İnhibisyon	5.145	7.842	23.600	37.468	47.582	61.020	72.296	85.642	97.424
	5.223	7.874	23.650	37.476	47.610	61.032	72.264	85.618	97.480
	5.172	7.876	23.661	37.482	47.620	60.982	72.314	85.660	97.490
	5.201	7.891	23.642	37.470	47.620	61.024	72.318	85.640	97.512



Şekil 4.2. Derişime Karşılık yüzde inhibisyon grafiği

Tablo 4.5. Kalibrasyon eğrisinin istatistiksel değerleri

Yöntem	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
ABTS	1-20	$y = 4.9584x - 1.452$	4×10^{-4}	7×10^{-5}	0.9981

Tablo 4.6. ABTS yöntemi için ortalama eşdeğer troloks miktarları

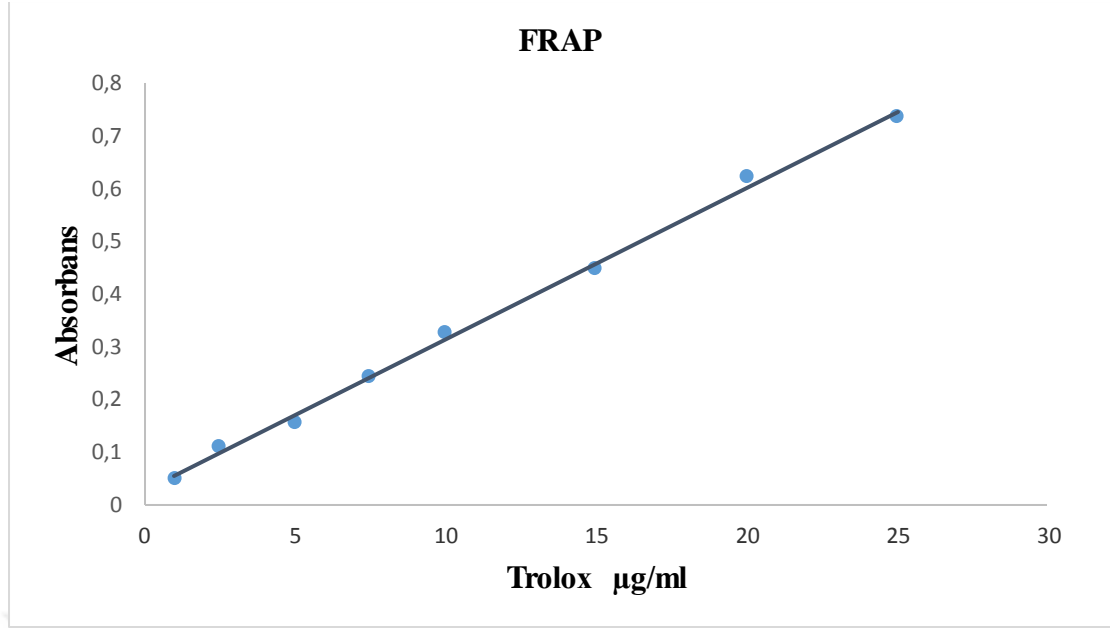
İlaçlar	Troloks eşdeğer yüzde inhibisyon (µg/mL)
Valsartan	7.19
olmesartan	8.33
Telmisartan	8.43
Terbutalin	93.12
Irbesartan	16.65
Ritodrin	78.33
Losartan	9.70
Candesartan	9.19
Salbutamol	81.61
Fomoterol	62.52
Amlodipin	16.76
Ebselen	15.59
Salmaterol	49.77
Enalapril	44.17
Kaptopril	19.77

4.3. FRAP

Frap yöntemi genel prensip olarak CUPRAC yöntemiyle benzer bir yöntemdir. Bu yöntemde inhibisyon yerine oluşan kompleksin derişimine göre absorbans artar. Bu yüzden FRAP ile CUPRAC yöntemlerinin korelasyonu diğer yöntemlere nazaran daha yüksektir. FRAP numunesi hazırlayabilmek için öncelikle 10 mM TPTZ çözeltisi içerisinde 40 mM HCl asit içerecek şekilde 100 mL balon jøjeye alındı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Başka bir kapta 20 mM FeCl₃ çözeltisi hazırlandı. Üçüncü bir kapta ise pH 3.6'da 0.3 M asetat içeren bir asetat tamponu hazırlandı. Bu üç çözeltden eşit hacimlerde alınarak 30 mL'lik FRAP çözeltisi elde edildi. Daha sonra bu çözeltden 285 µL pleytlere aktarıldı ve üzerine 15 µL örnek ilave edildi. 30 dakikalık inkübasyon evresinden sonra çözeltiler 593 nm dalga boyunda ölçüldü. Çalışmada kontrol numunesi olarak Troloks kullanıldı. Her bir derişime karşı gelen ortalama absorbans değerleri Tablo 4.7'de verildi. Derişime karşı absorbans grafiğinin lineer olduğu 1-50 µg/mL çalışma aralığının kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.3) ve istatistiksel hesaplamaları yapıldı (Tablo 4.8). Daha sonra ilaç numuneleri 6'şar örnek olacak şekilde aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri hesaplandı. Ortalama eşdeğer troloks miktarları Tablo 4.9'da verildi.

Tablo 4.7. Derişime karşı gelen ortalama absorbans değerleri

Derişim µg/mL	1	2.50	5.00	7.50	10.00	15.00	20.00	25.00	30	35	40	45.00	50.00
A	0.049	0.110	0.156	0.243	0.327	0.448	0.622	0.738	0.893	1.038	1.182	1.327	1.471
B	0.051	0.112	0.152	0.240	0.330	0.450	0.622	0.740	0.882	1.022	1.142	1.336	1.490
S	0.049	0.113	0.158	0.242	0.332	0.444	0.624	0.740	0.878	1.026	1.145	1.338	1.460
O	0.048	0.110	0.156	0.244	0.336	0.448	0.628	0.742	0.894	1.042	1.136	1.320	1.482
R	0.051	0.108	0.158	0.244	0.324	0.442	0.620	0.748	0.882	1.048	1.146	1.326	1.484
B	0.049	0.110	0.156	0.242	0.326	0.440	0.620	0.732	0.896	1.050	1.140	1.330	1.472
A													
N													
S													



Şekil 4.3. Derişime karşılık absorbans grafiği

Tablo 4.8. Kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Yöntem	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
FRAP	1-50	$y = 0,0289x + 0,0261$	4×10^{-4}	7×10^{-5}	0,9975

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R²: korelasyon katsayısı

Tablo 4.9. Ortalama eşdeğer troloks miktarları

İlaçlar	Trolox eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
Valsartan	4.90
olmesartan	11.98
Telmisartan	4.86
Terbutalin	14.13
Irbesartan	4.90
Ritodrin	15.06
Losartan	4.24
Candesartan	17.45
Salbutamol	3.64
Fomoterol	18.60
Amlodipin	8.20
Ebselen	30.88
Salmaterol	3.71
Enalapril	3.98
Kaptopril	3.71

4.3.1. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu Lipid Peroksidasyonu (LPO)' nun son ürünlerinden olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA' nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği tepkimeyi temel alır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere tepkimeye girer. LPO ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemine göre MDA' nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm' de ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.

Homojenatı hazırlamak için 0.5 mL yumurta sarısı alınarak %10 'luk distile su ile karıştırıldı ve homojenize edildi. Her bir deney tüpüne 0.1 mL homojenizat ve örnekler eklendi. Daha sonra 0.07 M' lik 0.05 mL FeSO₄ eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. 1.5 mL % 20' lik asetik asit, 1.5 mL % 8' lik TBA (% 1.1 sodyum dodesil sülfat içinde) ve % 20'lik TCA eklenerek vortekslendi. 60 dakika çalkalayıcılı su banyosunda tüpler kaynatıldı. Biraz soğuduktan sonra üzerlerine 5 mL bütanol eklenerek 3000 rpm de santifrj edildi ve numuneler 532 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Lipid Peroksidasyona karşı maddelerin gösterdiği direnç Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Yüzde lipid süpürme gücü

İlaçlar	Yüzde lipid süpürme gücü
Valsartan	9.85
Olmesartan	43.21
Telmisartan	13.08
Terbutalin	24.28
Irbesartan	21.20
Ritodrin	17.24
Losartan	12.00
Candesartan	14.65
Salbutamol	19.83
Fomoterol	20.08
Amlodipin	20.81
Ebselen	11.32
Salmaterol	68.06
Enalapril	96.97
Kaptopril	71.73

4.4. Anti-kolinesteraz Aktivite

Çalışmada adı geçen ilaçlar ile ticari olarak temin edilebilen donezepil bileşiği referans alınarak Kolometrik Ellman yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Örnekler dimetilsülfoksit içinde çözüldü ve farklı derişimlere 50 mM Tris tampon çözeltisi (pH 8.0) ile seyreltildi. Tris tampon çözeltisinden 50 µL, 3 mM DTNB çözeltisinden 125 µL, 0.2 U/mL derişimdeki enzim (AChE veya BuChE) çözeltisinden 25 µL ve 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL 11 farklı derişimde 25 µL numune kuyucuklara eklenerek oluşan karışım 37 °C' de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 15 dakikalık inkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuğa 25 µL hacimde 15 mM derişimde substrat çözeltisi ilave edildi. Tepkime karışımının absorbsansları 412 nm'de mikroplate okuyucu yardımıyla 45 sn'de bir olmak üzere okutuldu. Yapılan bu işlem her bir pleyt için altı kere tekrarlandı.

Tablo 4.11 Yüzde antikolinesteraz inhibisyon değerleri

İlaçlar	Yüzde Antikolinesteraz inhibisyon değerleri
Valsartan	11.00
Olmesartan	7.00
Telmisartan	13.00
Terbutalin	11.00
Irbesartan	27.00
Ritodrin	15.00
Losartan	15.00
Candesartan	19.00
Salbutamol	10.00
Fomoterol	12.00
Amlodipin	14.00
Ebselen	20.00
Salmaterol	15.00
Enalapril	16.00
Kaptopril	7.00

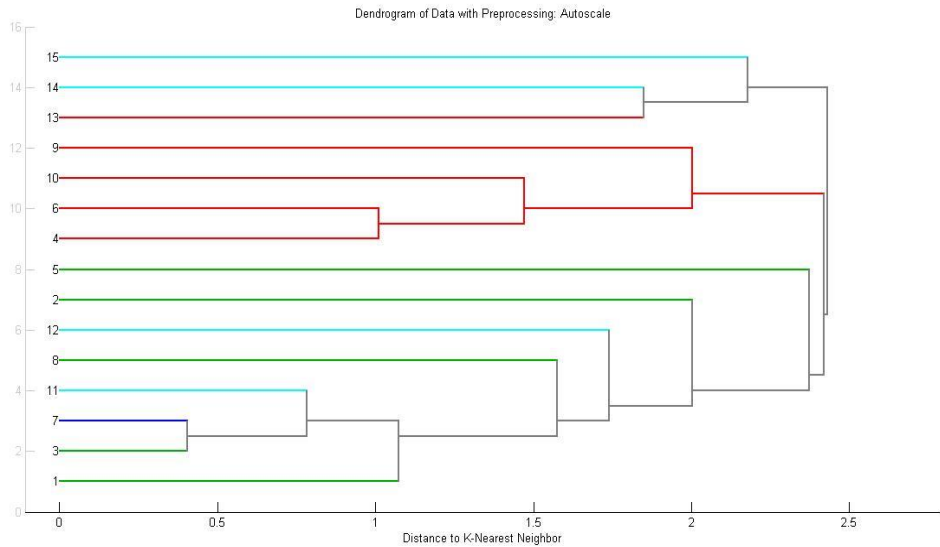
4.5. Kemometrik Analizler

4.5.1. Hiyerarşik Küme Analizi

MATLAB bilgisayar programı kullanılarak kemometrik analizler yapıldı. İlaçlar farklı sınıflar altında değerlendirildi. İlk sınıfta β agonistleri olan salbutamol, salmaterol, fomoterol, salbutamol ritodrin ve terbutalin yer almaktadır. İkinci grupta ise valsartan, olmesartan, telmisartan, candesartan, irbesartan, losartan ve eprosartan etkin maddelerinden olan angiotensin reseptör antagonistleri yer almaktadır. Üçüncü grupta enalapril ve kaptopril yer almaktadır. Dördüncü ve son grupta ise ebselen ve amlodipin yer almaktadır.

Yapılan Hiyerarşik kümeleme analizi ile 1 gruptaki β agonistleri olan salbutamol, salmaterol, fomoterol, ritodrin ve terbutalin net bir şekilde diğer gruplardan ayrıldı.

Hiyerarşik küme analizine ait dendogram Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. Hiyerarşik küme analizi dendogramı

Bu yöntemde faktör 4 olarak alındı. Kırmızı ile gösterilen ilaç etkin maddeleri β agonistleri olarak da bilinen salmaterol, fomoterol, ritodrin, terbutalin ve salbutamol bileşikleridir. Yapılan analizde anjiyotensin reseptör antagonistleri ve diğer ilaçlardan

kolaylıkla ayrıldığı ve dendogram ağacında birlikte ilişkilendirildiği açık bir şekilde görülmektedir.

4.5.2. Kısmi En Küçük Kareler – Diskriminant Analizi (PLS-DA)

β agonistleri olan salbutamol, salmeterol, fomoterol, salbutamol ritodrin ve terbutalin etkin maddelerine kısmi en küçük kareler diskriminant analiz yöntemiyle de kümeleştirme çalışması yapıldı. Yapılan PLS-DA analizine dair bileşen analiz değerleri Tablo 4.12’de verildi.

Tablo 4.12. PLS-DA istatistikî değerleri

Sınıflar	Sınıf 1	Sınıf 2	Sınıf 3
RMSEC	0.193	0.266	0.157
RMSECV	0.290	0.436	0.278
CV Bias	0.049	0.023	-0.053
Hassasiyet	0.900	0.889	1.000
Spesifisite	1.000	1.000	1.000

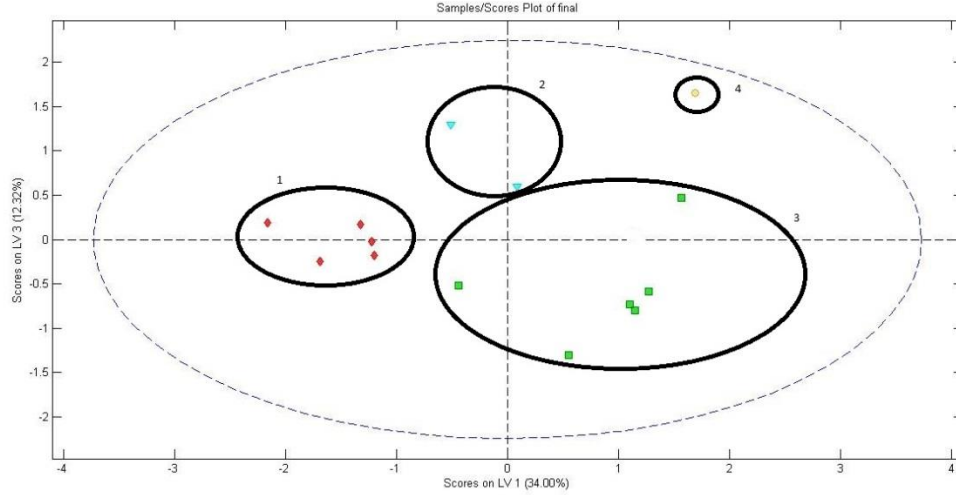
Sınıf 1 : Salbutamol, Salmaterol, Fomaterol, Ritodrin, Terbutalin

Sınıf 2: Valsartan, Telmisartan, Olmesartan, Irbesartan, Losartan, Kandesartan

Sınıf 3 : Kaptopril, Enalapril

Tablo 4.13. PLS-DA regresyon modeli bileşenleri

	X-Blok		Y-Blok	
	Yüzde	Toplam	Yüzde	Toplam
1	34.00	34.00	24.76	24.76
2	28.83	62.83	16.77	41.53
3	12.32	75.15	19.36	60.89



Şekil 4.5. Kısmi Bileşen analizi PLS-DA skor grafiği

Uygulanan PLS-DA yönteminde SIMPLS algoritması kullanıldı. Faktör 3 olarak alındı ve her bir kümeye ait RMSEC, RMSECV, Hassasiyet ve Bias değerleri Tablo 4.14’de verildi.

Tablo 4.14. Yöntem korelasyon matrisi

Yöntemler	CUPRAC	ABTS	FRAP	Lipid Peroksidasyonu	Asetil Kolinesteraz
CUPRAC	1	0.679	0.732	0.000	-0.398
ABTS	0.679	1	0.642	0.097	-0.200
FRAP	0.732	0.642	1	-0.163	-0.236
Lipid	0.000	0.097	-0.163	1	-0.204
Kolin	-0.398	-0.200	-0.236	-0.204	1

Kırmızı ile gösterilen β agonistleri net bir şekilde diğer ilaç gruplarından ayrıldı. Böylece in-vitro antioksidan yöntemleri ve lipid peroksidasyonu gibi yöntemlere bakılarak ilaç etkin maddelerinin profilleri çıkartılabilir ve hangi gruba ait oldukları, olabilecekleri ya da yeni sentezlenen bir ilaç etkin maddesinin hangi gruplara yakın kimyasal ve terapötik etki gösterebileceğine dair fikir edinilmiş olur. Anılan yöntemle yeni sentezlenen etkin maddelerin gücü basit, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz yöntemlerle test edilerek literatürde yer alan terapötik etkisi kanıtlanmış ilaçlarla karşılaştırılabilir ve

yeni sentezlenen etkin madde hakkında fikir edinilmiş olur. Ayrıca biyolojik aktiviteleri incelenmeden önce PLS-DA ve Hiyerarşık Küme Analizi ile hayvan deneylerine gerek kalmadan sentezlenen bileşikler n teste tabi tutulur. Bu sayede hayvan, iş gücü, zaman ve madde kaybı en aza indirilir. Her bir madde için alınması gereken yasal izin ve diğer prosedürler azaltılır.



5. TARTIŞMA

Antioksidanlar hücreleri serbest radikal olarak da bilinen stabil olmayan moleküllerin zararlarından koruyan bileşiklerdir. Yükseltgenecek bileşiğe kıyasla çok düşük derişimde olup oksidasyonu anlamlı derecede erteleyen bileşiklere antioksidan denir. Normalde bir bileşğin antioksidan olarak tanımlanabilmesi için 100/1 derişimde olması gerekmektedir. Antioksidan aktivite antioksidan türüyle serbest radikalın yaptığı tepkimeyle ilgilidir. Antioksidan kapasite ise antioksidan bileşiklerden oluşan bir karışımın radikalle yaptığı tepkime olarak tanımlanır. Antioksidan aktivite tek bir antioksidan molekülünün serbest radikalle yaptığı tepkime hızını belirtirken antioksidan kapasite ise süpürülen serbest radikal miktarına göre hesaplama yapar.³ Antioksidanlar, serbest radikalleri stabilize eder ve olası zararlarını ortadan kaldırır.

Son yıllarda, kontrol edilemeyen oksidatif stresi engellemeye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar ateroskleroz, karsinogenez, nörodejeneratif rahatsızlıklar, kronik enflamasyon hastalıkları, radyasyon hasarı, yaşlanma, ve diğer patobiyolojik hastalıkların başlangıcında ve gelişme evrelerinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur.⁴⁻⁹

Yapılan ölçümlerde CUPRAC, FRAP ABTS in-vitro antioksidan aktivite yöntemleri ile lipid peroksidasyon ve anti-asetilkolinesteraz aktivite ölçümleri farklı gruplardaki 15 ilaç etkin maddesi için araştırıldı ve ölçüm sonuçlarına göre kemometrik olarak değerlendirildi. Yapılan çalışmada CUPRAC ölçümlerine göre antioksidan aktivite değerleri sıralandığında ilaç etkin maddelerinin CUPRAC yöntemine verdiği cevaplara göre sıralaması fomoterol > olmesartan > terbutalin > salmaterol > ritodrin > valsartan > irbesartan > salbutamol > enalapril > losartan > telmisartan > kaptopril > candesartan > amlodipin > ebselen sıralaması ortaya çıkmaktadır.

FRAP ölçümüne göre anılan ilaçların aktivite sıralaması ebselen > fomoterol > candesartan > ritodrin > terbutalin > olmesartan > amlodipin > valsartan > irbesartan > telmisartan > losartan > enalapril > salmaterol > kaptopril > salbutamol şeklindedir.

ABTS giderme aktivitesine göre yapılan sıralamada ise terbutalin > salbutamol > ritodrin > fomoterol > salmaterol > enalapril > kaptopril > amlodipin > irbesartan > ebselen > losartan > candesartan > telmisartan > olmesartan > valsartan şeklindedir. Antioksidan aktivite ile ilgili yapılan çalışmalarda her üç yöntem arasında büyük bir paralellik söz konusudur. Yapılan sıralamada β agonistleri genel olarak ön sıralarda yer almıştır. Bunun sebebi ise yapılarındaki fenolik fonksiyonel gruplardır. Bu grupta yer alan ilaçlar diğer ilaçlardan farklı olarak yapılarında aromatik bir fenil halkası ve bu halkaya bağlı hidroksil gruplarına sahip olmalarıdır. Bu özelliğe sahip olan bir çok bileşik in-vitro antioksidan ölçümlerinde yüksek oranda pozitif yanıt verdiler. Bu özelliklerinden dolayı yaptığımız kemometrik sınıflandırmalarda da bahsi geçen ilaçlar bir arada kümelendi ve diğer ilaçlardan ayrıldı. Sartan grubu içerisinde en yüksek antioksidan kapasite olmesartan etkin maddesi için saptandı ve bu molekül içerisindeki hidroksil gruplarının diğer sartan grubu etkin maddelerine görece çokluğu teorik bilgilerle ölçümlerin paralellik gösterdiği kanıtlandı.

Yöntemler arasında yapılan korelasyon matrisi analizine göre en büyük korelasyon FRAP ve CUPRAC yöntemleri arasında ve 0.732 değeriyle saptandı. İkinci en büyük ilişki ise CUPRAC ve ABTS yöntemleri arasında tespit edildi.

Lipid peroksidasyon ölçümlerinde ise sıralama enalapril> kaptopril> salmaterol> olmesartan> terbutalin> irbesartan> amlodipin> fomoterol> salbutamol> ritodrin> candesartan> telmisartan> losartan > ebselen > valsartan şeklinde oluşturuldu. Enalapril ve kaptopril etkin maddeleri en yüksek sonuçları verdi. Literatürde de enalapril ve kaptopril etkin maddelerinin lipid peroksidasyona sebep olduğu ile ilgili bir çok çalışma

mevcuttur.¹⁰³⁻¹⁰⁸ Bu yönüyle de çalışmamız literatürde var olan ölçümlerle örtüşmektedir. Kaptopril ve enalaprilin yüksek lipid peroksidasyonu ve görece düşük antioksidan etkinliği bu iki ilaç etkin maddesinin kemometrik analizlerde aynı grup içerisinde değerlendirilmesini ve kümelenmesini sağladı. Şekil 4.4'te verilen Hiyerarşik küme analizi dendogramında da mavi ile işaretli gösterilen kaptopril ve enalapril etkin maddeleri aynı sınıf içerisinde yer aldı ve Şekil 4.5'teki Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analiz skor diagramındaki haliyle kümelendi.

Antiasetikolinesteraz aktivite ile ilgili yapılan ölçümlerde ise ilaçların aktivite sıralaması irbesartan> ebselen> candesartan> enalapril> ritodrin > losartan> salmaterol > amlodipin > telmisartan> fomoterol > valsartan > terbutalin > salbutamol > olmesartan > kaptopril şeklinde gösterilmiştir. Ebselen etkin maddesi en fazla antikolinesteraz aktivite gösteren ikinci ilaç olarak saptandı. Ebselen etkin maddesinin anti kolinesteraz aktivitesi ile ilgili yapılan yayınlarda ve yaptığımız çalışmada da belirtildiği üzere selenyum bileşiği olan ebselen yüksek antikolinesteraz aktiviteye sahiptir. Selenyumlu bileşiklerin önemli bir bölümü literatürde de bahsedildiği üzere anti-kolinesteraz aktivite göstermektedir.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Ebselen bu yönüyle ayrı bir sınıfta yer almış ve sınıflandırmamızda diğer gruplardan ayrılarak ordinat düzleminin 1. Bölgesinde (+2, +2) koordinatlarında konumlandı.

Bu çalışma ile in-vitro antioksidan yöntemleri, asetilkolinesteraz aktivite ve lipid peroksidasyonu gibi yöntemlere bakılarak ilaç etkin maddelerinin profilleri çıkartılabilir ve hangi gruba ait oldukları, olabilecekleri ya da yeni sentezlenen bir ilaç etkin maddesinin hangi gruplara yakın kimyasal ve terapötik etki gösterebileceğine dair fikir edinilmiş oldu. Anılan yöntemle yeni sentezlenen etkin maddelerin gücü basit, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz yöntemlerle test edilerek literatürde yer alan terapötik etkisi kanıtlanmış ilaçlarla karşılaştırılabilir ve yeni sentezlenen etkin madde hakkında fikir

edinilebilir. Ayrıca biyolojik aktiviteleri incelenmeden önce PLS-DA ve Hiyerarşik Küme Analizi ile hayvan deneylerine gerek kalmadan sentezlenen bileşikler ön teste tabi tutulur. Bu sayede hayvan, iş gücü, zaman ve madde kaybı en aza indirilir. Her bir madde için alınması gereken yasal izin ve diğer prosedürler azaltılır.

Ayrıca ilaçların antioksidan, lipid peroksidasyon etkinliği gibi birçok farklı parametresinin değerlendirilmesi akılcı ve bilinçli ilaç kullanımının önünü açacaktır. Bu sayede hastaların fenotip özelliklerine hastalık geçmişlerine, yaş, cinsiyet gibi özelliklerine bakılarak hasta için aynı ilaç grubundaki etkin maddeler içerisinde hangisinin en uygun olduğu, hangi etkin maddenin ikincil etkilerinin hastanın fenotip özelliklerine göre verileceğine dair literature bilgilerin verilmesi, klinik kullanımda hastaların yaşam kalitesinin geliştirilmesine daha az ilaç kullanmasına ve ikincil faydaları dolayısıyla diğer rahatsızlıklarında anlamlı iyileşmelere de olanak tanıyabilecektir.

Literatürde birçok ilaç ilk keşfedildiği dönemde kullanıldığı hastalık grubundan farklı bölgelerdeki rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin sildenafil sitrat kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmasına rağmen daha sonra erektil disfonksiyona sahip hastalarda kullanılmaya başlanmıştır.¹¹² İlaçların bu değişkenli kimyasal yapısı ve vücut uyumları sebebiyle çok farklı parametrelerinin değerlendirilmesi hastalıkların tedavisinde yeni ufuklara yelken açılmasını sağlayabilecek ve bu sayede birçok hastalığın tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi sağlanabilecektir. Bu yönüyle kemometrik sınıflandırma benzer aktivite gösteren ilaçların saptanması, bu yönde bir indeks oluşturulması ve bu sayede benzer etki gösteren ilaç etkin maddelerinin farklı hastalıkların tedavisinde denenebilmesi için bir fikir sunulmasını sağlamaktadır. Ayrıca terapötik etkisi gözlenen bir fonksiyonel grubun farklı türevlerinin aktivitelerinin ölçülmesi ve bu aktivitelere göre oluşturulacak indeks ile hali hazırda var olan o gruptaki ilaçlarla karşılaştırılması in-vitro aktivite deneylerine

geçilmeden bir çok türev ile ilgili fikir verebilecek ve bu sayede ilaç geliştirme teknolojisini hızlandırıp, araştırma-geliştirme çalışmalarının maliyetlerini düşürebileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada farklı özellikteki bir grup ilacın antioksidan, antikolinesteraz ve lipid peroksidasyon değerleri belirlendi ve bu özelliklere bakılarak bu ilaçlar içerisinde bir sınıflandırılma ve indeks oluşturulması kemometrik olarak gerçekleştirildi. Çalışma sayesinde ilaç etkin maddelerinin primer terapötik hedeflerinden farklı özelliklerinin de olabileceği, aynı grup içerisindeki ilaçların antioksidan, antikolinesteraz ve lipid peroksidasyon özellikleri açısından farklılık gösterebileceği ve bu sebeple reçete ilaç alımında bilinçli olarak bazı ilaçlara daha fazla önem gösterilebileceği, bu sekonder terapötik etkilerine göre ilaçların karakteristik özellikler gösterebileceği ve bu karakteristik özellikler yüzünden farklı gruptaki ilaçların kemometrik yöntemlerle birbirlerinden ayrılabilmesi sonucuna ulaşıldı. Yapılan bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulguların farklı ilaç antioksidan çalışmalarına, yeni ilaç tasarımı ve ilaç indeks çalışmaları gibi geniş çaplı araştırmalara da yol gösterici olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Jones DP, Radi R. Redox Pioneer: Professor Helmut Sies. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21: 2459-2468.
2. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention - Systematic review and meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2007, 297: 842-857.
3. Litescu SC, Eremia S, Radu GL. Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. İçinde:Giardi MT, Rea G, Berra B (editörler). *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, 2010: 241-249.
4. Beck MA, Levander OA. Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection. *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18: 93-116.
5. Frei B. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins - Mechanisms Of Action. *American Journal of Medicine*, 1994, 97: S5-S13.
6. Iuliano L, Pratico D, Ferro D, Basili S, FitzGerald GA, Violi F. Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. *Thrombosis Research*, 1998, 91: S130-S131.
7. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: Disease mechanisms and metabolic regulation. *Journal of Nutrition*, 1997, 127: S962-S965.
8. Beck MA. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71: 1676S-1679S.
9. Treitinger A, Spada C, Verdi JC, Miranda AFB, Oliveira OV, Silveira MVS, Moriel P, Abdalla DSP. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *European Journal of Clinical Investigation*, 2000, 30: 454-459.

10. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing - Cause, consequence, and criteria. İçinde:Henderson D, Salvi RJ, Quaranta A, McFadden SL, Burkard RF (editörler). *Ototoxicity: Basic Science and Clinical Applications*, 1999: 19-40.
11. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 2000, 108: 652-659.
12. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, 8: 829-838.
13. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization Of Free-Radical Generation By Xanthine-Oxidase - Evidence For Hydroxyl Radical Generation. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 9880-9884.
14. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39: 44-84.
15. Luscher TF, Wenzel RR, Noll G. Local-Regulation of the Coronary Circulation In Health And Disease - Role Of Nitric-Oxide And Endothelin. *European Heart Journal*, 1995, 16: 51-58.
16. Prasad P. The role of nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 2004, 127: 1014-1014.
17. Trochu JN, Bouhour JB, Kaley G, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism - Implications in health and disease. *Circulation Research*, 2000, 87: 1108-1117.
18. Stamler JS. Redox Signaling - Nitrosylation And Related Target Interactions Of Nitric-Oxide. *Cell*, 1994, 78: 931-936.
19. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*, 2000, 28: N37-N52.

20. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, A Cloaked Oxidant Formed By Nitric-Oxide And Superoxide. *Chemical Research in Toxicology*, 1992, 5: 834-842.
21. Babior BM, Woodman RC. Chronic granulomatous-disease. *Seminars in Hematology*, 1990, 27: 247-259.
22. Bauer V, Bauer F. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury. *General Physiology and Biophysics*, 1999, 18: 7-14.
23. Dawson VL, Dawson TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation*, 1996, 3: 71-78.
24. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281: 1309-1312.
25. Fridovich I. Superoxide Dismutases: Anti-Versus Pro- Oxidants? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11: 175-177.
26. Kahl R, Kampkotter A, Watjen W, Chovolou Y. Antioxidant enzymes and apoptosis. *Drug Metabolism Reviews*, 2004, 36: 747-762.
27. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18: 567-579.
28. Sies H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289: 8735-8741.
29. Hameed A, Sharma I, Kumar A, Azooz MM, Ahmad Lone H, Ahmad P. Chapter 6 - Glutathione Metabolism in Plants under Environmental Stress. İçinde: Ahmad P (editör). *Oxidative Damage to Plants*, San Diego, Academic Press, 2014: 183-200.
30. Shi H, Noguchi N, Niki E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27: 334-346.

31. Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 19095-19098.
32. Niki E. Action of Antioxidants Against Oxidative Stress. İçinde:Dizdaroglu M, Karakaya A (editörler). *Advances in DNA Damage and Repair*, Springer US, 1999: 313-318.
33. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, 1998, 97: 2222-2229.
34. Hodis HN, Mack WJ, Labree L, Cashinhemphill L, Sevanian A, Johnson R, Azen SP. Serial Coronary Angiographic Evidence That Antioxidant Vitamin Intake Reduces Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 1995, 273: 1849-1854.
35. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 1996, 347: 781-786.
36. Evans RW, Shaten BJ, Day BW, Kuller LH, Grp MR. Prospective association between lipid soluble antioxidants and coronary heart disease in men - The Multiple Risk Factor Intervention Trial. *American Journal of Epidemiology*, 1998, 147: 180-186.
37. Vita JA, Keaney JF, Raby KE, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S, Koulouris SN, Hankin BR, Frei B. Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 1998, 31: 980-986.

38. Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 2002, 2: 121-125.
39. van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Skepper JN, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF. Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation*, 2002, 105: 1635-1638.
40. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, 1996, 149: 21-28.
41. Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 1996, 382: 120-121.
42. Cohen G. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. İçinde: Chiueh CC (editör). *Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology: A Festschrift in Honor of Daniel L Gilbert*, 2000: 112-120.
43. Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clinica Chimica Acta*, 2000, 296: 203-212.
44. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis And Increased Generation Of Reactive Oxygen Species In Down's-Syndrome Neurons In-Vitro. *Nature*, 1995, 378: 776-779.
45. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 2009, 7: 65-74.
46. Gardes-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic? *Actualite Chimique*, 2003: 91-96.
47. Santamaria L, Bianchisantamaria A. Free-Radicals As Carcinogens And Their Quenchers As Anticarcinogens. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*, 1991, 8: 121-140.

48. Chang DK, Goel A, Ricciardiello L, Lee DH, Chang CL, Carethers JM, Boland CR. Effect of H₂O₂ on cell cycle and survival in DNA mismatch repair-deficient and -proficient cell lines. *Cancer Letters*, 2003, 195: 243-251.
49. Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunology Today*, 2000, 21: 78-82.
50. Kumar DA, Manikandan P, Sumitra M, Raju K, Gayathri C, Arutselvan N, Puvanakrishnan R. A novel peptide derivative exhibits antiinflammatory and antioxidant activity in adjuvant induced arthritis in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 229: 9-17.
51. Shrinet J, Nandal UK, Adak T, Bhatnagar RK, Sunil S. Inference of the Oxidative Stress Network in *Anopheles stephensi* upon *Plasmodium* Infection. *Plos One*, 2014, 9.
52. Niki E. Oxidative stress and aging. *Internal Medicine*, 2000, 39: 324-326.
53. Li T, Meng QH, Zou ZQ, Fan YC, Long B, Guo YM, Hou W, Zhao J, Li J, Yu HW, Zhu YK, Wang K. Correlation between promoter methylation of glutathione-S-transferase P1 and oxidative stress in acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Journal of Viral Hepatitis*, 2011, 18: E226-E231.
54. Gutteridge JMC, Halliwell B. Comments On Review Of Free-Radicals In Biology And Medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, 12: 93-95.
55. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen Free-Radicals And Iron In Relation To Biology And Medicine - Some Problems And Concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 246: 501-514.
56. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127: 183-198.

57. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation Of Lipid-Peroxidation In Biological-Systems. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1987, 25: 317-364.
58. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11: 315-335.
59. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 7970-7981.
60. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Celik SE. A novel total antioxidant capacity measurement for food and plasma antioxidants: CUPRAC method. *Febs Journal*, 2006, 273: 72-72.
61. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Altun M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, 2005, 39: 949-961.
62. Sozgen K, Cekic SD, Tutem E, Apak R. Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium. *Talanta*, 2006, 68: 1601-1609.
63. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Celik SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 2008, 160: 413-419.
64. Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 4290-4302.
65. Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 1841-1856.

66. Prior RL, Cao GH. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27: 1173-1181.
67. Ou BX, Huang DJ, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 3122-3128.
68. Miller NJ, Riceevans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel Method For Measuring Antioxidant Capacity And Its Application To Monitoring The Antioxidant Status In Premature Neonates. *Clinical Science*, 1993, 84: 407-412.
69. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11: 419-421.
70. Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 1151-1157.
71. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76: 270-276.
72. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 3597-3604.

73. Kuselman I. Applications of metrology, chemometrics and quality assurance in analytical chemistry. *Reviews in Analytical Chemistry*, 2000, 19: 217-233.
74. Wold S, Sjostrom M. Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, 44: 3-14.
75. Martens H, Næs T. Multivariate Calibration. İçinde:Kowalski B (editör). *Chemometrics*, Springer Netherlands, 1984: 147-156.
76. Naes T, Martens H. Comparison of prediction methods for multicollinear data. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 1985, 14: 545-576.
77. Blumenthal EZ, Mimouni D. Book Review. *New England Journal of Medicine*, 1997, 337: 433-434.
78. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 1965, 24: 163-169.
79. Smith CG, Vane JR. The discovery of captopril. *FASEB J*, 2003, 17: 788-789.
80. Migdalof BH, Antonaccio MJ, McKinstry DN, Singhvi SM, Lan SJ, Egli P, Kripalani KJ. Captopril: pharmacology, metabolism and disposition. *Drug Metab Rev*, 1984, 15: 841-869.
81. Davies RO, Gomez HJ, Irvin JD, Walker JF. An overview of the clinical pharmacology of enalapril. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1984, 18: 215S-229S.
82. Front Matter. İçinde:Santos TUMSASd (editör). *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS)*, Boston, Academic Press, 2015: i-ii.
83. Morsing P. Candesartan: a new-generation angiotensin II AT1 receptor blocker: pharmacology, antihypertensive efficacy, renal function, and renoprotection. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10 Suppl 11: S248-254.

84. de la Sierra A, Ram CV. Introduction: The pharmacological profile of eprosartan-- implications for cerebrovascular and cardiovascular risk reduction. *Curr Med Res Opin*, 2007, 23 Suppl 5: S1-3.
85. Johnston CI. Pharmacology of irbesartan. *Expert Opin Investig Drugs*, 1999, 8: 655-670.
86. Goa KL, Wagstaff AJ. Losartan potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs*, 1996, 51: 820-845.
87. Siegl PK, Kivlighn SD, Broten TP. Pharmacology of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in animal models of hypertension. *J Hypertens Suppl*, 1995, 13: S15-21.
88. Koike H, Sada T, Mizuno M. In vitro and in vivo pharmacology of olmesartan medoxomil, an angiotensin II type AT1 receptor antagonist. *J Hypertens Suppl*, 2001, 19: S3-14.
89. Sada T, Mizuno M. [Pharmacological profiles and clinical effects of olmesartan medoxomil, a novel angiotensin II receptor blocker]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2004, 124: 257-269.
90. Keefe DL. Clinical pharmacology of telmisartan. *J Clin Pharmacol*, 2000, 40: 1311.
91. Sharpe M, Jarvis B, Goa KL. Telmisartan: a review of its use in hypertension. *Drugs*, 2001, 61: 1501-1529.
92. Chiolerio A, Burnier M. Pharmacology of valsartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998, 7: 1915-1925.
93. Markham A, Goa KL. Valsartan. A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension. *Drugs*, 1997, 54: 299-311.

94. Cazzola M, Page CP, Calzetta L, Matera MG. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 450-504.
95. Johnson M, Butchers PR, Coleman RA, Nials AT, Strong P, Sumner MJ, Vardey CJ, Whelan CJ. The pharmacology of salmeterol. *Life Sci*, 1993, 52: 2131-2143.
96. Mangrella M, Torella M, Russo F, Rossi F, Piucci B, Cantoni V. [Pharmacology of ritodrine]. *Minerva Ginecol*, 1999, 51: 233-244.
97. Sokmen AS, Munevver; Daferera, Dimitra; Polissiou, Moschos; Candan, Ferda; Unlu, Mehmet; Akpulat, H. Askin. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Phytotherapy Research* 2004, 18(6): 451-456.
98. Schewe T. Molecular actions of Ebselen—an antiinflammatory antioxidant. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1995, 26: 1153-1169.
99. Gündüz T. *Instrumental analiz*. Baskı. Ankara, Gazi Kitabevi, 2002.
100. Douglas AS HF, Timothy AN. *Principles of instrumental analysis*. Baskı. Philadelphia, Saunders College, 1998.
101. Skoog DA, West DM. *Principles of instrumental analysis*. Baskı. Saunders College Philadelphia, 1980.
102. Wiberg K. *Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions*. 2004.
103. Golik A, Weissgarten J, Evans S, Cohen N, Zaidenstein R, Modai D, Cotariu D. Changes In Red-Blood-Cell Glutathione And Glutathione-Dependent Enzymes On Long-Term Treatment With Captopril And Enalapril. *Clinica Chimica Acta*, 1995, 240: 89-94.
104. deCavanagh EMV, Fraga CG, Ferder L, Inserra F. Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 1997, 272: R514-R518.

105. De Cavanagh EMV, Inserra F, Ferder L, Fraga CG. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 278:R572-R577.
106. Liu YH, Liu LY, Wu JX, Chen SX, Sun YX. Comparison of captopril and enalapril to study the role of the sulfhydryl-group in improvement of endothelial dysfunction with ACE inhibitors in high dieted methionine mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2006, 47: 82-88.
107. Ghazi-Khansari M, Mohammadi-Karakani A, Sotoudeh M, Mokhtary P, Pour-Esmaeil E, Maghsoud S. Antifibrotic effect of captopril and enalapril on paraquat-induced lung fibrosis in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 2007, 27: 342-349.
108. Karimian G, Mohammadi-Karakani A, Sotoudeh M, Ghazi-Khansari M, Ghobadi G, Shakiba B. Attenuation of hepatic fibrosis through captopril and enalapril in the livers of bile duct ligated rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008, 62: 312-316.
109. Luo ZH, Sheng JF, Sun Y, Lu CJ, Yan J, Liu AQ, Luo HB, Huang L, Li XS. Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56: 9089-9099.
110. Mao F, Chen JW, Zhou Q, Luo ZH, Huang L, Li XS. Novel tacrine-ebselen hybrids with improved cholinesterase inhibitory, hydrogen peroxide and peroxynitrite scavenging activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23: 6737-6742.
111. Luo ZH, Liang L, Sheng JF, Pang YQ, Li JH, Huang L, Li XS. Synthesis and biological evaluation of a new series of ebselen derivatives as glutathione

peroxidase (GPx) mimics and cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease.

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014, 22: 1355-1361.

112. Ethans KD, Casey AR, Schryvers OI, MacNeil BJ. The effects of sildenafil on the cardiovascular response in men with spinal cord injury at or above the sixth thoracic level. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 2003, 26: 222-226.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Onur ŞENOL
Doğum tarihi: 06.05.1983
Doğum yeri: Erzurum
Medeni hali: Evli
Uyruğu: T.C.
Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Tel: 05309324224
Faks: 04422315201
E-mail: onursenol@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya AD
Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya AD
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce (ÜDS 80)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Kimyagerler Derneği, Kemometri Derneği
İlgi Alanları ve Hobiler
Satranç Futbol

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/645
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

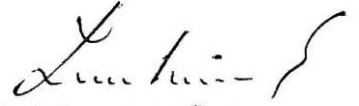
23/07/2013

Sayın: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

İlgi:22.07.2013 tarih ve 628 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 23.07.2013 tarihinde almış olduğu 07' nolu karar ile "Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Antioksidan Aktivite Kapasitelerinin Çeşitli Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kemometrik hesaplamalarla Sınıflandırılması" başlıklı, doktora öğrenciniz Arş. Gör. Onur ŞENOL ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

Toplantı Tarihi: 23.07.2013
Toplantı Sayısı: 2

Karar No: 07

Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Antioksidan Aktivite Kapasitelerinin Çeşitli Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kemometrik hesaplamalarla Sınıflandırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 22.07.2013 tarih ve 628 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.