

**T.C.**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**KİMYA ANABİLİMDALI**

**BAZI BİS -1,2,4- TRİAZOL HALKASI İÇEREN AMİNOMETİL TÜREVLERİNİN**  
**BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Naci Ömer ALAYUNT**

**MART 2015**

**UŞAK**

**T.C.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİMDALI**

**BAZI BİS -1,2,4- TRİAZOL HALKASI İÇEREN AMİNOMETİL TÜREVLERİNİN  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Naci Ömer ALAYUNT**

**UŞAK 2015**

**Naci Ömer Alayunt** tarafından hazırlanan Bazı Bis-1,2,4- Triazole Halkası İçeren Aminometil Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri adlı bu tezin Yüksek Lisans / **Doktora tezi** olarak uygun olduğunu onaylarım.

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) **Prof. Dr. Sait GELİK**

Tez Danışmanı, ..... **Kimya** ..... Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile **Kimya** Anabilim Dalında Yüksek Lisans / **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) ..... **Prof. Dr. Sait GELİK** .....

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) ..... **Prof. Dr. Gürşiz SOYKAN** .....

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) ..... **Prof. Dr. Mustafa KARATEPE** .....

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) ..... **Doç. Dr. Nurullah SANLI** .....

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) ..... **Yrd. Doç. Dr. Yavuz Sunucu KARAFALIOĞLU** .....

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

Tarih: **06.10.2015**

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans / **Doktora** derecesini onamıştır.

.....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

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

Naci Ömer ALAYUNT

# BAZI BİS-1,2,4- TRIAZOL HALKASI İÇEREN AMİNOMETİL TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

(Doktora Tezi)

Naci Ömer ALAYUNT

UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2015

## ÖZET

Değişik uygulama alanlarına sahip olmalarından dolayı beş üyeli heterosiklik bileşiklerin sentezi son yıllarda giderek önem kazanmaya başlamıştır. Günümüzde ilaç olarak kullanılan birçok bileşiğin yapısında özellikle triazol gibi beş üyeli heterosiklik halka yapıları bulunmaktadır.

Bu çalışmada 5 yeni bis 1,2,4-triazol içeren aminometil türevli bileşiklerin *in vitro*, *in vivo* antioksidan özellikleri ve antitümör özellikleri incelendi. *In vitro* olarak indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, Süperoksit radikali giderme aktivitesi, deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki MDA sonuçları değerlendirildi. *In vivo* olarak bileşiklerin deney hayvanlarında doku ve serum düzeylerinde ki vitamin A, E, C ve MDA değerleri üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca bileşiklerin MCF-7 insan göğüs kanseri hücrelerine karşı antitümör özellikleri incelendi.

Sonuç olarak bileşikler askorbik asit, BHT ve  $\alpha$ -tokoferol gibi standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında etkili antioksidan aktivite gösterdi. Bununla beraber, bileşiklerin *in vitro* antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Sonuçlarda kontrol grubu ve bileşikler arasındaki ilişki SPSS programı yardımıyla incelenip değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular ve sonuçlar tartışılmış ve öneriler sunulmuştur.

**Bilim Kodu** :

**Anahtar Kelimeler:** 1,2,4-Triazol, aminometil türevleri, antioksidan, radikal temizleyici, biyolojik aktiviteler

**Sayfa Adedi** : 111

**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Sait ÇELİK

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME BIS-1,2,4-TRIAZOLE CONTAINING  
AMINOMETHYL DERIVATIVES**

**(Phd. Thesis)**

**Naci Ömer ALAYUNT**

**UŞAK UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**March 2015**

**ABSTRACT**

As 5-membered heterocyclic compounds have various applications, their synthesis has become increasingly important in recent years. Today, many compounds used as therapeutic agent contain 5-membered heterocyclic ring such as triazole, thiadiazole and oxidiazole.

In the present study, *in vitro* and *in vivo* anti-oxidant and anti-tumor effects of 5 novel amino methyl compounds which contain bis-1, 2, 4-triazole were examined. Reducing power, metal chelating activity, hydrogen peroxide scavenging activity and superoxide radical scavenging activity, deoxyribose degradation and hydroxyl radical grasping activity and MDA results in *Saccharomyces cerevisiae* cells were assessed *in vitro*. Effects of compounds on tissue and serum vitamin A, E, C levels and MDA values in test animals were assessed *in vivo*. In Addition, anti-tumor effects of compound were investigated in MCF-7 human breast cancer cell line.

As a result, most of the compounds showed efficient antioxidant and antitumour activity when compared to ascorbic acid, BHT and  $\alpha$ -tocopherol as standard antioxidants. In addition, cell viability experiments show that compounds have effective *in vitro* antitumor activity. Correlation between control group and compounds were analyzed by SPSS software. Findings and conclusion were discussed with relevant recommendations.

**Science Code :**

**Key Words** : 1,2,4 - Triazole, aminomethyl derivatives, antioxidant, radical scavenging, biological activities

**Page Number : 111**

**Adviser** : Prof. Dr. Sait ÇELİK

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan, benden her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Sait ÇELİK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Mustafa KARATEPE'ye teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim süresince tez çalışmamı yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan Prof. Dr. Cengiz SOYKAN'a çok teşekkür ederim.

Tezle ilgili deneylerin gerçekleştirilmesi esnasında, bilgi birikimini esirgemeyen, sayın hocam Doç. Dr. Nurallah ŞANLI'ya, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin SUNUCU KARAFAKIOĞLU sayın hocam Prof. Dr. Metin KOPARIR'a, değerli arkadaşım Doç. Dr. Cemal ORHAN'a, sayın hocam Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ'a, sayın hocam Doç. Dr. Süleyman SANDAL'a, Yrd. Doç. Dr. Nevin ÇANKAYA'ya, ayrıca birlikte çalıştığımız, arkadaşım biyolog Akif Evren PARLAK'a, teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince bıkmadan usanmadan her zaman manevi desteklerini yanımda hissettiğim eşim, annem, babam ve tüm aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELERİN LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TRİAZOLLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Triazol Halkası İçeren Bileşikler .....	4
2.2 Triazollerin Kullanım Alanları .....	5
2.3 Azol Grubu Bileşiklerin Etki Mekanizması.....	6
2.4 Mannich Bazları.....	9
<b>3 SERBEST RADİKALLER</b> .....	<b>11</b>
3.1 Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları .....	12
3.2 Serbest Radikal Kaynakları .....	12
3.2.1 Biyolojik kaynaklar .....	13
3.2.2 İntrasellüler Kaynaklar .....	13
3.3 Vücutta Oluşum Şekilleri.....	14
3.4 Serbest Radikallerin Etkileri .....	16
3.4.1 Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkisi.....	16
3.4.2 Serbest Radikallerin Proteinler Üzerindeki Etkileri.....	17
3.4.3 Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerindeki Etkileri .....	17
3.4.4 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	18
3.5 Reaktif Oksijen Türleri (ROT) .....	19
3.5.1 Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot}$ ) .....	21
3.5.2 Hidrojen Peroksit $H_2O_2$ .....	23
3.5.3 Hidroksil Radikali ( $\cdot OH$ ).....	24



3.5.4 Hipoklorik Asit (HClO) .....	26
3.6 Reaktif Nitrojen Türleri (RNS).....	26
3.6.1 Nitrik Oksit (NO <sup>•</sup> ) .....	27
3.7 Reaktif Sülfür Türleri (RSS).....	28
3.8 Reaktif Klorür Türleri (RCS).....	29
<b>4 OKSİDATİF STRES .....</b>	<b>30</b>
4.1 Lipid Peroksidasyonu .....	31
4.1.1 Lipid Peroksidasyon Olayının Belirlenmesi .....	33
4.2 MDA (Malondialdehit) .....	34
<b>5 ANTİOKSİDANLAR .....</b>	<b>35</b>
5.1 Endojen Antioksidanlar .....	36
5.2 Eksojen Antioksidanlar .....	37
5.3 Doğal Antioksidan Kaynakları .....	38
5.4 Yağda ve Suda Çözünen Radikal Tutucular .....	40
5.4.1 C Vitamini (Askorbik Asit).....	40
5.4.2 $\alpha$ - tokoferol.....	40
5.4.3 Karotenoidler.....	41
5.4.4 Flavonoidler .....	42
5.4.5 Glutasyon.....	42
5.4.6 Ürik Asit.....	42
5.4.7 Bilirubin .....	43
5.4.8 Melatonin .....	43
5.4.9 Lipoik Asit.....	44
5.4.10 Sistein .....	44
5.4.11 Sitokrom P-450 .....	45
5.5 Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi .....	46
5.6 Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	47
5.7 Kanser .....	48
5.7.1. Kansere Neden Olan Ajanlar.....	50
<b>6 MATERYAL METOD.....</b>	<b>51</b>
6.1. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler .....	51
6.2. <i>İn vitro</i> Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi .....	52
6.2.1 Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	52

6.2.2 İndirgeme Kuvveti Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	53
6.2.3 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	53
6.2.4 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	53
6.2.5 Metal Şelatlama Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	54
6.2.6 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi.....	54
6.3 <i>İn vitro</i> Analiz Yöntemleri.....	54
6.3.1 İndirgeme Kuvveti.....	54
6.3.2 Metal Şelatlama Aktivitesi.....	55
6.3.3 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi.....	55
6.3.4 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi.....	56
6.3.5 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi.....	57
6.3.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hücrelerindeki Antioksidan Özellikler.....	57
6.4 <i>İn vitro</i> Antitümör Özelliklerin Araştırılması.....	58
6.4.1 MCF-7 Çözdürülmesi, Flaklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi.....	58
6.4.2 Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi.....	59
6.5 <i>İn vivo</i> Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	60
6.5.1 Hayvan Materyali.....	60
6.5.2 Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar.....	61
6.6 Doku Örneklerinde <i>in vivo</i> Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri.....	61
6.6.1 C Vitamini ve MDA Analizi.....	61
6.6.2 A ve E Vitamini Analizi.....	62
6.7 Kan Örneklerinde <i>in vivo</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	62
6.7.1 C Vitamini ve MDA Analizi.....	62
6.7.2 A ve E Vitamini Analizi.....	62
6.8 İstatistiksel Değerlendirme.....	63
<b>7 BULGULAR.....</b>	<b>64</b>
7.1 <i>İn vitro</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	64
7.1.1 İndirgeme Kuvveti.....	64
7.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi.....	66
7.1.3 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi.....	68
7.1.4 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi.....	70
7.1.5 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi.....	72
7.1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hücrelerindeki Antioksidan Özellikler.....	74

7.2 <i>İn vivo</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	75
7.2.1 Karaciğer Dokusundaki A, E, C Vitamini ve MDA Düzeyleri.....	75
7.2.2 Böbrek Dokusunda A, E, C Vitamini ve MDA Düzeyleri.....	76
7.2.3 Kan Örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA Düzeyleri.....	77
7.3 <i>İn vitro</i> Antitümör Özelliklerin Ölçülmesi .....	79
<b>8 TARTIŞMA.....</b>	<b>81</b>
<b>9 SONUÇ .....</b>	<b>93</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>94</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>111</b>

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa No
Çizelge 2.1. Bazı azol grubu ilaçlar ve etki mekanizmaları.....	8
Çizelge 3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	20
Çizelge 3.2. Reaktif azot türleri .....	27
Çizelge 5.1. Endojen antioksidanlar.....	37
Çizelge 5.2 Eksojen Antioksidanlar .....	38
Çizelge 5.3. Karsinogenik ajanlar .....	50
Çizelge 6.1. Bileşiklerin IUPAC adlandırması .....	52
Çizelge 6.2. Deneysel hayvanlarına verilen yemin bileşimi .....	60
Çizelge 7.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların indirgeme kuvveti sonuçları.....	64
Çizelge 7.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzdeleri.....	66
Çizelge 7.3. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme yüzdeleri.....	68
Çizelge 7.4. Test bileşikleri ve standart antioksidanların Süperoksit giderme yüzdeleri.....	70
Çizelge 7.5. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama yüzdeleri .....	72
Çizelge 7.6. Bileşiklerle muamele sonrası <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri.....	74
Çizelge 7.7. Bileşiklerle muamele sonrası karaciğer dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeyleri .....	75
Çizelge 7.8. Bileşiklerle muamele sonrası böbrek dokusundaki A, E, C vitaminleri ve MDA düzeyleri .....	76
Çizelge 7.9. Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA Düzeyleri .....	78
Çizelge 7.10. Bileşiklerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre yüzde oranında canlılık durumları.....	79

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 2.1. Triazol halkası gösterimi .....	3
Şekil 2.2. Kanser tedavisinde kullanılan triazol türevi bileşikler .....	5
Şekil 2.3. P-450 enziminin şematik gösterimi .....	7
Şekil 2.4. P-450 enziminin etki mekanizması.....	7
Şekil 2.5. Azol grubu ilaçların etki mekanizması.....	8
Şekil 3.1. Mitokondride serbest radikal oluşumu .....	14
Şekil.4.1. Oksidatif stresin hücre yapısına etkisi .....	30
Şekil 4.2. Lipid peroksidasyon oluşum mekanizması.....	32
Şekil 5.1. Biyolojik sistemlerde antioksidan ağı.....	36
Şekil 5.2. Kanser oluşumu .....	49
Şekil 6.1. Bileşiklerin oluşum reaksiyonları .....	51
Şekil 7.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların absorban grafikleri. ....	65
Şekil 7.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı absorban grafikleri. ....	65
Şekil 7.3. Bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzde grafiği. ....	67
Şekil 7.4. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri .....	67
Şekil 7.5. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme yüzde grafiği. ....	69
Şekil 7.6. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidrojen peroksit giderme yüzdeleri. ....	69
Şekil 7.7. Test bileşikleri ve standart antioksidanların süperoksit giderme yüzde grafiği.....	71
Şekil 7.8. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı süperoksit giderme yüzdeleri. ....	71
Şekil 7.9. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama grafiği.....	73
Şekil 7.10. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidroksil radikali yakalama yüzdeleri.....	73

Şekil 7.11. Bileşiklerle muamele sonrası <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	74
Şekil 7.12. Bileşiklerle muamele sonrası karaciğer dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri. ....	76
Şekil 7.13. Bileşiklerle muamele sonrası böbrek dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri. ....	77
Şekil 7.14. Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri. ....	78
Şekil 7.15. Maddelerle muamele sonrası MCF-7 hücrelerinin doza göre % oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri.....	80

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>A<sub>0</sub></b>	: Kontrol absorbansı
<b>A<sub>1</sub></b>	: Numune absorbansı
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş hidroksitoluen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>CD</b>	: Konjuge dienler
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>LPO</b>	: Lipid peroksidasyon
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NBT</b>	: Nitroblue tetrazolium
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>OH<sup>•</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>TBA</b>	: Tiyo barbitürikasit
<b>TCA</b>	: Triklor asetik asit
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksi ribonükleik Asit
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Sülfürik Asit
<b>HClO<sub>4</sub></b>	: Perklorik Asit
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
<b>NAS</b>	: N-asetil- sistein
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSGR</b>	: Glutasyon redüktaz

# 1 GİRİŞ

Son yıllarda yeni sentezlenmiş veya bitkilerden ayrıştırılmış maddelerin etkilerini, biyolojik yapısını laboratuvar çalışmaları ile deney hayvanlarında, klinik araştırmalar ile insanlarda inceleyerek ilaç geliştirme çalışmalarına her gün yenileri katılmaktadır. Diğer bir deyişle, biyolojinin bir dalı olan Farmakoloji; ilaçların yapımından kullanıma sunulmasına, ilaçlar ile biyolojik dizgeler arasındaki etkileşimleri incelerken, deneyleri ve canlılar üzerindeki araştırmaları klinik uygulamaya kadar uzanan bu karmaşık ve yoğun süreci özellikle fizyoloji ve biyokimya bilim dalları ile bağlantılı yürütür.

Canlı sistemlerde çok önemli biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri olan fenilpiperazin grubu gibi örneğin, DCPP ve fluprazin moleküllerini içeren analogların sentezlenmesiyle ilgili çalışmalar kaynaklarda yoktur. Dolayısıyla 1,2,4-triazol içeren aminometil türevlerine ilaveten birde piperazin halkası katılması durumunda daha aktif biyolojik önem taşıyan bileşiklerin biyolojik özelliklerini inceleyip literatüre kazandırmayı düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, bir dizi bis-1,2,4-triazollerden sentezlenmiş aminometil türevlerinin biyolojik özelliklerini incelemeyi amaçladık. Ana fonksiyonel gruplar bis-triazol halkası ve aminometil türevleridir. Gerek triazoller gerekse aminometil türevlerinin biyolojik aktif bileşikler olması, 1,2,4-triazoller üzerinden aminometil türevlerinin sentezlenmesi fikrini ortaya atmıştır. Bu yolla elde edilen bileşiklerin de biyolojik aktif olması mümkündür. Özellikle çağımızın hastalığı olan depresyona karşı antidepresan ve antiagresif ilaçlar olarak en aktif kullanılan ilaçlar, fenilpiperazin grubunu içerenlerdir.

Son yıllarda biyolojik aktif etkiye sahip bileşiklerin sayısında önemli derecede artışlar olmasına rağmen bunların büyük bir kısmının kullanımı, uygulama zorluğu, yüksek toksisite riski, ilaç direncinin ortaya çıkması, istenmeyen yan etkilerin gözlenmesi, farmakokinetik eksiklik veya aktivitesindeki yetersizlik nedeniyle sınırlı kalmıştır. Bu durum günümüz bilimini sürekli olarak yeni ajanların geliştirilmesine zorlamaktadır. Günümüzde ilaç olarak kullanılan birçok bileşiğin yapısında özellikle tiyadiazol, triazol ve oksadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka yapıları bulunmaktadır. Bu halkalar heteroatomların konumuna göre çeşitli izomerlere sahiptir. Ancak bu izomerler içerisinde biyolojik olarak en aktif olanlar 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol türevleridir. Değişik uygulama alanlarına sahip olmalarından dolayı beş üyeli heterosiklik



bileşiklerin sentezi son yıllarda giderek önem kazanmaya başlamıştır ki kullanım alanlarının en önemlilerinden biri şüphesiz kemoterapi alanıdır [1-5]. Bu tür beş üyeli halka içeren bileşikler başta antikanser aktivite olmak üzere antibakteriyal, antifungal anti-HIV, antitümör, antiviral, antidepresan, iltihap önleyici (antiinflamatuvar), tüberküloza karşı etkili (antitüberküloz), idrar söktürücü (diüretik), ağrı kesici (analjezik) gibi çok geniş biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler.

Organizmamızın yüksek oranda oksidatif strese maruz kalması sonucunda birçok kardiyovasküler, romatizmal, oto-immün ve nörolojik hastalığın gelişmesinde serbest radikallerin rol oynadığı bilinmektedir [6]. Organizmamız enzimatik ve non-enzimatik birçok kimyasal yardımı ile bu zararlı etkilerden korunmaya çalışır. Ancak günümüz koşullarındaki endüstriyel gelişmeler, şehir hayatı ve çevresel kirlilik faktörleri organizmanın bu koruma silahlarını yetersiz bırakmakta ve birçok durumda dışarıdan takviye antioksidan madde kullanımına gerek görülmektedir [7].

Bu tez çalışmasında bazı bis-1,2,4-triazol türevlerinin yapı üzerindeki yan grupların yerleştirildiği konumlara göre biyolojik etkilerini inceleyip literatüre kazandırmayı amaçladık. Çalışmada kullanılan bis-1,2,4-triazol içeren aminometil türevlerinin, *in vitro* antioksidan aktivite tayinleri, indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki antioksidan özellikleri incelenerek MDA düzeyleri belirlendi.

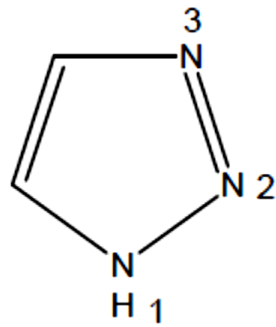
Bis-1,2,4-triazol türevlerinin MCF-7 insan göğüs kanseri hücresinde antitümör özellikleri araştırıldı. Ayrıca ratlara deri altı enjekte edilen bu bileşiklerin, deney sonrası alınan kan ve doku örneklerinde HPLC cihazı ile A, E, C vitaminleri ve MDA analizleri yapılarak *in vivo* antioksidan özellikleri incelendi. Tez çalışmamızın ilaç kimyasına yeni aday bileşiklerin kazandırılması için yol gösterici ön çalışmalar olacağı ve bu disiplindeki akademisyenlere yeni çalışma alanları sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 2 TRİAZOLLER

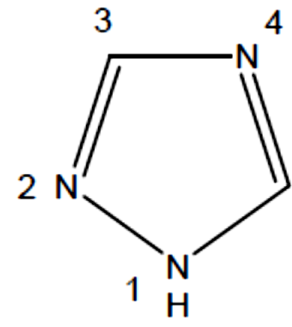
Tamamen sentetik bazlı ajanlar olan azoller 1960'lı yıllarda bulunmuştur. En basit şekliyle beş üyeli azol halkasında 2 ya da 3 azot bulunmasına göre sınıflandırılan azoller, imidazoller veya triazoller olarak ikiye ayrılır[8].

İmidazol kapalı formülü  $C_3H_4N_2$  olarak bilinen organik bir bileşiktir. Aromatik bir diazol olan imidazoller sahip oldukları halka sisteminde 2 adet azot bulunması nedeniyle biyolojik bloklamada görevlidirler. Bununla birlikte, bu bileşikler ayrıca birçok ilaç içeren, antifungal etki ve nitroimidazol moleküllerinde olduğu gibi baz ve zayıf bir asit olarak etki gösterebilirler [9]. Ketokonazol, Mikonazol, Klotrimazol gibi ilaçlar imidazol türevi ilaçlara örnek verilebilir.

Triazoller, ergosterol sentezini engellerler. Bu bileşikler etkilerini, sitokrom P450 bağımlı bir enzim olan lanosterol demetilaz (14-a-sterol demetilaz) enzimini inhibe ederek gösterirler ve ergosterol sentezini engellerler. Yapılan birçok çalışmanın sonucu olarak, çoğu azolün etki yollarının aynı olduğu ancak triazollerin daha yavaş metabolize olmalarından ve özellikle imidazollere göre insan sterol sentezine daha az etki ettiklerinden dolayı daha çok tercih edilirler. Bu nedenle geliştirilmekte olan çoğu azol triazollerdendir [10]. Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol, Vorozole, Letrozole, Anastrozole, Loreclezol triazol türevi ilaçlara örnek verilebilir.



(a) 1,2,3-triazol sistemi



(b) 1,2,4-triazol sistemi

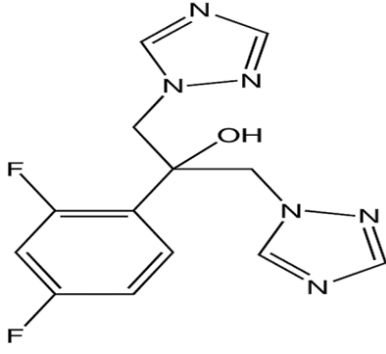
Şekil 2.1. Triazol halkası gösterimi (a,b)

Halka sistemi olarak bakıldığında heterosiklik moleküller doğada yaygın bir şekilde bulunurken, tüm triazoller sentetik kökenlidir ve henüz doğadaki gibi bir triazol halka sistemi saptanamamıştır. Triazol olarak tanımlanan üç azot atomu içeren beş üyeli halka yapısındaki bileşikler ilk defa 1885 de Bladin tarafından isimlendirildi. Bu karbon-azot halka sistemine Bladin triazol ismini verdi. Çekirdeğinin kararlılığı, 1,2,4-triazol bileşiğinin aromatik doğasının bir özelliğidir. Formülü  $C_2H_3N_3$ , mol kütlesi 69,1 g, e.n. 120 °C, benzotriazol, 1,2,3 triazol ve 1,2,4, triazol izomerleri olan, renksiz, iğne kristaller halinde bulunan maddedir (Şekil 2.1). Günümüzde sağlık sektöründe kullanılan 1,2,4-triazol ve türevleri; antimikrobial, antikanser, antibakteriyel ve antifungal gibi biyolojik aktiviteye sahip ayrıca tarım ve sanayide de yaygın şekilde kullanılan önemli bir bileşik sınıfıdır [11].

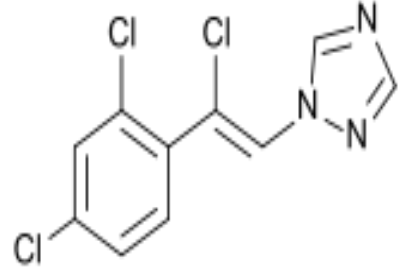
## 2.1 Triazol Halkası İçeren Bileşikler

Triazollerle birlikte son yıllarda oksadiazoller, tiyadiazoller gibi beş üyeli heterosiklik halka içeren bileşikler biyolojik aktivite göstermeleri nedeni ile sıkça sentezlenmekte ve bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Triazol halkaları içeren çeşitli bileşiklerin bazı ilaçların etken maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir (Şekil 2.2). Günümüzde Vorozol, Letrozol, Anastrozol gibi triazol halkası içeren ilaçlar göğüs ve östrojen kaynaklı meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılmakta olan Vorozol ve Anastrozol isimli ilaçlar yapılarında birer triazol halkası içermektedir (Şekil 2.2). Göğüs kanserinin önlenmesinde önemli birçok inhibitörlere sahip oldukları da bilinmektedir [12].

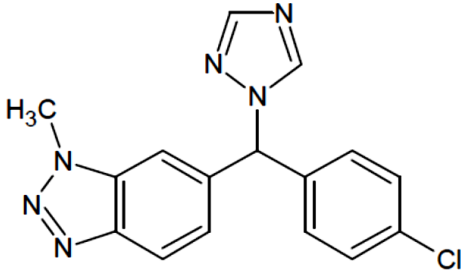
Bileşikteki 1,2,4- triazol bölgeleri, aromatik substitüentlerin üzerindeki triazol aktif bölgesi aromataz ve hem demir ile güçlü bir etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra, 1,2,4 - triazol bileşikleri, farmakolojik olarak antifungal ve antiviral aktivitelere sahiptir. Örnek olarak bu tür bileşiklerin 1,2,4 -triazol artıklarını taşıyan flukonazol gösterilebilir. Yine güçlü bir azol olan N nükleosid ribavirin hem antifungal madde hem de güçlü bir anti-viral olarak bilinmektedir.



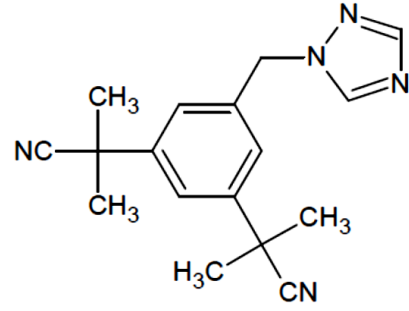
Fluconazole



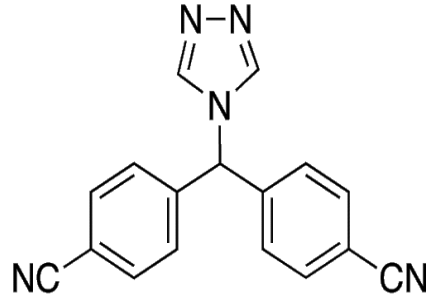
Loreclezol



Vorozol



Anastrazol



Letrozole

Şekil 2.2. Kanser tedavisinde kullanılan triazol türevi bileşikler [12]

## 2.2 Triazollerin Kullanım Alanları

Triazoller heterosiklik bileşiklerin önemli sınıflarından biridir. Günümüzde yapılan birçok çalışmada elde edilen veriler ışığında aminometil türevlerinin, özellikle boya ve

yüzey-aktif reaktifler olarak polimer sektöründe teknolojik uygulamalar bulması bu maddelere büyük bir önem kazandırmıştır. Bunun yanında aminometil türevleri biyolojik potansiyeli olan bileşiklerdir. Son yıllarda yaygın şekilde antitürberküloz [13], anti-enflamatuar [14], antimarialiyal [15], antikanser [16] ve analjezik [17] ilaçlarda kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı aminometil türevlerinin *in vitro* koşullarda kolon kanserine karşı aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [18,19]. Ayrıca piperazin halkası taşıyan 1,2,4-triazol aminometil türevleri protozokidal ve antibakteryel aktivite gösterirler. Çok iyi kardiyovasküler aktivite gösteren Prazosin, lidoflazine [20] ve urapidil [21] gibi modern ilaçların piperazin içerdiği bilinmektedir. Çağımızın en tehlikeli ve yaygın hastalığı olan kansere karşı da kemoterapik çalışmalarda kullanılmasından dolayı son beş yıldır triazoller ve türevlerine ilgi giderek artmıştır.

Ayrıca, triazol türü bileşiklerin bakterisit, pestisit ve fungusitlere karşı koruyucu etkisinin olduğu da yine birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Çoğu triazol bileşiği antimikrobiyal, analjezik (ağrı kesici), enfeksiyon giderici, bölgesel anestezi, antikonvülzan (çarpıntıyı önleyen), antineoplastik, antimarialiyal (sıtmaya karşı kullanılan ilaç), antimantar (mantarları yok eden ilaç) aktivitesi, antiviral reaktif, antidepresif aktivitesi ve antikanser aktivitesi gibi özellikler sergilediği belirtilmiştir [15,16].

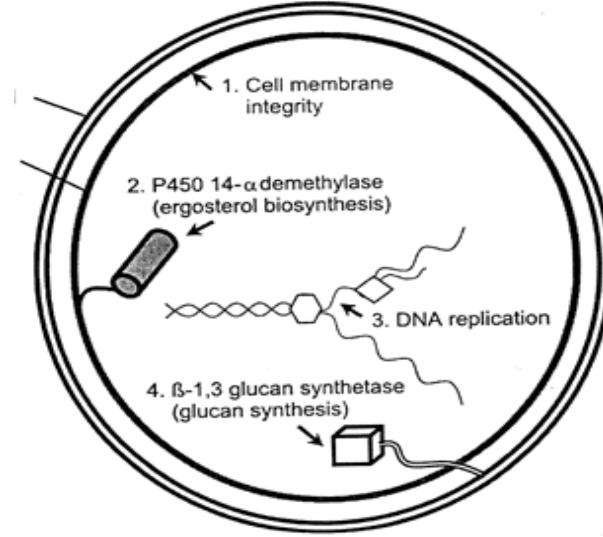
Sentez ve biyolojik etkilerin araştırılması çalışmalarında bis-1,2,4-triazol grubu içeren ve benzil piperazin, metil piperadin, pirolidin, fenil piperazin süstitüentleri içeren aminometil türevlerinin çalışmalarına nadiren rastlanmaktadır.

### **2.3 Azol Grubu Bileşiklerin Etki Mekanizması**

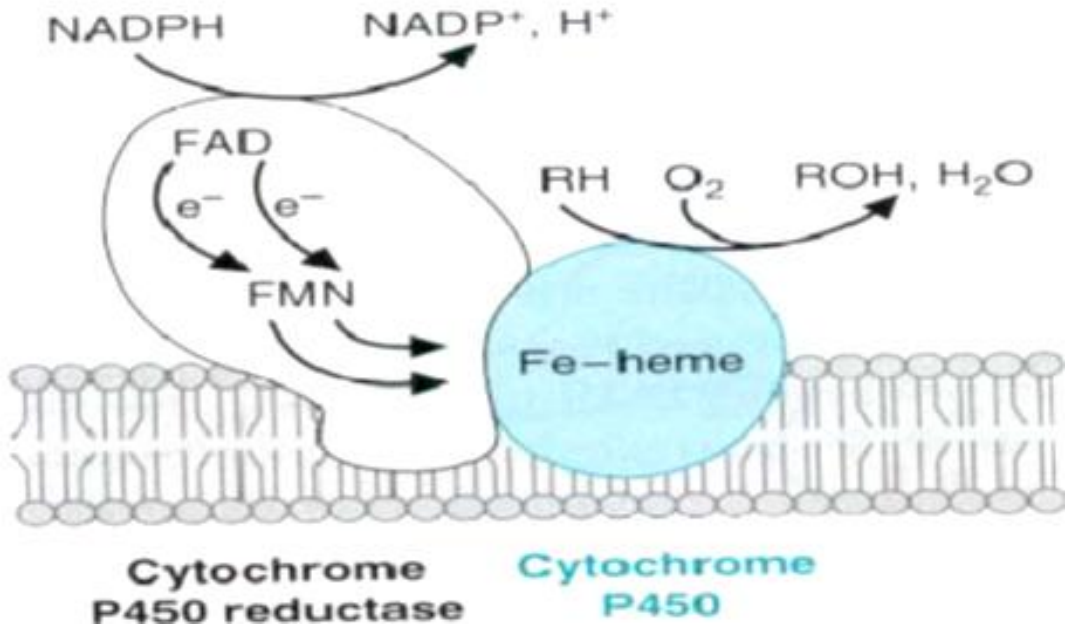
Azol grubu bileşikler plazma membranının ana sterol bileşiği olan ergosterol biosentezini inhibe ederek etkili olurlar. Bu inhibisyon ergosterolün sentezinde iki ara ürün olan 14 alfa-metil sterollerin birikimi şeklinde olur (Şekil 2.3). Burada, 14 alfa-metil sterollerin ergosterole dönüşmesi için gerekli olan demetilasyon basamağı sitokrom p-450'nin aktivasyonuna bağlıdır. Moleküler seviyede mevcut azol bileşiklerindeki nitrojen atomlarının biri (imidazollerde N-3, triazollerde N-4) sitokrom p-450'nin HEM molekülündeki demiri bağlar (Şekil 2.4). Bunun sonucu enzim fonksiyonu ve sitokrom aktivasyonu inhibe olarak demetilasyon basamağı yapılamaz [22-24].

İmidazol bileşiklerinin yüksek konsantrasyonları, sadece sterol sentezinin inhibisyonu ile açıklanamayan hızlı bir fungusidal aktivite gösterirler. Bu etki membran

fosfolipidlerine ilacın primer etkisiyle oluşan membran hasarı şeklinde kendini gösterir. Ayrıca bu bileşikler sitokrom-C oksidatif ve peroksidatif enzimlerini inhibe ederek hücre içinde peroksit üretimini arttırabilirler [25].



Şekil 2.3. P-450 enziminin şematik gösterimi

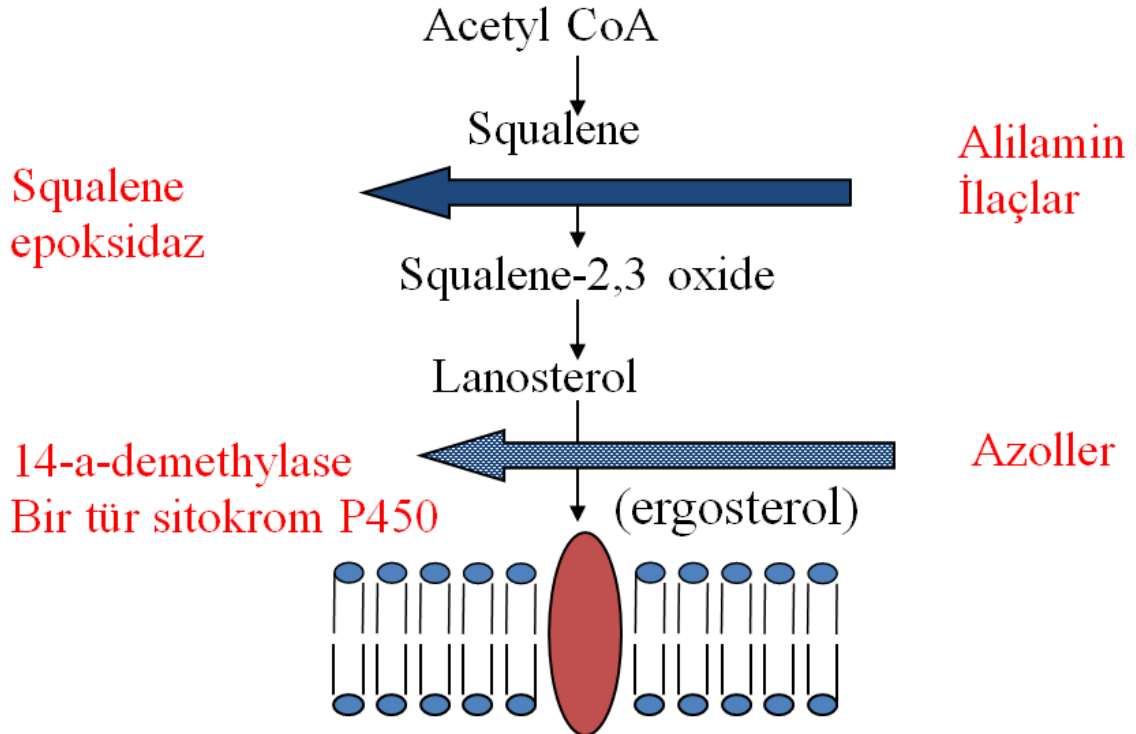


Şekil 2.4. P-450 enziminin etki mekanizması

Çizelge 2.1. Bazı azol grubu ilaçlar ve etki mekanizmaları

Allilamin İlaçlar	Azoller
Terbinafin Naftifin	Ketokonazol Mikonazol Klotrimazol Flukonazol İtrakonazol Vorikonazol

Azoller (Ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol)	Lanosterol 14 $\alpha$ demetilaz inhibisyonu, **24 metilen dihidro lanosterol demetilaz inhibisyonu
---	---



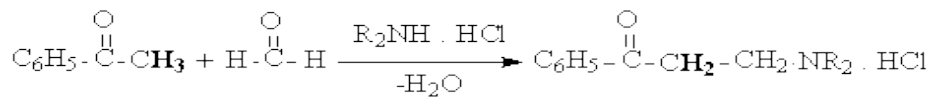
Şekil 2.5. Azol grubu ilaçların etki mekanizması

## 2.4 Mannich Bazları

Genel bir ifadeyle karbonil bileşiklerinin yer aldığı multikomponent reaksiyonların en yaygın ve en bilinenlerinden biri şüphesiz yeni karbon-karbon bağlarının oluşumuna yol açan mannich reaksiyonudur. Azotlu heterosiklik bileşiklerin elde edilmesi için uygun ara ürünler olan  $\beta$ -aminokarbonil bileşiklerinin oluşumuna yol açan yine mannich reaksiyonlardır.

Bu reaksiyonlarda başlangıç karbonil bileşiği, reaksiyonun devamında bir nükleofil olarak hareket eden reaktif ara ürünlere dönüşmektedir. Karbonil bileşenlerinden biri nükleofil olarak hareket ederken diğeri daha yüksek reaksiyon hızıyla amin bileşeni ile reaksiyon vererek bir imin bileşiği oluşturmaktadır. Reaksiyon bileşenlerinden her iki karbonil bileşiğinin de nükleofil olarak davranması durumunda veya her ikisinin de aynı reaksiyon hızıyla imin bileşiğine dönüşmesi durumunda karışık ürünler ortaya çıkacağı bilinmektedir. Bu nedenle, bu reaksiyonlarda reaksiyon bileşenleri olarak enolize olamayan bir karbonil bileşiği, enolize olabilen bir karbonil bileşiği ve bir primer veya sekonder amin kullanılmakta ve aminometillendirilmiş ürünler elde edilmektedir [26-28].

Örneğin; amonyak, primer amin veya sekonder aminin hidroklorürü ile formaldehit ve en az bir aktif hidrojen atomu içeren bileşiklerin kondenzasyonundan meydana gelir. Temel özelliği, reaksiyonda bir aminometil veya sübstitüye aminometil grubu ile aktif hidrojen atomunun yer değiştirmesidir.



Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mannich reaksiyonunun aşağıdaki yöntemlerde anlatılan iki yoldan birinde yürüdüğünü ve genellikle reaktanların doğasıyla ve reaksiyonun yürüyeceği yönü belirleyen reaksiyon koşullarıyla ilişkili karmaşık bir reaksiyon dengesi sonucu olduğu gösterilmiştir.

Reaksiyonda aktif hidrojen taşıyan bileşikler olarak ketonlar, aldehitler, asitler, esterler, fenoller, asetilenler, a-pikolinler, kinaldinler gibi bileşikler kullanılabilir. Amin olarak çeşitli siklik ve asiklik olan primer ve sekonder aminler kullanılmaktadır. Dimetilamin çok reaktiftir ve genellikle çok iyi verimle ürün oluşmasına neden olur.

Mannich reaksiyon ile aktif hidrojen içeren bileşiklerden, doymamış bileşiklerin, pirazolin türevlerinin ve farmakolojik aktiviteleri de olan aminometil sübstitüye



bileşiklerin elde edilmesi mümkündür. Aldehit, keton, ester gibi aktif hidrojen taşıyan bileşikler, formaldehit veya başka bir aldehit, amonyak veya primer, sekonder aminlerle kondenzasyona uğratılırsa, aktif hidrojenin bulunduğu karbondaki bir aminometilasyon gerçekleşir. Böylece aktif hidrojen, aminometil grubuyla yer değiştirir ve mannich bazı olarak bilinen aminometil süstitüye bileşikler elde edilir. Reaksiyonun bir sonraki aşamasında aminometil grubunun eliminasyonu sonucu baştaki bileşiğin doymamışlık içeren bir türevi oluşturulabilir.

Mannich reaksiyonları, farklı fonksiyonel gruplar içeren organik moleküllerin tek basamakta sentezine yol açtığı için ilaç dizaynında da sıklıkla başvurulan bir yöntem haline gelmiştir. Özellikle herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip moleküllerin mannich reaksiyonları kullanılarak aminoalkillendirilmesi yoluyla çeşitli türevlerinin hazırlanması, sentetik organik kimyacılar için oldukça kullanışlı bir yol olarak ilgi görmektedir [29, 30]. Bu reaksiyonlarda, farklı olarak enolize olabilen karbonil bileşeni yerine aktif hidrojen içeren herhangi bir bileşik de kullanılabilir.

Örnek olarak, son zamanlardaki çalışmalarda, aktif hidrojen bileşeni olarak 1,2,4-triazol türevlerini, amin bileşeni olarak da metil piperazin veya morfolin kullanarak antibakteriyel, antiviral, antifungal, antimalaryal ve antikanser aktivitelere sahip çok sayıda mannich bazı sentezlenmiş ve literatüre girmiştir. Ayrıca bu ürünlerin yanısıra birer schiff bazı yapısının varlığı da kaynaklarda yerini almıştır [31-37].

### 3 SERBEST RADİKALLER

Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeği etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her orbitalde birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduyorsa “serbest radikal (SR)” olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler [38, 39]. En basit serbest radikal bir elektron ve bir protonu olan hidrojen atomudur.

Normalde bir molekülün stabilitesini kimyasal olarak bağlanmış iki veya daha fazla elektron içeren moleküllerin elektron düzeni belirler. Bu molekülün yapısında bulunan elektronun eşi yoksa molekül son derece reaktif davranır ve stabil konuma geçmek için bir elektronla çift oluşturma eğilimi gösterir [40]. Günümüzde yapılan araştırmalar alzheimer, parkinson, hungtington gibi nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere, ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar otoimmün hastalıklar ve çeşitli kanser türleri gibi birçok önemli hastalığın oluşumunda serbest radikallerin büyük bir rolü olduğunu göstermektedir [41, 42].

Yaşamak için ihtiyaç duyduğumuz oksijen aynı zamanda serbest radikallerin de kaynağıdır. Bu moleküller ekstra enerjiye sahiptir ve vücutta bu enerjiyi hücrelere boşaltarak onların normal fonksiyonlarını değiştirmektedir. Serbest radikaller, kimyasal olarak en dış elektron yörüngesinde bir elektron kaybetmiş yapılardır. Çeşitli zararlı etkilerinin en önemli nedeni bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmaya çalışmasıdır. Yapılan çalışmalarda serbest radikallerin etki ettikleri dokunun veya molekülün işlevini yerine getirmesine engel oldukları tespit edilmiştir. Etkilenen doku veya molekül biyolojik önemine bağlı olarak önemli veya önemsiz çeşitli rahatsızlıklara neden olabilir. Oksijen, hidrojen ve hidroksil tipinde olan serbest radikaller, almak istedikleri elektronu antioksidanlardan sağarlarsa bir başka yapıya zarar vermelerinin beklenmesi engellenmiş olur.

Bu moleküllerin üzerinde şu ana kadar yapılan bilimsel çalışmalarda serbest radikallerin çeşitli hastalıklara neden olabildikleri belirtilmiştir. Bunlardan en önemlileri; kanser, yaşlanma, kalp krizi, kronik yorgunluk olarak sıralanabilir. Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücresel koşullarda devamlı bir radikal oluşumu vardır. Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel ajanlar

(pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller vücudumuzun normal metabolik faaliyetleri sırasında oluşabilirler (örneğin yemekten sonra). Bunun yanında endüstri atıkları, güneş ışınları, kozmik ışınlar, ozon, özellikle otomobil egzozlarından çıkan gazlar, ağır metaller, virüsler, sigara, alkol, stres, vücutta yağ metabolizması sonucunda oluşan artık ürünler, çeşitli kimyasallar, su ve hava serbest radikalleri oluşturan çevresel faktörlerdir.

### 3.1 Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Moleküllerdeki kovalent bağların homolitik bölünmesi ile molekülde kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her birinin ayrı ayrı atomlar üzerinde kalması ile serbest radikaller oluşabilir [38]. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülde elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin, tokoferol ve askorbik asit gibi hücre sel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur [43]. Radikal özelliği göstermeyen bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür bir indirgenme de radikal oluşumuna yol açabilir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenerek radikal formu olan süperoksiti meydana getirmesi gibi [44].

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. En önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla birlikte; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. Serbest radikal tanımına göre  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [38, 39, 43].

### 3.2 Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir aynı zamanda aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri oluşur [45].

Serbest radikaller ve diğerk reaktif oksijen türleri organizmada özel metabolik olaylar sırasında da üretilirler veya dışardan da alınabilirler.

### 3.2.1 Biyolojik kaynaklar

Olgunlaşmış makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin reaksiyonunu sağlayan ve enfeksiyonlara karşı vücudun hücrese cevapını başlatan hücrelerdir. Fagositik solunumsal patlama sırasında  $H_2O_2$ , süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Hedef ortamdaki fagosite edilmiş mikroorganizma ve bakteriler bu ürünlerin etkisiyle yok edilir. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine de zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar. Radyasyon ve çevresel ajanlar da yine serbest radikal oluşumunu tetikler. Çevresel olarak hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Doxorubicin, adrioxmicine gibi antineoplastik ajanlar da serbest radikal oluşturabilir. Örneğin, antikarsinojen bir ajan olan doxorubicin hücrenin DNA replikasyonunu inhibe eder ve bu sırada  $H_2O_2$  oluşumuna yol açar. Böylece, lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar [46, 47]. Son olarak, sinirsel uyarılar kateşolaminlerin sentezinde artış yaparlar [48]. Kateşolaminlerin oksidasyonu da bir serbest radikal oluşum sebebidir.

### 3.2.2 İntrasellüler Kaynaklar

Bilim camiasının kabullerine göre normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki sızıntıdır. Canlı sistemlerdeki hücreler kullanılan oksijenin büyük bir kısmını (yaklaşık %95) mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri ile dört elektron alarak suya indirger. Bu sistemde olan elektron sızıntısı oksijenin % 1-3'ünü süperoksit radikaline dönüştürebilir. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanabilir.

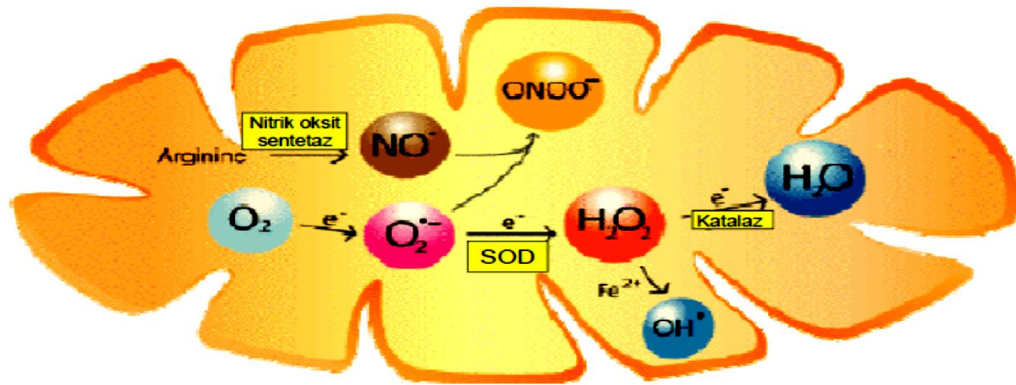
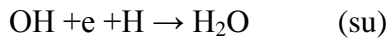
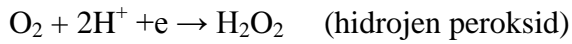
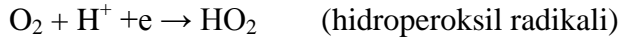
Birçok enzimin (ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz) katalitik döngüsü sırasında  $H_2O_2$  ortaya çıkabilir [48]. Küçük moleküllerin otooksidasyonu ile tiyoller, katekolamin, tetrahidrofolat gibi bazı bileşiklerin

otooksidasyonu süperoksit radikalini üretebilir. Özellikle demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında yer alırlar. Bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizörler olarak iş görürler.

Demir ve bakır özellikle tiyollerden tiyil sentezini,  $H_2O_2$ , süperoksit ve hidroksil radikali sentezini katalizler. Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu plazma membranındaki araşidonik asit serbestleşir ve enzimatik oksidasyonla çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelebilir [43]. Ayrıca toksik maddeler çeşitli etkilerle hücrede serbest radikal üretimini arttırlar. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir, toksin bir serbest radikale metabolize olabilir veya toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebilir.

### 3.3 Vücutta Oluşum Şekilleri

Vücutta oluşumları aerobik metabolizması olan memelilerdeki başlıca serbest radikal kaynağı, oksijenin suya indirgenmesi sırasında yer alan tek elektron aktarmaları sonucunda oluşan reaktif partikülleridir [49].



Şekil 3.1. Mitokondride serbest radikal oluşumu

Bu oluşum reaksiyonları aşağıdaki gibidir (şekil 3.1).

1. Süperoksit radikali; kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak  $H_2O_2$  ve  $O_2$  oluşturur. Protonlanmış şekli olan hidroperoksil radikali ( $HO_2$ ) daha kuvvetli bir oksidandır.  $H_2O_2$  ise zayıf bir oksidoredüktandır. Ortamda transisyon metalleri (Fe, Cu gibi) olmadığında oldukça stabildir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPL) tarafından parçalanır.  $OH^*$  radikali lipid peroksidasyonunu uyaran başlıca radikal olup süperoksit radikalinden veya Fe iyonları etkisi ile  $H_2O_2$ 'den oluşur [50].

2. Aktive nōtrofiller; hipoklorik asit aktive nōtrofillerden üretilen güçlü bir oksidandır. Fagosit sitoplazmasında bulunan ve HEM içeren bir enzim olan miyeloperoksidaz (MPO),  $H_2O_2$  ve Cl iyonlarından hipoklorik asit (HOCl) oluşumunu katalize eder. HOCl süperoksit radikali veya demir tuzları ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur [51, 52].

3. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit tek sayılı elektron taşırlar, bundan dolayı da serbest radikallerdir. Nitrik oksit kendisi zayıf bir indirgeyici ajan olmasına karşın endojen serbest radikaller ile birleşerek peroksinitrit radikalini meydana getirir. Bu güçlü bir oksidan olup kolaylıkla hidroksil radikalini oluşturabilir.

4. Mitokondriyal elektron transport sistemi; mitokondride oksijenin suya indirgenmesi sırasında i membranda lokalize elektron transport zincirinin bir bölümünün otooksidasyonu ile süperoksid radikali oluşur [53].

5. Endoplazmik retikulum; bu hücre içi membranlar sitokrom P-450 ve sitokrom b5 sistemlerini içermektedirler. Bu sistemler doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunda rol oynarlar. Bu reaksiyonların oluşumu sırasında serbest radikaller meydana gelir [54].

6. Peroksizomlar; peroksizomlar yüksek oranda oksidaz içerdiklerinden güçlü bir hücresele  $H_2O_2$  kaynağı oluştururlar. Bu peroksizomal enzimler arasında D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, acil-KoA oksidaz bulunmaktadır [55].

7. Plazma membranları; serbest radikal üretimine yol açan plazma membran enzimleri lipooksijenaz ve siklooksijenaz'dır. Bu enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar sonucunda prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler ve anafilaksinin yavaş etkili maddesi sentezlenir [56].

### **3.4 Serbest Radikallerin Etkileri**

Reaksiyonlara girme eğilimlerinden dolayı güçlü reaktif özelliğe sahip olduğu bilinen serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşebilirler. Savunma sisteminden sorumlu hücrelerin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyon başlatabilirler [38].

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Birçok biyomolekül ile reaksiyona girerek çeşitli bileşikler oluştururlar. Bu bileşikler çoğu kez toksik özellikler taşımaktadırlar. En fazla zararlı etkilerinin başında membran hasarları yer alır. En fazla zarar gören yapılar, serbest radikallerin membranlara verdiği zarar ile membrandaki enzimleri inaktif hale getirirler. Böylece, membranlardaki yağ asitlerinin doymamış bağları ve kolesterol ile kolaylıkla reaksiyona girerek çeşitli peroksidasyon ürünleri meydana getirirler. Ayrıca membranların yapısını, permeabilitesini ve fonksiyonunu bozdukları bildirilmiştir [43].

#### **3.4.1 Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkisi**

Serbest radikallerin organizmada karbohidratlar üzerine polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile meydana gelen süperoksitler ve okzalaldehyitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar. Okzalaldehyitler ayrıca DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu nedenle kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynadıkları bilinmektedir [38].

Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunmaktadır. Örneğin, romatoid artrit gibi enflamatuvar eklem hastalıklarında hiyalüronik asidin oluşan serbest radikal tarafından parçalandığı bildirilmiştir [38, 57, 58].

### 3.4.2 Serbest Radikallerin Proteinler Üzerindeki Etkileri

Serbest radikallere karşı proteinler, çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit bileşimlerine bağlıdır ve proteinin aminoasit içeriğine göre radikalik hasardan etkilenme derecesi değişir. Serbest radikaller proteinleri yükseltgeyebilirler.

Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, aminoasit bileşimine, proteinin aktivasyonundan veya yapısının düzenlenmesinden sorumlu aminoasitlerin yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabilirliğine bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir [38, 59]. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenirler [60].

Aminoasitlere ve disülfid (S-S) bağlarına saldırırlar ve özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana getirirler [43]. Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobulin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri ( $Fe^{+2}$ ) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, bunun sonucunda oksijen taşımayan methemoglobin oluşur [38, 48].

### 3.4.3 Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerindeki Etkileri

Bilindiği gibi DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir hedeftir. İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu sonucu oluşur. İyonize edici radyasyonla oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yol açabilirler. Nükleik asit baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları sitotoksositeye neden olur. Bu olaydan özellikle hidroksil radikali sorumlu tutulmaktadır. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar gelişebilir [61, 62]. DNA hasarı onarılmazsa hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir [38, 43].



Aktive olmuş nötrofillerden salınan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır. Burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına neden olur [38, 63].

#### **3.4.4 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri**

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Hücre membranlarındaki ve gıdalardaki kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Lipid peroksidasyonunu başlatan radikaller; süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikal ve alkoksil radikali'dir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerin etkisi ile oksidatif yıkımı "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" olarak bilinir ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler [38, 39].

Demir iyonları özellikle lipid peroksidasyonunda önemli rol oynarlar [64]. Lipid peroksidasyonu iki tiptir:

- a. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu
- b. Enzimatik lipid peroksidasyonu

Herhangi bir radikalın poliansatüre yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunu uzaklaştırmasına nonenzimatik lipid peroksidasyonu denir. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksitler ve endoperoksitlere de enzimatik lipid peroksidasyonu denir. Oksidatif hasarın derecesini membranın lipid/protein oranı, fosfolipidlerin miktarı, yağ asitlerinin bileşimi ve doymamışlık derecesi ve membranın akışkanlığı etkiler.

Membran lipid peroksidasyonu ile hücrenin membran yapısındaki hasar membran transport sistemlerinde bozulmaya yol açar. Bunu iyon dengelerinin bozulması ile hücre içi kalsiyum artışı ve buna bağlı proteazların aktivasyonu takip eder. Hücre içi organellerde de oluşan lipid peroksidasyonuna bağlı membran hasarını ve çeşitli litik enzimlerin salgılanması ve buna bağlı hasar artışları ile devam eder.

### 3.5 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen ( $O_2$ ), yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tanımlama ile reaktif oksijen türleri (ROT) akla gelmektedir [65].

Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. İki kovalent bağ yapmasına rağmen moleküler oksijen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. Dış orbitallerinde bulunan iki elektron, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken molekül minimum enerji seviyesindedir [38, 66]. Serbest radikal tanımına göre oksijen bir “diradikal” olarak değerlendirilir. Diradikal oksijen, spin kısıtlanmasından dolayı radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girmesine rağmen, diğer serbest radikaller ile kolaylıkla reaksiyona girer [38, 43, 67].

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır.

Oksijenden oluşan başlıca reaktif oksijen türleri ve kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan türler paylaşılmamış elektron içeren atom üzerine konulan nokta ile belirtilmişlerdir (Çizelge 3.1.). ROT oluşumu ile organizmanın yapısal ve fonksiyonel biomolekülleri oksidatif stres altına girer. Organizmada oksidatif strese yanıt olarak endojen antioksidan sistemin aktivitesi artar.

Reaktif oksijen türleri (ROT), çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R^\bullet$ ), peroksit radikalleri ( $ROO^\bullet$ ), alkoksi radikalleri ( $RO^\bullet$ ), tiyil radikalleri ( $RS^\bullet$ ), sülfenil radikalleri ( $RSO^\bullet$ ) ve tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2^\bullet$ ) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar [40, 43, 69]. Vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir [70].

Çizelge 3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) [68]

Tür	Adı
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
$\text{O}_2\text{-}\cdot$	Süperoksit
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
$\text{OH}\cdot$	Hidroksil radikali
$\text{ROO}\cdot$	Peroksi radikali
$\text{ROOOH}$	Hidroperoksit
$\text{RO}\cdot$	Alkoksil radikali
$\text{ROOR}'$	Endoperoksit
$\text{ROOH}\cdot$	Hidroperoksil radikali
$(\text{O}_3)$	Ozon
$(\text{HOCl})$	Hipoklorik asit

Organizmada serbest radikal oluşturan olayların başında, mitokondriyal elektron transportu, ksenobiyotiklerin metabolizması ve biyokimyasal yıkım reaksiyonları gelir [71]. Eksojen kaynaklar ise anti-neoplastik ajanlar, alışkanlık yapan maddeler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, ilaçlar, radyasyon ve strestir [43].

Reaktif oksijen türlerinin ana kaynağının süperoksit radikali olduğu, onun da ana kaynağının mitokondri olduğu düşünülmektedir [72]. Çünkü mitokondride oksijene her seferinde sadece bir elektron transfer edilebilmesinden dolayı, elektron transferi sırasında süperoksit radikali oluşumu kaçınılmazdır.  $\text{O}_2\cdot$  (süperoksit), dismutasyon reaksiyonu ile bir başka reaktif oksijen türü olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  'i oluşturur.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ise reaktivitesi yüksek olan  $\text{OH}\cdot$  radikali oluşturma potansiyeline sahiptir. Mitokondride yaşla beraber istikrarlı bir şekilde  $\text{O}_2\cdot$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretim hızı da artar [43].

Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Serbest radikallerin endojen olarak üretimi farklı yollarla gerçekleşmektedir. Buna karşılık, canlı organizmalar serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir.

Oksidatif stres altındaki biomoleküller okside olarak fonksiyonel dejenerasyona uğrarlar [73]. Lipidler, karbonhidratlar, proteinler gibi DNA da ROT'a maruz kalır. Oksijen radikallerinin oluşumundaki artış, antioksidan enzim düzeylerinde veya DNA onarım mekanizmalarında bozukluk olması durumunda oksidatif DNA hasarının artması kaçınılmaz olur. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, protein-DNA çapraz bağlanmaları ve oksidatif baz hasarı gibi lezyonlar meydana gelir [73]. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikoru oluşmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir.

Reaktivite radikale ve ortamda bulunan moleküle bağlıdır. İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronları kovalent bağ yaparak birleşir. Ancak bunun sonucunda oluşan türler de reaktif olabilir. Buna örnek olarak  $NO^*$  ve  $O_2^{*-}$  in çok hızlı reaksiyonu ile bir nonradikal ürün olan peroksinitritin oluşumu verilebilir [38].

### **3.5.1 Süperoksit Radikali ( $O_2^*$ )**

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Başlıca şu yollarla üretilmektedir [38, 39, 63]. Oksijen toksisitesinin temel nedeni olan süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron kabul etmesi ile oluşur.

Diğer radikallerin oluşması süperoksit radikalının birikmesine bağlıdır. Süperoksit radikali en kolay ve en çok oluşan radikal olmakla birlikte aktivitesi düşüktür [74]. Ancak diğer radikallerin oluşmasına yol açması bakımından önemlidir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektronca zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelir. Süperoksit radikali ksantin oksidaz ve bir grup flovoenzimler tarafından oluşturulmaktadır [75].

#### **3.5.1.1 Canlılarda Oluşum Şekli ve Etkileri**

1. Hidrokinonlar, redükte flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, tetrahidrofolatlar indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken İndirgeyici özelliklerinden dolayı oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

2. Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir.

3. Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

4. Oksijenin kullanıldığı mitokondrideki enerji metabolizması sırasında, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

5. Süperoksit radikalinin önemi  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi oluşturabilir. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Ayrıca hücrel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Örneğin; ferrisitokrom-c ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranıp bir elektron kaybeder ve oksijene dönüşür. Epinefrin oksidasyonunda ise oksidan olarak davranıp bir elektron alır ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye indirgenir [38, 43].

6. Aktive olmuş fagositik hücreler olan nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller, virüs veya bakteriyi inaktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücrel fonksiyonlar için gerekli de olabilir.

7. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan olan perhidroksil radikalini ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ve perhidroksi radikali birbiriyle reaksiyona girince biri yükseltgenir, diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşur [38].

### 3.5.2 Hidrojen Peroksit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

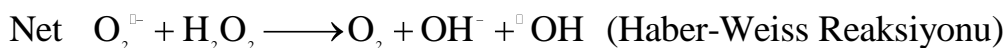
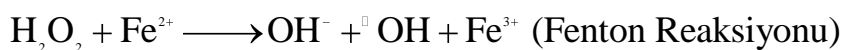
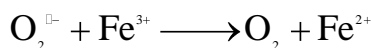
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meydana gelir [38]. Kısaca hidrojen peroksit radikali oksijen molekülüne iki adet elektron eklenmesi ile oluşur. Süperoksit radikali ise sulu ortamlarda dismutasyona uğrayarak hidrojen peroksit radikalini oluşturur [76]. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Ancak biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabildiğinden uzun ömürlü bir oksidan olduğu bilinmektedir [38, 39, 63].

Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali olan OH<sup>•</sup> radikalinin oluşumunu sağlar [75].

Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir.

Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde ROT sınıfına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür [38, 77].

Süperoksidin direkt olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile katalizörsüz oldukça yavaş ilerleyen ve demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlı Haber-Weiss reaksiyonunun da önce ferrik demir (Fe<sup>3+</sup>) süperoksit tarafından ferro demire (Fe<sup>2+</sup>) indirgenir. Sonra fenton reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH<sup>•</sup> ve <sup>•</sup>OH üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir [38, 43];



### 3.5.3 Hidroksil Radikali ( $\cdot\text{OH}$ )

Güçlü bir radikal olan hidroksil radikali oksijen molekülüne üç elektron eklenmesi ile oluşur. Hidroksil radikalının oluşum yollarından biri geçiş metalleri varlığında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin indirgenmesidir (Fenton reaksiyonu). Suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur [38]. Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olur [38, 39, 43]. Tiyoller ve yağ asitleri gibi molekülerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ( $\text{RS}\cdot$ ), C merkezli organik radikaller ( $\text{R}\cdot$ ), organik peroksitler ( $\text{RCOO}\cdot$ ) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olur [38].

Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girse de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedefleridir. Nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik aminoasitler) ile çeşitli radikalik tepkimeler verir [38].

( $\text{OH}\cdot$ ) biyolojik sistemlere diğer ROT' lardan daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir [75].  $\text{OH}\cdot$  radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir [78]. Lipid peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve hemen her organik molekülü, ayırım yapmadan okside edebildiği söylenebilir [79].

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) canlılarda iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ve hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile oluşabilir. Sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşirken uyarılmış su molekülünün ( $\text{H}_2\text{O}^*$ ) homolitik yıkım sonucunda  $\text{H}_2\text{O}^+$  nun bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bahsi geçen bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve  $\cdot\text{OH}$  üretilmiş olur. Üretilen bu  $\cdot\text{OH}$ , radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal ürün olarak bilinir.

Diğer bir yol olan hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile  $\cdot\text{OH}$  yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağı olarak bilinir.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin iki elektron ile indirgenmesi sonucu su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi  $\cdot\text{OH}$  yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den  $\cdot\text{OH}$  üretimi sürekli devam eder.

Ayrıca  $\cdot\text{OH}$  in oluşacağı vücutta üretilen  $\text{H}_2\text{O}_2$  derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağı olarak Haber-Weiss ya da fenton tepkimesi devam eder. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakır olarak bilinir. Hem  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğı için süperoksit; proteinlere bağı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda  $\cdot\text{OH}$  üretimi kaçınılmazdır.

Biyolojik sistemlerde en reaktif tür olan  $\cdot\text{OH}$ , su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler  $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikalının başlıca tepkimeleri aşağıdaki gibidir.

a) Katılma tepkimeleri özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve pirimidin bazları, aromatik aminoasitler gibi) gerçekleşir.

b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiğı tepkime olarak bilinir.

c) Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu elektron transfer tepkimeleri olarak bilinir.

Her tür biyolojik molekül  $\cdot\text{OH}$ 'ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir.

DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür.

Hücre zarı su içermediğinden  $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Özellikle  $\cdot\text{OH}$  yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (proteine bağı) tutulmalıdır.



### 3.5.4 Hipoklorik Asit (HClO)

Doku makrofajları gibi fagositik hücreler, nötrofil, eozinofil gibi granüositler mikroorganizmaları öldürmek için klorlanmış oksidanlar üretebilir. HClO, miyeloperoksidaz enzimi tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Cl<sup>-</sup> iyonunun birleşmesi sonucu oluşur. Dokularda hasar oluşturan güçlü bir oksidandır [48].

### 3.6 Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

Reaktif azot türlerinin başlıcaları; nitrik oksit radikali, peroksinitrit radikali ve azot dioksit radikalidir. Süperoksit radikalinin beyindeki nöronal ve endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile sürekli oluşan ve bir gaz radikal olan nitrik oksit ile girdiği reaksiyon sonucu peroksinitrit oluşur. Fizyolojik pH'da peroksinitrit anında 'OH ve azot dioksitde parçalanır. Çok güçlü bir prooksidan olan peroksinitrit, SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması hücrel disfonksiyon ve ölüme yol açabilir.

Beyin hasarındaki peroksinitritin iskemik rolü son yıllarda araştırmalara konu olmuştur. Ayrıca nitrik oksit ve yan ürünleri nitrit, nitrat, peroksinitrit ve 3-nitrotirosin yapılarının vazodilatasyon, immün cevap geliştirme ve hücrel iletişimde rolü olduğu bilinmektedir. Oluşan nitrik oksit diğer formlarına dönüşebilir ve hücrelerde nitrik oksit sentetaz enzimleri ile nitrik oksit oluşturur. Böylece hücrede oksidatif hasarlara yol açabilirler. Aşağıda verilen çizelgede görüldüğü gibi nitrojen oksit türlerinin çoğu radikal yapısına sahip değillerdir (Çizelge 3.2). Nitrik oksitin oksijenli ortamda kendiliğinden oksidasyonu sonucu oluşan bu türleri, paylaşılmamış elektron içermeseler bile çok reaktiftirler [80].

Çizelge 3.2. Reaktif azot türleri

Tür	Adı
NO•	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> •	Nitrojen dioksit
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Nitril katyonu
NO <sup>-</sup>	Nitroksil anyonu
NO <sup>+</sup>	Nitrozil katyonu (nitrozonyum iyonu)
ONOO•-	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitröz asit
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dinitrojen trioksit
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dinitrojen tetroksit
(HNO <sub>2</sub> )	Nitröz asit
(N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	Diazot tetraoksit
(N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Diazot trioksit
(ROONO)	Alkil peroksinitritler
(NO <sub>2</sub> Cl)	Nitril klorür

### 3.6.1 Nitrik Oksit (NO•)

Nitrik oksitin paylaşılmamış elektronu aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda amaçlı olarak ve çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. 1989 yılında NO'ı sentezleyen enzimin olduğu bildirilmiş ve 1990 yılında enzim beyin homojenatlarından saflaştırılmıştır. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir. Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır; nNOS ve eNOS

izoformları konstitütif enzimlerdir. NO sentezi için öncül molekül olarak L- arjinin aminoasidi kullanılmaktadır. NO'nun arjininden sentezi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile iki kademe olur. Tepkimenin ilk kademesinde L-arjinin aminoasiti guanidin-nitrojen terminalinden NOS enzimi ile hidroksillenme olur, ikinci kademe ise enzime bağlı olan ara ürün sitrülün ve NO'ye çevrilir. NO endotel hücre yüzeyini etkileyen uyarıcılara cevap olarak üretilir. NOS ve kofaktörleri (BH<sub>4</sub>, FAD, FMN ve NADPH) L-arjininden NO sentezi için gereklidir [81, 82].

NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılır. Haberci (messenger) molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini arttırır. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi NO'ye antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Özellikle iNOS enziminin induksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur (Çizelge 3.2). Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna neden olarak proteinlerin/enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler.

### 3.7 Reaktif Sülfür Türleri (RSS)

Tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>),  
Sülfenil radikalleri (RSO<sup>•</sup>),  
Tiyil peroksit radikalleri (RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>),  
gibi çeşitli serbest radikaller bilinmektedir [83].

### 3.8 Reaktif Klorür Türleri (RCS)

Atomik klor ( $\text{Cl}^{\bullet}$ ),

Hipokloröz asit ( $\text{HOCl}$ ),

Nitril klorür ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ),

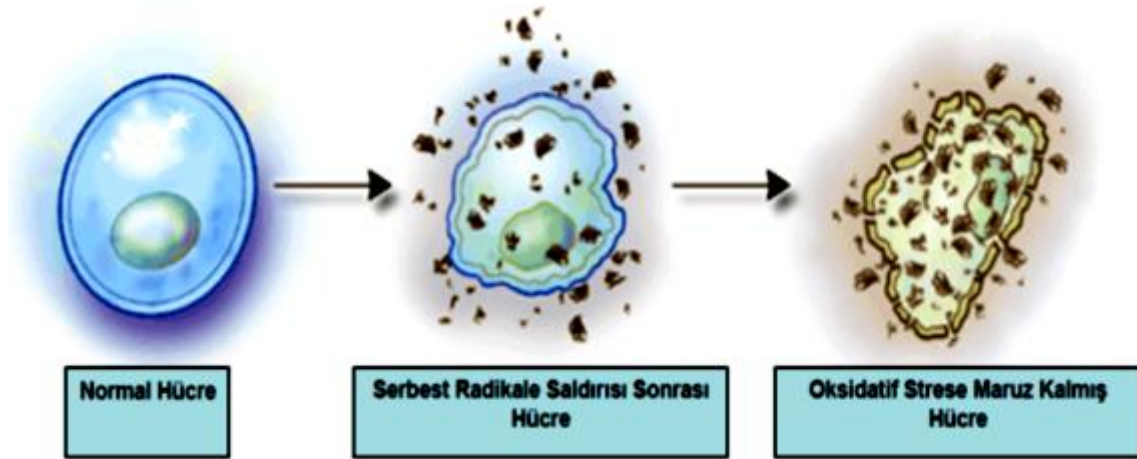
Kloramin gibi çeşitli reaktif klorür türleri bilinmektedir [80].

## 4 OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri veya diğer serbest radikaller ile antioksidan sistem arasında oluşan dengesizliktir ve bu dengesizlik hücrenin önemli kısımlarında geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir (Şekil.4.1).

Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Metabolik yollarla ya da dış kaynaklı faktörlerin etkisi ile vücutta oluşan süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri ile enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan bileşikler arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği göstermekte olup, doku hasarına yol açmaktadır [84].

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde, bu olaya oksidatif denge denir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir.



Şekil.4.1. Oksidatif stresin hücre yapısına etkisi

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikal ara ürünleri, enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan ROT, antioksidanlar olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldıktan daha fazla ROT oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması

vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla ROT' ların meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır.

Reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi veya yetersiz transferi olduğunda hücrenin redoks durumu değişir. Serbest radikaller küçük boyutları ve yüksek enerjileriyle hücresel makromolekülleri okside edebilirler. Çok sayıda hücresel komponentin kontrolsüz oksidasyonu söz konusu olursa, bu durum yine oksidatif stres olarak adlandırılır.

Oksidatif stres lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyon ve kırıklarına, sitotoksik etkilere ve sinyal iletilerinde bozulmaya neden olabilir [85, 86, 87]. Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarının yaşlanma süreci ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıkların (ateroskleroz, katarakt, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, immun sistem bozuklukları, kanser oluşumu) progresyonunda önemli rol oynadığına inanılmaktadır. Oksidatif stres yaklaşık 50 kadar hastalık patogeneziyle ilişkilendirilmiştir [85].

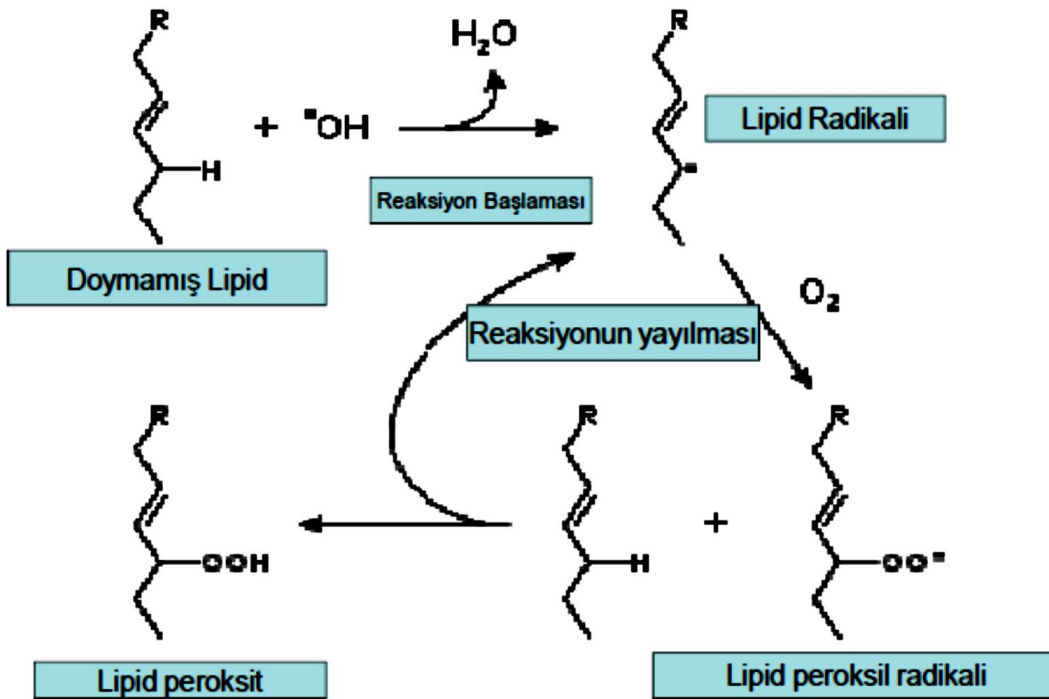
#### **4.1 Lipid Peroksidasyonu**

Lipid peroksidasyonu, yağların yükseltgenmesi sonucu bozulmasıdır. Yağların genel bozulma biçimi, bileşimlerindeki doymamış moleküllerin oksijenle yükseltgenmesi olup lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler [88]. Lipid peroksidasyonu, hücre hasarının başlıca nedenidir ve iskemi dışında ısı, ışık, radyasyon, detoksifikasyon ve hızlı hücre bölünmesi gibi diğer etkenlerle de oluşmaktadır.

Biyolojik membranlar, poliansatüre yağ asitleri, oksijen ve metal iyonları yönünden oldukça zengin olduğundan oksidatif hasara açıktır. Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, geniş miktarlarda poliansature yağ asiti ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipid radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir işaretidir (Şekil 4.2).

Biyolojik membranların en önemli unsurları lipid ve proteinlerdir. Lipid peroksidasyonu, lipidler kadar membran proteinlerini de hasara uğratabilir [89] Lipid peroksidasyonu, hücre zarı geçirgenliğini ve hücre zarı protein oksidasyonunu artırarak hücre zarı işlevini büyük oranda bozar [90, 91, 92]. Yıllardır bilinen ve klinikte değişik alanlarda kullanıma sahip bir antioksidan ajan olan N-asetil-sistein (NAS), lipid peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu önleyerek hücre bütünlüğünün devamına yardım edebilir [93, 94, 95]. Yaşlı farelerde yapılan bir çalışmada NAS ile beslenen grupta sinaptik mitokondrilerde lipid peroksidaz ve protein karbonil seviyesi daha düşük bulunmuştur [96].

Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde  $O_2$ 'nin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az ya da çok degradasyonu ile sonuçlanan hücre lipidlerinin peroksidasyonudur [88].



Şekil 4.2. Lipid peroksidasyon oluşum mekanizması

Oksijen molekülü lipidlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan

doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipid peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun zar yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [97].

Lipid peroksidasyonu başlangıç, ilerleme ve bitiş olmak üzere üç fazda oluşur. Başlangıç döneminde reaktif elemanlar, özellikle hidroksil radikali ve oksijen radikalleri, poliansatüre yağ asitlerinden hidrojen alırlar. Böylece lipid radikalleri oluşur. Bunlar oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksi radikallerini oluştururlar. Çift bağların tekrar oluşturulmasıyla konjuge dienler (CD) oluşur. İlerleme döneminde zincirleme reaksiyonlar oluşarak yeni radikaller ortaya çıkar. Oksidatif hasar, membranlarda yağ asitlerinin birbirlerini etkileyebilecek kadar yakın yerleşmesinden dolayı komşu yağ asitlerine sıçrar. Bu ilerleme döneminde başlangıç takip eden binlerce reaksiyon, geniş bir hasar oluşturur.

Lipid peroksidasyonu, radikallerin malondialdehide (MDA) dönüşümü ile sonlanır, *in vitro* membran lipid peroksidasyonunu tespit etmek için MDA düzeyinin ölçülmesi oldukça sık kullanılan bir metottur. Lipid peroksidasyonuna maruz kalan membrandaki poliansatüre yağ asitleri membran yapısını değiştirerek permeabilitenin artmasına ve böylece transport fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Bunun yanında mitokondri membranının geçirgenliğindeki değişim hücre oksidatif fosforilasyonunun bozulmasına, lizozomal membranlardaki geçirgenliğin bozulması da hidrolitik enzimlerin lizozom dışına çıkmasıyla hücre hasarına yol açarlar.

Membran üzerindeki peroksidatif hasar hücre içi ve dışı iyon dengelerinde değişime neden olur. Intraselüler kalsiyum konsantrasyonu artarak hücre içinde kalmoduline bağlı intraselüler proteazları aktive eder. Bu yolla hem ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşümünü hem de fosfolipaz A<sub>2</sub>H aktive ederek membran lipidlerinden araşidonik asit salınımına yol açarlar. Bu yolla prostaglandin metabolizması, dolayısı ile siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları da aktivite kazanır.

#### **4.1.1 Lipid Peroksidasyon Olayının Belirlenmesi**

Peroksidasyon olayının şiddeti üç kritere bağlı olarak değerlendirilir [98]

- a) Oksijen tüketiminin ölçülmesi
- b) Hidroperoksitlerin ölçülmesi
- c) Hidroperoksitler ve aldehitler gibi yıkımlanma ürünlerinin ölçülmesi



## 4.2 MDA (Malondialdehit)

Serbest radikaller özellikleri nedeniyle, lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek hücreye zarar verirler. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde O<sub>2</sub>' nin redüksiyonundan oluşan türlerin üretimiyle oksidatif stres meydana gelir. Lipidlerde bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Bunun sonucunda hücre yapısındaki lipidlerde bozulmalar olur [99]. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar.

MDA (Malondialdehit), biyolojik sistemde lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir.

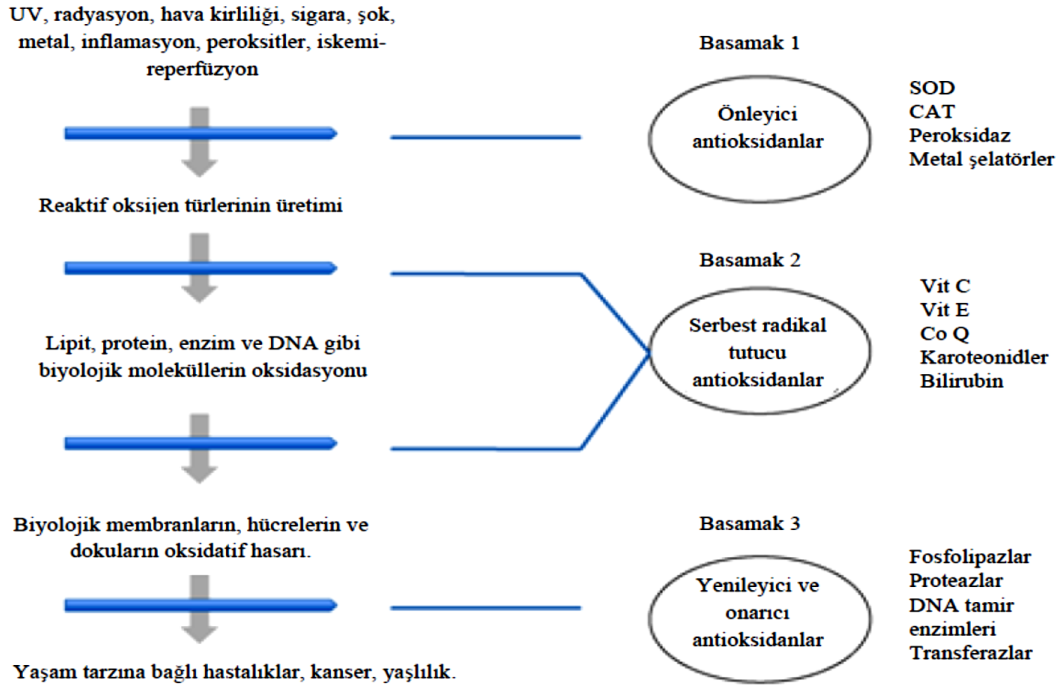
MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [100]. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler [99]. LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder [101, 102].

## 5 ANTIOKSİDANLAR

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır (Şekil 5.1). Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, serbest radikalleri, bir başka deyişle reaktif oksijen türlerini (ROT), uzaklaştıran ve bunlar tarafından oluşturulabilecek hasarları önleyen ajanlar olmaları nedeniyle birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde hayati öneme sahiptir. Radikallere karşı vücudumuzu oluşturan her hücrede, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSGR) gibi enzimlerden oluşan radikal süpürücü enzim sistemi dediğimiz bir savunma mekanizması ile A, E, C, lipoik asit gibi antioksidan vitaminlerden oluşan yardımcı savunma mekanizması mevcuttur [103].

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu reaktif oksijen ve azot türlerini, etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu zararlı bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları hayatın vazgeçilmez bir parçası haline getirmektedir [104].

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; vitaminler (A, E ve C vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [105]. M.Ö. 3000 yıllarında kullanılmaya başlanan şifalı bitkiler, 1900'lü yıllarda modern tıbbın gelişmesiyle popüleritesini kaybetmeye başladı. Yerini büyük ölçüde kimyasal ilaçlara bıraktı ve alternatif bir tıp dalı olarak anılmaya başladı.



Şekil 5.1. Biyolojik sistemlerde antioksidan ağı

## 5.1 Endojen Antioksidanlar

Vücudun endojen savunma sisteminin düzenli ve dengeli bir diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu yüzden diyetle antioksidan alımında artma veya antioksidanlarla zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmaktadır.

Gıda sanayinde yağların ve yağ içeren diğer ürünlerin korunması ve raf ömrünün uzatılması için genellikle bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar bu bileşiklerin toksiditesinden bahsederek, onların karsinojenik olma riskini ortaya koyar niteliktedir [106].

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Endojen antioksidanlar çizelge 5.1' de gösterilmiştir [43, 107];

Çizelge 5.1. Endojen antioksidanlar

<b>Enzimatik endojen antioksidanlar</b>	<b>Nonenzimatik endojen antioksidanlar</b>	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Melatonin	Glutatyon
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Seruloplazmin	Sistein
Glutatyon S-Transferazlar (GST)	Transferrin	Metiyonin
Katalaz (CAT)	Miyogloblin	Ürat
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	Hemoglobin	Laktoferrin
Hidroperoksidaz	Ferritin	Albümin
	Bilirubin	Hemopeksin
	Haptoglobulin	Glukoz
	Koenzim Q	

## 5.2 Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanları vitaminler, ilaçlar ve gıda oksidanları olarak sınıflandırabiliriz.  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbik asit ve folik asit vitamin olan eksojen antioksidanlardır.

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, gıdalar ve ilaç antioksidanları çizelge 5.2' de gösterilmiştir [43].

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, folik asit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar), rekombinant SOD, endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (ebselen, asetil sistein), nonenzimatik radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), sitokinler, demir şelatörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferrokamin, seruloplazmin) [44].

Çizelge 5.2 Eksojen Antioksidanlar [107]

<b>Vitaminler</b>	<b>İlaçlar</b>	<b>Gıda antioksidanları</b>
<p><math>\alpha</math>-tokoferol (vitamin E)  <math>\beta</math>-karoten                      Askorbik asit (vitamin C)                      Folik asit (folat)</p>	<p>Ksantin oksidaz inhibitörleri                      NADPH oksidaz inhibitörleri                      Rekombinant süperoksit dismutaz                      Trolox-C                      Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar                      Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar                      Demir redoks döngüsü inhibitörleri                      Nötrofil adezyon inhibitörleri                      Sitokinler (TNF ve IL-1)                      Barbitüratlar                      Demir şelatörleri</p>	<p>Bütül hidroksi toluen (BHT)                      Bütül hidroksianasol (BHA)                      Sodyum benzoat                      Etoxyquin                      Propylgalate                      Fe-süperoksit dismutaz</p>

Demir şelatörleri: Hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler.

Sitokinler: Başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri de aktive ettiklerinden dolayı zararlı olabilirler.

### 5.3 Doğal Antioksidan Kaynakları

Bazı bitkiler iyi bir doğal antioksidan kaynağıdır. Meyvelerde bulunan antioksidan bileşiklerle yapılan çalışmalarda, çilekçiller, kirazçiller, turunççiller, kivi, kuru erik ve zeytinde önemli miktarda antioksidanların bulunduğu bildirilmiştir [107]. Limon ve portakal, yüksek miktarda C vitamini konsantrasyonuna sahiptirler ve bu özelliklerinden

dolayı iyi bir antioksidan kapasiteye sahiptirler [108]. Sebzelerin büyük bir bölümünde özellikle kakao fasülyesi, patates, domates, ıspanak, phaseolus vulgaris gibi acıbakla tohumu, karabuğday, ayçiçeği veya kırmızıbiber gibi sebzelerde ve mısır koçanında antioksidan potansiyel analiz edilmiştir [107].

Özellikle Amerika ve Avrupa'da en çok tüketilen sebzeler arasında olan brokoli vitaminler ( A, E, C) ve flavonoidlerce ve antioksidan özellik kazanmasını sağlayan kuercetin ve kaempferol içermesinden dolayı hem bağışıklığı arttırıcı hem de antioksidan özellik taşımaktadır. Lifli bir yapıya sahip olan brokoli barsaklardan ağır metallerin dışarı atılmasını sağlar. Bu özelliğinin yanında birçok faydası olan brokoli özellikle prostat ve meme kanseri önleyici güce sahiptir [109].

Karotenler yağda çözülebilen bitkisel pigmentlerin son derece renkli (kırmızı, turuncu, sarı) bir grubudur. İnsan vücudunda önemli rol oynayan karotenler vücutta A vitaminine dönüştürülür ve antioksidan etki gösterirler. Bunlar "provitamin A" olarak adlandırılır. Bu karoten grubuna lutein, likopen, zeaksantin örnek verilebilir [110]. Anavatani Meksika ve Peru olan ve tek yıllık bir bitki olan domates, içeriğindeki likopenden dolayı doğal antioksidan olarak kabul edilmektedir. Likopen, bazı sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten ailesine ait bir pigmenttir. İnsan vücudu likopen üretemez ve bu maddeyi dışarıdan alması gerekir.

Karotenler ve prostat kanseri riski arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, likopen olarak adlandırılan bir karotenin bu kanser riskine karşı koruyucu özelliği olduğu açıklanmıştır. Günlük beslenmesinde yüksek miktarda (6,5 mg/gün veya daha yüksek) likopen alan erkeklerde daha az likopen alanlara göre prostat kanseri riskinin %21 azaldığı gösterilmiştir [111]. Ratların karaciğer ve testis dokusundaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkisinin olup olmadığıyla ilgili yapılan çalışmada, nar suyu verilen ratların karaciğer ve testis dokularında lipid peroksidasyonu azalırken glutatyon perosidaz (GSH-Px) ve katalazın (CAT) arttığı gözlenmiştir [112]. Yeşil çay, polifenol bileşenleri camellia sinensis yapraklarının oksidasyona uğratılmadan dehidratasyonundan elde edilmektedir [113]. Çayın çok güçlü antioksidan etkisinin yapısındaki flavonoidler olduğu ve bu flavonoidlerin hücreleri serbest radikallerin yarattığı hasardan koruduğu gösterilmiştir [114].

## 5.4 Yağda ve Suda Çözünen Radikal Tutucular

Organizmadaki enzimatik savunma sistemlerine ek olarak, endojen olarak oluşan veya gıdalarla alınan antioksidan özelliği olan moleküller de vardır. Bu antioksidanlar ROT'ları doğrudan nötralize edebilirler.

### 5.4.1 C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini suda çözünen bir vitamindir. Organizmada birçok bileşik için indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Askorbat etkili olarak  $H_2O_2$ , hipoklorit, süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutar. Sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini plazma lipidlerine difüze olmadan tutar ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Membranlarda oluşan  $\alpha$ -tokoferol radikali ile reaksiyona girerek  $\alpha$ -tokoferolün rejenerasyonunu sağlar [43, 63]. C vitamininin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir; aktive nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyona karşı plazma lipidlerini korur ve güçlü bir hipoklorat gidericisidir [114]. Sigara dumanında bulunan reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlar, sigara içenlerde ve pasif içicilerde plazma C vitamini düzeyleri sigara içmeyenlere göre düşük bulunmuştur.

Yapılan çeşitli çalışmalarda bazı gıdalarda ve sigara dumanında bulunan nitrozaminleri inaktive ederek, antitümörjenik rolü olduğu gösterilmiştir [116, 117]. Askorbik asidin yüksek konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin yanında, düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Geçiş metalleri varlığında demiri indirgeyerek fenton reaksiyonu ile  $\cdot OH$  radikali oluşumuna katkı sağlar. Sağlıklı organizmada geçiş metal iyonları proteinlere bağlı bulduklarından, bu durum *in vivo* koşullarda çok sınırlıdır ve askorbik asidin antioksidan özelliği prooksidan özelliğinden daha baskındır [63].

### 5.4.2 $\alpha$ -tokoferol

Doğada yaygın olarak bulunan E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır [43]. Lipofilik özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının ve

plazma lipoproteinlerinin en önemli zincir kırıcı antioksidanıdır. Peroksil radikallerini gidererek lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

$\alpha$ -tokoferol radikali ( $\alpha T^{\cdot}$ ) nispeten stabil ve reaktivitesi az olan bir radikaldir. Glukuronikasit ile konjugasyona uğrayıp safra ile atılabilir. Okside olduktan sonra veya atılmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilir. Böylece rejenere edilmiş olur. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar  $\alpha$ -tokoferol ile glutatyon peroksidazın serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etkisi olduğunu göstermiştir. GSH-Px oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken,  $\alpha$ -tokoferol peroksitlerin oluşumunu engeller [43, 115].

Son yıllarda aterosklerozun gelişiminde lipid peroksidasyonunun özellikle de LDL peroksidasyonunun etkili ve kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir.  $\alpha$ -tokoferol tarafından lipid peroksidasyonu yayılma basamağında engellenir.  $\alpha$ -tokoferol alımıyla koroner kalp hastalıkları riskinin azaldığı deneysel olarak gösterilmiştir [117].  $\alpha$ -tokoferol nitritlerin nitrozaminlere dönüşümünü engelleyerek, antikarsinojen etki gösterir, iskemi/reperfüzyon ile ilişkili peroksidatif hasarı önlemede etkilidir, immüniteyi artırır, eritrosit membranının stabilitesi için esansiyeldir.  $\alpha$ -tokoferol selenyumun organizmadan kaybını önleyerek ve onu aktif halde tutarak selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar [115, 117].

### 5.4.3 Karotenoidler

Bitkilerde yaygın şekilde bulunan doğal renk pigmentleridir. Fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korur. En bilineni A vitamini öncüsü olan  $\beta$ - karotendir. Karotenoidler özellikle singlet oksijeni ( $^1O_2$ ) ve peroksil radikallerini gideren etkili antioksidanlardır. Karotenoidler arasında en etkin  $^1O_2$  tutucu;  $\beta$ -karotenin açık zincirli analogu olan likopendir [118]. LDL'yi oksidatif hasara karşı koruyarak ateroskleroz ve diğer koroner hastalıkların gelişmesini de engeller [115].

Likopen fotooksidatif proses göz ve deri gibi ışığa maruz kalan dokularda bazı hastalıklara neden olan bir olaydır ve ROT oluşumuna yol açar. Körlüğe neden olan yaşa bağımlı maküler hasarda, singlet oksijenden koruyucu pigmentler özellikle lutein ve zeaksantindir. Güneş yanıklarında görülen eriteme karşı koruyucu ve fotooksidatif hasarı önleyici pigment  $\beta$ -karotendir. Lipofilik özelliklerinden dolayı, oksidatif hasara karşı hücrel mebranları ve lipoproteinleri korumada önemli rol oynarlar.  $\beta$ -karoten reaktif azot türlerini gidermede C ve E vitaminleri ile sinerjik etki gösterir [118,119].



#### 5.4.4 Flavonoidler

Birçok meyve ve sebze de yüksek oranlarda bulunan sarı-beyaz pigmentlerdir. Bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenolik bileşiklerdir. Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, kateşinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin  $O_2^{\bullet-}$ , lipid alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ), lipid peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ) ve  $NO^{\bullet}$  radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katıldığı da bildirilmiştir [120-122]. Bitkilerin çoğunda bulunan bu antioksidan, yine antioksidan olan C ve E vitamininden çok daha fazla miktarlarda bulunduğu için özellikle meyve ve sebze ağırlıklı bir diyet ile vücuda fazla miktarlarda alınabilir.

#### 5.4.5 Glutasyon

Bir tripeptit peptit bağı ile birbirine bağlanmış üç aminoasit içeren bir peptittir. Üç tane çift bağı vardır glutasyon ( $\gamma$ -glutamil-sistein-glisin) hücreleri serbest radikaller gibi toksinlerden hücreleri koruyan bir antioksidandır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. L-sistein, L-glutamik asit ve glisinden sentezlenen üç etkili anti-aging aminoasit ve güçlü bir antioksidandır.

#### 5.4.6 Ürik Asit

Karbon, oksijen, nitrojen ve hidrojen'den oluşan organik bir bileşiktir. Ürik asit, Ksantin oksidazın oksipürinleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metablozmasının son ürünüdür. Diğer birçok memelide ürikaz enzimi ürik asidi allantoin'e oksitler. Purin metabolizmasının son ürünü olan ürat plazmada bulunan ve suda çözünen bir maddedir. Normal plazma konsantrasyonlarında bulunan ürat süperoksit, hidroksil, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni içerir. Lipid radikalleri üzerinde etkisizdir [43].

#### 5.4.7 Bilirubin

Alyuvarların dalakta yıkımı sırasında hemoglobin moleküllerinin parçalanmasıyla oluşur. Karaciğere gelir ve safra olarak dışa verilir. Büyük oranda parçalanmış eritrositlerin hemoglobinlerinden kaynaklanır (%75). Bu yıkım retiküloendotelyal sistemde olmaktadır. Bilirubinün glukuronik asit ve sülfürik asitle oluşturduğu esterlere konjuge (direkt) bilirubin adı verilir.

Kandaki bilirubinün bir kısmı proteinle kompleks oluşturur. Buna da serbest bilirubin adı verilir. Posthepatik bilirubinler direkt bilirubinler olup laboratuvar analizlerinde verilen kimyasal maddelerle direkt olarak reaksiyona girer. Prehepatik bilirubinler ise indirekt bilirubinler olup laboratuvar analizinde de reaksiyon oluşturmak için metil alkol ilavesi gerekmektedir. HEM metabolizmasının memelilerdeki son ürünlerinden biri olan bilirubin plazmada üç temel antioksidandan birisidir [115, 123]. Düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [124].

#### 5.4.8 Melatonin

Melatonin epifiz bezinin pineolasit adı verilen hücrelerinden salgılanır. Biyoritmi (sirkadyan ritm) belirler ya da biyoritm üzerinde etkilidir. Pineolasit hücreleri ışığa duyarlıdır. Elektromanyetik dalga yoğunluğu arttıkça melatonin salgılanması azalır. Melatonin bir tür etanoamiddir. Melatonin, kişiden kişiye değişse de yaklaşık olarak 23:00 ile 05:00 saatleri arasında salgılanan bir hormondur. Hormonun temel görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamaktır. Bunun haricinde melatoninün güçlü salgılanmasının kansere karşı koruyucu etkisi vardır. Bu nedenle lösemi ve diğer kansere yakalananların kesinlikle karanlık ortamlarda yatırılmaları istenmektedir. Yapılan son araştırmalara göre hormonun yaşlanmayı geciktirici etkisi de vardır. Melatonin yaz-kış, uzun-kısa gün, aydınlık-karanlık döngüsünün düzenlenmesi gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir hormondur [125]. En zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir [126]

#### 5.4.9 Lipoik Asit

Kükürt içeren endojen bir antioksidandır. Hem yağda hem de suda eriyen bu antioksidan doğal destek, cilt hücrelerinizi serbest radikallerin yaşlandırıcı etkilerinden korur. "mitokondiriler"de hücrenel solunum için gerekli olan ek gücü oluşturur. Hücreyi daha hızlı ve daha çok enerji üreten daha genç ve daha etkili bir hücre haline getirir. Bu doğal madde özellikle dışardan kullanıldığında cilt yaşlanmasını önleyicidir. Hidroksil radikali ve hidrojen peroksidi nötralize eder. Prooksidan metalleri şelatlayarak da antioksidan etki gösterebilir [127-129].

#### 5.4.10 Sistein

Proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Yan zincirinde kükürt grubu içerir. Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. Non esansiyel ve glukojeniktir. 20 aminoasit arasında sadece sistein yan zincirinde fonksiyonel bir tiyol grubu bulundurur. Tiyol gruplarının okside olmasıyla iki sistein arasında disülfid bağı oluşturulabilir. Bu bağın oluşumu geri çevrilebilir bir reaksiyondur. Disülfid bağlarını oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında belirleyici rol oynar.

Sistein, reaktif bir hidrosülfür grubu barındırır ve bazen diğer sistein kalıntıları ile "disülfid köprüsü" (-SS-) adı verilen kovalent bağlar yapar. Bu köprüler genelde aynı polipeptid zincirinde birbirinden uzakta bulunan veya iki farklı polipeptid zincirine ait sisteinler arasında kurulur. Özellikle hücre dışında fazlaca fiziksel ve kimyasal etki altında kalan proteinlerin karmaşık yapılarını korumaları, bu disülfid köprüleri sayesinde olur.

NAS, radyasyon dışı oksitadif stres varlığında, hayvan deneylerinde etkisi gösterilmiş, klinikte mukolitik ve parasatemol hepatotoksitesinde antidot olarak yeri olan ve 50 yılı aşkındır klinikte kullanılan bir ajandır. Oral yolla verilen NAS, iyi tolere edilen ve önemli yan etkisi gözlenmeyen bir ilaç olup; endotoksis, sepsis, asetaminofen zehirlenmesi ve kistik fibrozis gibi GSH eksikliği yaşanan durumlarda klinikte ve deneysel çalışmalarda faydası gösterilmektedir [130-135]. Örneğin, asetaminofen zehirlenmesinde, aşırı GSH düşüşüne bağlı kalıcı karaciğer hasarı oluşur ve asetaminofen detoksifikasyonu yüksek konsantrasyonda GSH gerektirir. NAS karaciğer GSH'nın başlıca kaynağı olarak sisteini artırır ve ayrıca proteinlerde disülfid bağları azaltarak serbest radikalleri ve

bağlanan metalleri uzaklaştırır. Antioksidan, antiinflamatuvar ve hücre koruyucu etkilerinin yanı sıra, mikrovasküler kan akımını arttırdığı ve endotelial koruma sağladığı belirtilmektedir [135].

Çalışmalar NAS'nin SOR kaynaklı apoptotik süreci ve redoks potansiyal dengesizliğini baskıladığını göstermektedir. Çalışmalarda, NAS' nin bu aktivitesi yapısındaki tiyolün antioksidan ve nükleofilik özelliklerine bağlanmaktadır [136].

Sistein (Cys, C) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Yan zincirinde kükürt grubu içerir. 20 aminoasit arasında sadece sistein yan zincirinde fonksiyonel bir tiol grubu bulundurur. Tiyol gruplarının okside olmasıyla iki sistein arasında disülfid bağı oluşturulabilir. Bu bağı oluşumu geri çevrilebilir bir reaksiyondur. Disülfid bağlarını oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında belirleyici rol oynar. Vücudun ürettiği aminoasitlerden sisteinin bir formu olan N-asetil sistein (NAS) önemli bir antioksidan olan glutatyonun üretilmesine yardım eder. Ayrıca NAS' in kendisi de çok güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır [48].

#### **5.4.11 Sitokrom P-450**

Sitokrom P450 enzimleri, "Sitokrom P450 süper gen ailesi" olarak adlandırılan ailenin üyeleridir. Sitokrom P450 enzimleri, bitkiler, hayvanlar, mayalar ve bazı bakterilerle, insanda bulunan geniş bir enzim sistemini oluşturmaktadır. Bu enzimler, hücre içerisinde en çok granülsüz endoplazmik retikulum ve mitokondri organelinde bulunmaktadır. Endoplazmik retikulumu organeli üzerinde bulunan sitokrom P450 enzimleri "ksenobiyotik sitokrom enzimleri", mitokondri organeli üzerinde bulunan sitokrom P450 enzimleri ise "steroidojenik sitokrom enzimleri" olarak adlandırılmaktadır. Steroidojenik sitokrom enzimlerinin, filogenetik olarak, ksenobiyotik sitokrom enzimlerinden daha eski olduğu ve ksenobiyotiklerin steroidojeniklerden geliştiği belirtilmektedir.

İnsanda, sitokrom P450 enzimlerinin katalizledikleri çok önemli reaksiyonlar bulunmaktadır. Bunlardan bir kaçı steroid hormon biyosentezi, ksenobiyotiklerin reaktif metabolitlere (serbest radikaller) dönüşüm metabolizması, detoksifikasyon, doymamış yağ asitlerinin hücre içi habercilere oksidasyonu, yağda çözülebilen vitaminlerin metabolizması şeklinde sayabiliriz.

Sitokrom P-450 biyolojik sistemlerde bulunan enzimatik olmayan antioksidan sınıfına girmektedir. Sitokrom P450 enzim sistemi ilk kez hayvan karaciğer mikrozomlarında bulunmuş olmasına rağmen zamanla bu enzimin çeşitli formlarının bitkiler ve funguslar dahil tüm ökaryotik canlılarda ve hatta bazı prokaryotlarda da varlığı gösterilmiştir [137]. Hepatik sitokrom P450 enzimleri miktar ve aktivite bakımından bireyler arasında farklılık göstermektedir. Sitokrom P450 enzim sistemi, ilaçların ve insanların çeşitli şekillerde maruz kaldıkları diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında önemli görevleri olan ilaç metabolize eden enzimlerden oluşur.

İlaçların metabolize edilmesi, ilaçların etkinliğinde ve toksisitelerinde önemli rol oynar. Pek çok ilacın aktivitesi, karaciğer, ince barsak ve akciğer gibi çeşitli organlarda lokalize olan sitokrom P450 (CYP) enzimlerine bağlıdır [138]. CYP enzimleri, endojen ve ekzojen pek çok maddeyi (ilaçların % 90'ından fazlasını) oksidasyona uğratarak hidrofilik hale getirirler ve vücuttan atılımını kolaylaştırırlar.

Ayrıca azol grubu bileşikler plazma membranının ana sterol bileşiği olan ergosterol biyosentezini inhibe ederek etkili olurlar. Bu inhibisyon ergosterolün sentezinde iki ara ürün olan 14 alfa-metil sterollerin birikimi şeklinde olur. 14 alfa-metil sterollerin ergosterole dönüşmesi için gerekli olan demetilasyon basamağı sitokrom p-450' nin aktivasyonuna bağlıdır.

## **5.5 Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi**

Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman patolojik koşullar oluşabilmektedir. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve “oksidatif stres” koşullarının oluşmasına neden olmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; E vitamini, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan vitaminleri ve esansiyel iz mineralleri içeren gıdaların yeterince alınmasına bağlıdır [139]. Bu vitaminler birlikte etkin bir şekilde çalışarak hastalık ve hasarlara neden olan zararlı reaktif oksijen türlerinin etkisini yok etmektedir.

E vitamini (tokoferoller), yağda çözünebilir başlıca antioksidanlardan olup tüm hücre membranlarında bulunmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı korumaktadır [140]. E vitamininin yüksek dozlarda diyetle ilavesinin LDL düzeylerini

önemli ölçüde artırdığı ve oksidatif strese karşı oldukça koruyucu olduğu bildirilmektedir [141]. Askorbik asit de vücudun ekstraselüler sıvılarında bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Vücutta sentezlenemediği için gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir. Askorbik asidin indirgen bir ajan olmasının yanısıra E vitaminini rejenere etme özelliğine de sahiptir [140]. Karotenoidler ise; antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak zararlı hidrojen peroksitlerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler [142]. Önemli diyet karotenoidlerinden  $\beta$ - karoten; sarı, turuncu sebze ve meyvelerde, yeşil sebzelerde, likopen; domateste ve lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde bulunmaktadır [140]. Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler de indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı ve metal şelatör olmaları nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır [143]. Selenyum, bakır, manganez ve çinko gibi mineraller de koruyucu enzimlerin yapıları ve katalitik aktiviteleri için gereklidir [140].

## 5.6 Antioksidanların Etki Mekanizmaları

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutarak veya daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki gösterirler. Antioksidan enzimler bu şekilde işlev görürler.
2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Vitaminler ve flavanoidler bu özellikteki antioksidanlardır.
3. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4. Onarıcı etki: Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onarıcı etkiye sahiptirler.
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleme; Oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar.
6. Enzimatik etki: SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler [43].

## 5.7 Kanser

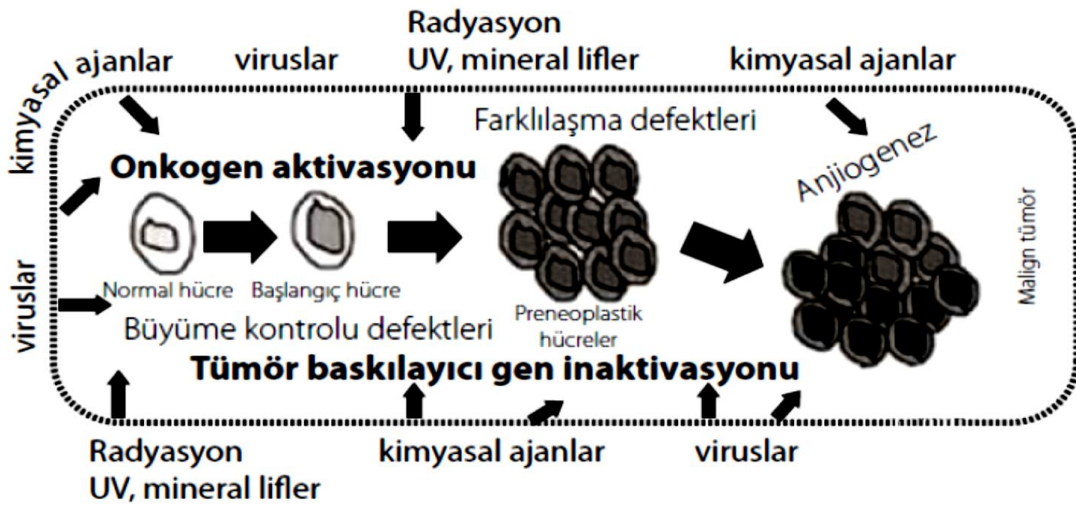
Hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve anormal hücre yapılarının organizmaya yayılması ile karakterize olmuş, aşırı ve istilacı bir şekilde çoğalan patolojik proliferasyonu olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli faktörlerin etkisiyle hücre DNA'sı ve genlerde oluşan değişiklikler nedeniyle hücreler kontrolsüz olarak bölünmeye başlamakta ve normalde bulunmayan bir oluşum meydana getirmektedirler. Ayrıca enfeksiyöz organizmalar, kimyasallar, radyasyon ve sigara gibi çevresel faktörler ile kalıtsal özellikler, hormonlar, bağışıklık sisteminin durumu ve metabolizma faaliyetleri gibi bireye özgü faktörler sonucu da gelişebilir. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliği ile gelişen büyük bir grup hastalıktır.

Kanser, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer pek çok ülkede, en önemli sağlık problemlerinden birini oluşturmaktadır. Amerika'da en sık görülen ölüm sebepleri arasında kanser, kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı almakta ve her 4 ölümden birinin sebebinin oluşturmaktadır [144]. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü, Ocak 2008 tarihi itibarıyla kanser öyküsü bulunan 12 milyon Amerikalı'nın bulunduğunu; bunların bir kısmının tedaviye ihtiyaç göstermezken, büyük bir kısmının halen tedavi görmekte olduğunu belirtmiştir. 2012 yılı itibarıyla, karsinoma in situ (invaziv olmayan kanserler) hariç, 1.638.910 yeni kanser olgusunun teşhis edildiği ve 577.190 Amerikalının kanser sebebiyle yaşamını yitirmesinin söz konusu olduğu değerlendirilmektedir [145]. Ülkemizde "bildirimi zorunlu hastalıklar listesi"ne alınmış olmasına rağmen, verilerin yetersizliği sebebiyle ülkemizdeki kanser insidansı tam olarak bilinmemektedir [146].

Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli olmayıp, hücrenin diğer dokuları istila etme (invazyon) ve dolaşıma geçerek başka dokulara yayılma (metastaz) gibi diğer malign özellikleri de kazanması gerekmektedir [147,148]. Çoğu kanser, tek bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) doğar ve bu hücrenin kanserli olabilmesi için onkojenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmesi gerekmektedir [149]. Çevresel ve bireysel faktörler tek başlarına veya birlikte kanseri tetikleyen olayları başlatabilir ya da hastalığa yakalanma sürecini hızlandırabilirler [145]. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine, anormal bir protein üretimine ya da bir proteinin hiç olmamasına sebep olabilmektedir [150].

Yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler sonucu ekspresyonlarındaki ya da aktivitelelerindeki düzenlemenin bozulmasıyla kanser oluşumunu kolaylaştıran bu genlere “onkojen” adı verilmektedir. Normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan ve hasara uğradıkları veya ortadan kaldırdıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olan ve otozomal resesiflik gösteren genlere de “tümör supresör genler” denmektedir. Onkojenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikleri kazanmasına yol açmaktadır [147, 151, 152]. Kanser, çok aşamalı bir olay olup, fare derisi tümör modellerinde yapılan çalışmalarda initiation (başlama), promotion (gelişme), ve progression (ilerleme) olmak üzere üç aşamaya ayrılmıştır. Başlama aşamasında hücrede kalıcı değişiklikler olmaktadır.

Gelişme ve ilerleme aşamasında kanser başlamış olan hücrede malign transformasyon şekil 5.1'de gösterildiği gibi oluşmaktadır [153].



Şekil 5.2. Kanser oluşumu [148]

Canlıda kanserin başlaması için karsinojen maddenin tek dozuna kısa süreli maruziyet yeterli olmaktadır. Geri dönüşümü olmayan bu basamak ve hedef hücrede mutasyon, translokasyon, veya amplifikasyonla sonuçlanmaktadır. Gelişme aşamasında kimyasal veya diğer faktörlerle kanser başlamış olan hücrede klonal proliferasyon ve seleksiyon olmaktadır. Bu evre kısmen geri dönüşümsüzdür ve büyük bir latent periyodu kapsamaktadır. İlerleme aşamasındaysa, benign lezyonlardan malign lezyonlara geçişin artması ve hızla gelişen neoplazmlar görülmektedir. Hücre kontrolsüz olarak çoğalırken, savunma mekanizmasının zayıflamasıyla baskın fenotipik özellikler gelişmektedir.



Karsinojenik kimyasallar veya virüsler bu üç evreden birini veya hepsini etkileyerek kanser gelişimine neden olmaktadır [153].

### 5.7.1. Kansere Neden Olan Ajanlar

Kanserin sebebi ya da sebepleri henüz kesin olarak bilinmemektedir. Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü vardır. Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişir.

Kanser türlerine yatkın hale getiren genler, kanser oluşumuna yol açan virüsler, radyasyona maruziyet, çeşitli kimyasallar kanser sebepleri arasında sayılmaktadır. Bağışıklık sistemindeki bozulmalar, çeşitli çevresel faktörler ve beslenme tarzı da kanser oluşumunda rol oynamaktadır [150]. Deney hayvanlarına uygulandığında tümörlerin oluşumuna yol açan ajanlar, çevresel faktörler ve bunların sınıflandırılması Çizelge 5.1.'de gösterilmiştir.

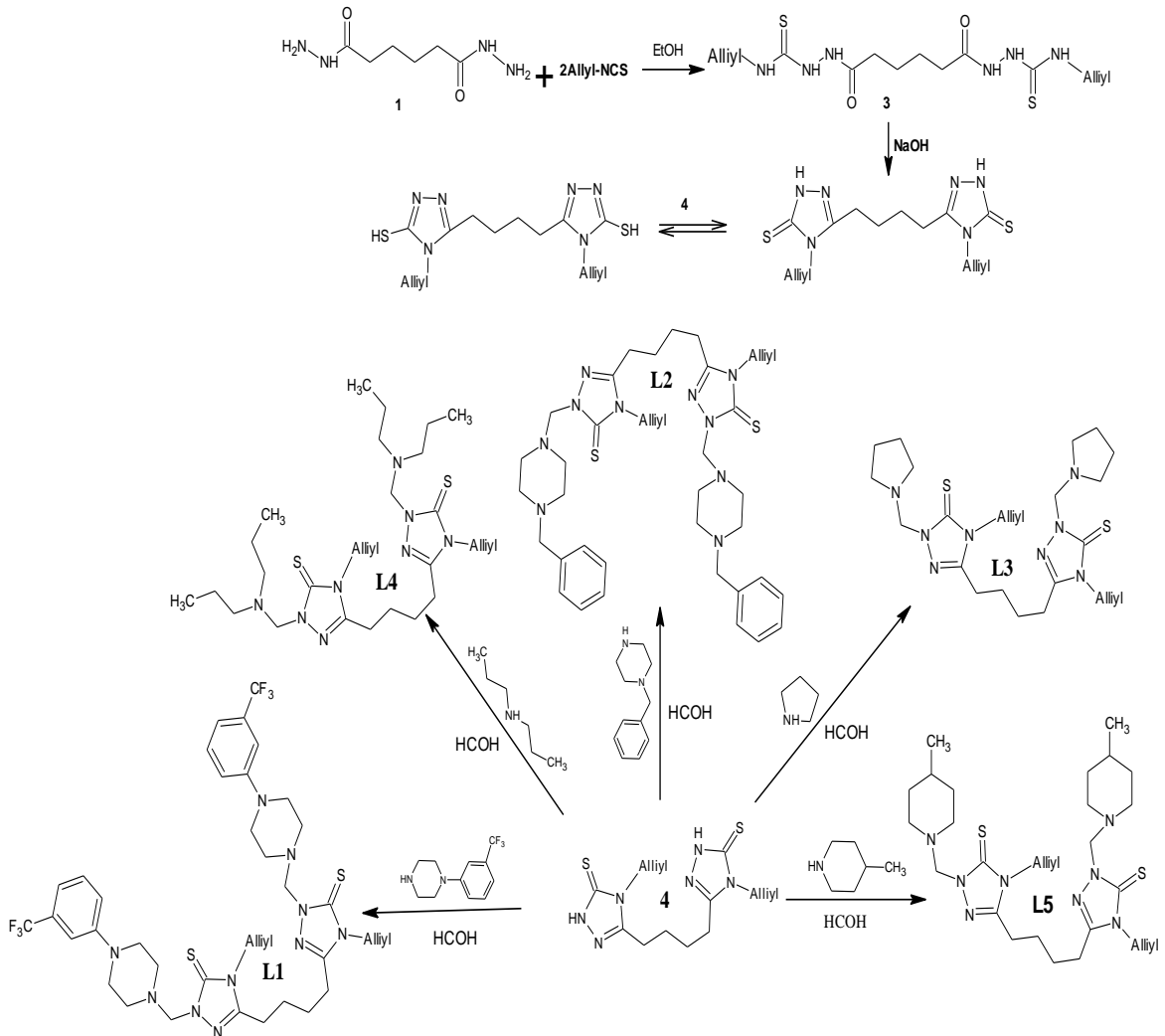
Çizelge 5.3. Karsinojenik ajanlar [154]

<b>Kanserin Nedenleri</b>	<b>Karsinojenik ajanlar</b>
Sigara alkol kullanımı, Uzun süre ve tehlikeli saatlerde güneş altında kalma, Aşırı dozda röntgen ışınına maruz kalma, Bazı kimyasal maddeler (katran, benzin, boya maddeleri, asbest v.b.) Hava kirliliği Radyasyona maruz kalma, Kötü beslenme alışkanlığı	Kimyasal Polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, azo bileşikleri, diyet, hormonlar, metaller, ilaçlar, alkol Fiziksel Güneş ışını ve ultraviyole, iyonizan radyasyon Biyolojik Virüsler (Retrovirüs, Hepadna virüs, Papilloma virüs, Herpes virüs) Genetik DNA dizi polimorfizmi, onkojenler

## 6 MATERYAL METOD

### 6.1. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler

Çalışmada bis-1,2,4- triazol halkası içeren aminometil türevleri kullanıldı. Kullanılan tüm bileşikler Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Anabilim dalı araştırmacıları tarafından [155] sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (Şekil 6.1). L (1-5) maddelerine ait reaksiyon şeması ve IUPAC adlandırması aşağıdaki gibidir (Çizelge 6.1).



Şekil 6.1. Bileşiklerin oluşum reaksiyonları

Çizelge 6.1. Bileşiklerin IUPAC adlandırması

<b>4</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis(4-allil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
<b>L1</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis[4-allil-2-({4-[3-(triflorometil)fenil]piperazin-1-il}metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
<b>L2</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis{2-[(4-benzilpiperazin-1-il)metil]-4-allil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
<b>L3</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis[4-allil-2-(pirolidin-1-ilmetil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
<b>L4</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis{4-allil-2-[(dipropilamino)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
<b>L5</b>	5,5'-bütan-1,4-diilbis{4-allil-2-[(4-metilpiperidin-1-il)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon

## 6.2. *In vitro* Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

### 6.2.1 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

pH metre	: Hanna HI221
Çalkalamalı su banyosu	: Memmert VNB14
Magnetik karıştırıcı	: IKARHBasic
HPLC cihazı	: Shimadzu
Homojenizatör	: Micra-D8
Etüv	: Memmert UNB 400
UV-Vis spektrofotometre	: Shimadzu UV-1700
Vorteks	: IKA
Hassas terazi	: Denver TP 323
Soğutmalı santrifüj	: Hettich 320
Derin dondurucu	: Uğur

Ayrıca vida kapaklı deney tüpleri, otomatik pipet ve pipet uçları kullanıldı.

### 6.2.2 İndirgeme Kuvveti Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6): 6,24 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bir miktar distile suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı ve pH metre kullanılarak NaOH çözeltisiyle pH=6,6'ya ayarlandı.

2. %1'lik  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  çözeltisi: 2,5 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  bir miktar distile suda çözüldü, toplam hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

3. % 10'luk TCA çözeltisi: 25 g TCA bir miktar distile suda çözüldü, toplam hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

4. % 0,1'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi: 83 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  distile suda çözüldü, toplam hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

### 6.2.3 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. 60  $\mu\text{M}$  PMS çözeltisi: Önce 18 mg PMS alındı ve toplam hacim 1 litreye fosfat tamponuyla (0,1M pH=7,4) tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 10 mL alındı ve 100 mL'ye aynı tamponla seyreltildi.

2. 468  $\mu\text{M}$  NADH çözeltisi: 34 mg NADH alındı ve toplam hacim 100 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0,1M pH=7,4) tamamlandı.

3. 150  $\mu\text{M}$  NBT çözeltisi: 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0,1M pH=7,4) tamamlandı.

### 6.2.4 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,1 M fosfat tamponu: 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 80 mL distile suda çözülerek, pH metre yardımıyla pH=7,4'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi: %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 343  $\mu\text{L}$  alındı ve 0,1 M'lık fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.

## 6.2.5 Metal Şelatlama Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. 2 mM FeCl<sub>2</sub> çözeltisi: 0,02 g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O alındı ve hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

2. 5 m M ferrozin çözeltisi: 0,123 g Ferrozin alındı, bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

## 6.2.6 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

1. 200 mM, 5 ml deoksiriboz çözeltisi: 0,135 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.

2. 20 mM, 50 ml FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi: 0,278 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

3. 10 mM, 50 ml EDTA çözeltisi: 0,011 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

4. 1 M, 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi: 5,107 ml alınıp 50 ml' ye tamamlandı.

5. 500 mM, 5 ml askorbik asit çözeltisi: 0,495 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.

6. 50 mM, 50 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi: 0,345 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

## 6.3 *İn vitro* Analiz Yöntemleri

### 6.3.1 İndirgeme Kuvveti

Test bileşiklerinin (L1-L5) indirgeme kuvveti Oyaizu metoduyla Fe<sup>+3</sup> ün Fe<sup>+2</sup> ye transformasyonu prensibine göre yapıldı [156]. Farklı konsantrasyondaki DMSO' da çözülmüş örneklerden (50, 100, 250 µg/ml) herbir tüpe 1 mL alındı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6) ve 2,5 mL % 1'lik Potasyum ferrosiyanür (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) ilave ederek karışım 50 °C'de 20 dk. inkübe edildi.

Bu işlemden sonra reaksiyon karışımlarına 2,5 mL % 10'luk triklor asetik asit (TCA) ilave edildi. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL

alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve % 0,1'lik 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> ilavesinden sonra absorbans 700 nm'de okundu. Kör olarak DMSO kullanıldı. Kontrolde ise bileşikleri içermeyen reaktifli DMSO'lu karışım kullanıldı. İndirgeme kuvvetini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olan  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit ve BHT aynı konsantrasyonda kullanıldı. Her bir ölçüm 3'er kez yapılarak ortalamaları alınarak hesaplandı. Bu metotta, yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kuvveti olarak değerlendirilir.

### 6.3.2 Metal Şelatlama Aktivitesi

Test bileşiklerinin metal şelatlama aktiviteleri, Dinis ve ark.,'nın belirledikleri yönteme göre yapıldı [157]. Bu işlem için farklı konsantrasyondaki (50, 100, 250  $\mu$ g/mL) örneklerden 0,4 mL alınarak 2 mM'lık ve 0,05 mL FeCl<sub>2</sub> çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon 0,2 mL ve 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı. Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı ferrozin hariç geriye kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak sentez numuneler hariç geriye kalan çözelti kullanıldı. Metal şelatlama aktivitelerini karşılaştırmak için aynı konsantrasyonda standart antioksidan olarak kabul edilen  $\alpha$ -tokoferol ve BHT kullanıldı.

Her bir ölçüm 3'er kez yapılarak ortalamaları alınarak hesaplandı. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek Metal şelatlama Aktivitesi olarak değerlendirilir. Yüzde metal şelatlama aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır;

$$\% \text{ metal şelatlama aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> = Kontrol absorbansı

A<sub>1</sub> = Numunelerin ve/veya standartların absorbansı

### 6.3.3 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

Test bileşiklerinin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri Ruch ve ark.,'nın belirledikleri yönteme göre yapıldı [158]. Bunun için pH=7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda 43 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra farklı konsantrasyondaki (50, 100, 250  $\mu$ g/mL) örneklerden alınarak hacimleri 3,4 mL'ye kadar tampon çözelti ile tamamlandı. Bu işlemlerden sonra 0,6 mL'lik 43 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi

ilave edildi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hidrojen peroksitin, 230 nm'deki absorbansı, hidrojen peroksit içermeyen fosfat tamponundan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak, içinde bileşiklerin bulunmadığı kalan çözelti kullanıldı. Hidrojen peroksit giderme aktivitelerini karşılaştırmak için bileşiklerle aynı konsantrasyonda standart antioksidan olarak kabul edilen askorbik asit ve BHT kullanıldı. Ölçümler 3'er kez yapılarak ortalamaları alınarak hesaplandı. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi olarak değerlendirilir. Yüzde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır;

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ giderme aktivitesi} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> = Kontrol absorbansı

A<sub>1</sub> = Numunelerin ve/veya standartların absorbansı

#### 6.3.4 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

Kullanılan bileşiklerin süperoksit radikallerini giderme aktivitesi Liu ve ark.,'nın yapmış olduğu yöntemle göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi [159]. Buna göre; çalışmada kullanılan bileşiklerin 50, 100, 250 µg/mL' ni içeren 0,1 mL DMSO' ya 1 mL nitroblue tetrazolium (NBT) (156 µM NBT, 100 mM fosfat tamponunda, pH 7,4) ve 1 mL NADH (468 µM, 100 mM fosfat tamponunda, pH 7,4) çözeltileri karıştırıldı. Reaksiyon bu karışıma 100 µL of fenazin meta sülfat (PMS) (60 µM PMS in 100 mM fosfat tamponunda, pH 7,4) eklenmesiyle başlatıldı. Oluşan reaksiyon karışımı 25 °C' de 5 dk bekletildi. Absorbanslar reaksiyon karışımında bileşiği içermeyen köre karşı 560 nm'de okundu. Ölçümler 3'er kez yapılarak ortalamaları alınarak hesaplandı. Süperoksit radikali giderme aktivitesini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olan α-tokoferol, askorbik asit ve BHT aynı konsantrasyonda kullanıldı. Azalan absorbans, artan süperoksit radikali giderme aktivitesini gösterir.

Yüzde süperoksit radikali giderme aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır:

$$\% \text{Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> = Kontrol Absorbansı

A<sub>1</sub> = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

### 6.3.5 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

Bu yöntemde enzimatik olmayan, deoksiriboz degredasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı. Kullanılan bileşiklerin hidroksil radikali (OH<sup>\*</sup>) yok etme aktiviteleri metodu bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi [160]. Reaksiyon karışımı; Farklı konsantrasyondaki DMSO' da çözülmüş örneklerden (50, 100, 250 µg/ml) 50 µL alınıp, 150 µL deoksiriboz (200 mM 5ml), 60 µL FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (20 mM 50ml), 30 µL EDTA (10mM 50ml), 150 µL (1 M 50ml) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 60 µL (500 mM 5ml) askorbik asit çözeltisinden oluşturuldu ve karışıma 2,5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH: 7,4) eklenerek son hacim 3 mL' ye tamamlanıp vorteksle iyice karıştırıldı.

37 °C' deki etüvde 1 saat bekletilen tüplerin üzerine 1 mL %10 TCA ve 1 mL %2,0 TBA eklendi. Sıcak su banyosunda 100 °C' de 15 dk bekletilen örneklerin daha sonra oda ısısına geldiğinde tampona karşı 532 nm dalga boyunda UV' de absorbansları kaydedildi. Hidroksil yakalama aktivitesini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olan α-tokoferol, askorbik asit ve BHT aynı konsantrasyonda kullanıldı.

$$\% \text{ OH radikali yok etme aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> kontrolün absorbansı, A<sub>1</sub> örneklerin absorbansı olarak alınmıştır.

### 6.3.6 *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerindeki Antioksidan Özellikler

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri kullanıldı. Aktivitenin belirlenmesi için, hücreler sıklıkla moleküler düzeyde oksidatif strese metabolizmanın cevabı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır [161, 162]. Bu hücreler sıklıkla moleküler düzeyde oksidatif strese metabolizmanın cevabı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır.

Fungi alemine dahil olan *Saccharomyces cerevisiae* tek hücreli bir mikroorganizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* askomisetik bir mayadır. Maya terimi tomurcuklanma ve enine bölünme gibi yöntemlerle aseksüel (eşeysiz) olarak üreyen, bir zigotdan veya partenogenetik olarak tek bir somatik hücreden oluşmuş serbest bir askus içerisinde askorporlar üreten, dominant olarak tek hücreli bir tollusa sahiptirler. *Saccharomyces cerevisiae* diğer mayalar gibi karbonhidratları fermente eder. Bira yapımı ve fırıncılıkta kullanılır.



Mayaların yüksek vitamin içeriği, besin olarak değerlerini artırır. Birçok *Saccharomyces cerevisiae* türü diğer vitaminler yanında özellikle B vitaminini sentezlerler *Saccharomyces cerevisiae* malt extract broth'da aşılınıp etüvde 25 °C'de inkübe edildi ve eksponensiyel fazda 10<sup>6</sup> hücre/mL alınarak deneysel çalışmalar gerçekleştirildi.

#### **6.3.6.1 *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerindeki *in vitro* Ölçümler**

MDA ölçümleri için birer deney tüpüne 2'şer ml hücre içeren çözelti konuldu. Maddeler DMSO da çözülerek belirli konsantrasyonlar da çözeltileri hazırlandı ve son derişimler 50 µM ve 100 µM olacak şekilde tüplere ilave edildi. Tüm denemeler için tüplerdeki DMSO miktarı eşit olacak şekilde ilaveler yapıldı. Kontrol grubu olarak eşit hacimde DMSO ilave edilen tüpler kullanıldı. Madde ilavesinden sonra belirli süreler beklendi. İlgili literatürlerle kıyaslanarak ml deki hücre sayısının 10<sup>6</sup> hücre/mL olmasına ve maddelerin çözünürlüğü de göz önüne alınarak dozlara karar verildi. MDA analizi için kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücrelere %15'lik trikloroasetik asitten 250µL ve 0,5 M HClO<sub>4</sub>'den 750 µL ilave edilerek çalkalandı. Hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi [163].

#### **6.4 *In vitro* Antitümör Özelliklerin Araştırılması**

Analiz aşağıda belirtilen metoda göre yapıldı.

##### **6.4.1 MCF-7 Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi**

Hücre kültür bankasından (ATCC, ABD) aldığımız donmuş haldeki MCF-7 (insan göğüs kanseri hücreleri) oda sıcaklığında çözdürülerek 75 ml flask içerisine aktarıldı. Flask'ın içerisine daha önceden hazırlanmış olan DC5 (25 ml) ilave edildi ve flasklar, Nuaire marka bir %5 CO<sub>2</sub> - %95 O<sub>2</sub> inkübatörüne (Plymouth, MN, ABD) yerleştirildi. Günlük olarak hücrelerin durumu Soif marka (Soif Optical Inc., Çin) bir inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi ve üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC5 çekilerek tazeysiyle değiştirildi. Bu işlem üç gün aralıklarla sürekli tekrar edildi. Sayıları artmaya devam eden hücreler flaskın tabanını tamamen kaplayarak üst üste tabakalar

oluşturmaya başladılar. 15. günün sonunda flasklardaki medyum çekildi ve yerine 3 ml tripsin ilave edilerek inkübatöre yerleştirildi. 2-3 dakikada bir flasklar hafifçe sallanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları sağlandı.

Tüm hücreler flaskın yüzeyinden ayrıldıktan sonra flaskların içerisine 12 ml DC5 ilave edildi ve dikkatli şekilde tritürasyon (süspansiyonun pipet içerisine çekilip boşaltılarak yapılan ayrıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılması sağlandı. Hücreler bir hemositometre kullanılarak sayıldı. Her flaska  $5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu konulup üzerlerine DC5 ilave edildi (toplam hacim 25 ml olacak şekilde) ve tüm flasklar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin ekimleri, beslenmeleri ve deneyler steril bir class II laminair flow (Biolaf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi [164,165].

#### **6.4.2 Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi**

MCF-7 göğüs kanseri hücreleri, flasklara tripsin ilave edilerek yerlerinden söküldü ve hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edildi. Tüplerdeki tripsin-medyum karışımı alınarak yerine DC5 ilave edildi ve tritürasyon ile hücrelerin tek hücre süspansiyonu haline gelmeleri sağlandı. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı MCF-7 hücre deneyleri için  $1 \times 10^6$  / ml hücreye ayarlandı. Bu şekilde dozların 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M olmasına karar verildi [166].

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarda ilave edildi. Negatif kontrol tüplerine aynı miktarda serum fizyolojik, vehicle tüplerine de aynı miktarda DMSO ilave edildi ve tüpler inkübatöre yerleştirildi. Hücre süspansiyonlarındaki DMSO miktarı %1'den fazla değildi. 24 saat sonra tüpler inkübatörden çıkarılarak tritürasyon yapıldı ve hücre süspansiyonu % 0,4 tryphan blue ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak rastgele seçilen 100 adet hücre hemositometrede sayıldı. Hücre canlılığı oranı yüzde olarak ifade edildi [167].

## 6.5 *In vivo* Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

### 6.5.1 Hayvan Materyali

Deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nden temin edildi ve aynı yerde deneysel uygulama gerçekleştirildi. Deneysel çalışmada kullanılan 6-8 haftalık ortalama 200-240 g ağırlığında Long Evans cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney süresince hiçbir nedenle denek ölümü yaşanmadı.

Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Deney süresince herhangi bir ağırlık değişimi gözlenmemiş olup hiçbir nedenle denek ölümü yaşanmadı.

Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri çizelge 6.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 6.2. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem Ham maddeleri	% Bileşimleri
Kepek	8
Arpa	14
Mısır	21
Buğday	10
Soya küspesi	25
Balık unu	8
Melas	4
E-Kemik unu	4
Tuz	4
* Vitamin Karması	1
** Mineral Karması	1

\* Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karomasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitamin ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit ihtiva etmektedir.

\*\* Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyum ihtiva etmektedir.

## 6.5.2 Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Araştırmada kullanılacak ratlar 1 kontrol, 5 uygulama grubundan oluşturuldu ve her grupta 5' er denek olmak üzere toplam 30 rat yer aldı.

İlgili literatür taramasından sonra kullanılan bileşiklerin molekül yapıları göz önüne alınarak uygulamaların kontrol ve denek grupları için 0. gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün olacak şekilde 3 gün ara ile yapılmasına karar verildi ve 30 gün uygulandı [168]. Uygun araştırma yerinde 3 günlük aralıklarla 30 gün boyunca belirli dozlarda deri altı enjeksiyon yapıldı. Bu sürenin bitiminde ratlar dekapite edilerek karaciğer, böbrek gibi dokular ve kan örnekleri alındı. Ratlardan alınan kan örnekleri pıhtılaşma olayını takiben santrifüjlenerek serum ayrıldı. Alınan kan örnekleri santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç üç gün içerisinde analizlendi. Analiz anına kadar serum örnekleri -20°C'de bekletildi. Doku örnekleri ise uygun boyutta kesilerek hazır hale getirildi.

Uygulama maddelerinin dozları literatürden faydalanılarak karşılaştırıldı ve şartlara uygun olarak 25 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde önce DMSO'da çözüldü ve DMSO miktarı % 10'un altında olacak şekilde mısır özü yağı ile seyreltildikten sonra hayvanlara deri altından uygulandı.

Kontrol gruplarına, DMSO miktarı % 10'un altında olacak şekilde yağ hazırlanarak 0,5 ml çözelti deri altına enjekte edildi. Uygulama gruplarına ise 0,5 ml çözelti içerisindeki ligand ve metal kompleksleri derişimi 25 mg/kg vücut ağırlığı dozunu ihtiva edecek şekilde hazırlanan çözeltiler deri altına enjekte edildi [169, 170].

## 6.6 Doku Örneklerinde *in vivo* Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri

Analizler aşağıda belirtilen metotlara göre yapıldı.

### 6.6.1 C Vitamini ve MDA Analizi

Yaklaşık 0,3 gr parçalanmış doku örneği üzerine 0,5 M HClO<sub>4</sub>'den 1,5 mL ilave edildi. Proteinlerin çöktürülmesinden sonra 1,5 mL saf su ilave edilerek toplam hacim 3 mL'ye tamamlandı. Karışım 4500 devirde 25 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısımdan dikkatlice alınarak viallere konuldu enjeksiyon hacmi 20 µL HPLC'de analizlendi [163, 171].

### 6.6.2 A ve E Vitamini Analizi

Parçalanmış 0,3 gr doku örneği üzerine % 1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ihtiva eden etil alkolden 4 mL ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Karışım vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 4500 devirde 25 dakika santrifüjlendi, sonra örnekler üzerine 0,3 mL n-hekzan ilave edildi. Hekzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hekzan fazına ekstrakte edilmektedir. Hekzan ilave edildikten sonra tekrar vortekste karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hekzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine tekrar 0,3 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hekzan fazı cam tüpteki hekzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hekzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalıntı 100 µL metanolde çözüldü [172]. Bu çözültiden 20 µL alınıp HPLC' ye enjekte edildi.

### 6.7 Kan Örneklerinde *in vivo* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

Analizler aşağıda belirtilen metotlara göre yapıldı.

#### 6.7.1 C Vitamini ve MDA Analizi

Serum örneğinden 0,3 ml alınıp üzerine 0,3 ml 0,5 M HClO<sub>4</sub> ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Daha sonra bu karışım vortekslendikten sonra üzerine saf su ilave edilerek toplam hacim 1 ml tamamlandı. Karışım 15 dakika santrifüjlendikten (2500 devir /dak ) sonra örneklerin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20µl alınarak HPLC'de analiz edildi. Askorbik asit ve MDA Karatepe(2004)'ye göre HPLC 'de analiz edildi [163]. Analizler hareketli faz olarak 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - metanol (% 82,5 – 17,5; pH:4) karışımında 250 nm'de inertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanılarak akış hızı ml/dk yapıldı.

#### 6.7.2 A ve E Vitamini Analizi

Derin dondurucudan alınan serum örnekleri çözünme işlemi yapıldıktan sonra 0,3 ml serum örneği üzerine %1 'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ihtiva eden etil alkolden 0,3 ml ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Karışım vortekslendikten sonra 2500 devirde 5 dakika santrifüjlendi.

Sonra örnekler üzerine 250 µl n-hegzan ilave edildi. Hegzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hegzan fazına ekstakte edildi. Hegzan ilave edildikten sonra tekrar vortekste karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hegzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine 250 µl n- hegzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hegzan fazı cam tüpteki hegzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hegzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalıntı 100 µl metanolde çözüldü [173]. HPLC'de analiz edildi. Örneklerdeki E vitamini 296 nm ve A vitamini 326 nm dalga boyunda İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu ve asetonytril: metanol: diklormetan: kloroform: hegzan (60: 10: 15: 10: 5) hareketli fazında akış hızı 1 mL/dak. olacak şekilde analizlendi [174].

## **6.8 İstatistiksel Değerlendirme**

Bu çalışmadaki istatistiksel analiz için SPSS 15.0 yazılım programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean ± SD olarak verildi. Kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıklarda  $p<0,05$ ,  $p<0,01$  ve  $p<0,001$  değerleri kullanıldı.

## 7 BULGULAR

### 7.1 *İn vitro* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

Çalışmada 5 yeni bileşiğin *in vitro* olarak *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki MDA düzeyleri ölçümü ve ayrıca, 5 farklı yöntemle (indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi) antioksidan özellikleri incelenip sonuçlar, standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol sonuçları ile karşılaştırılıp literatür ile gerekli kıyaslamalar yapıldı.

#### 7.1.1 İndirgeme Kuvveti

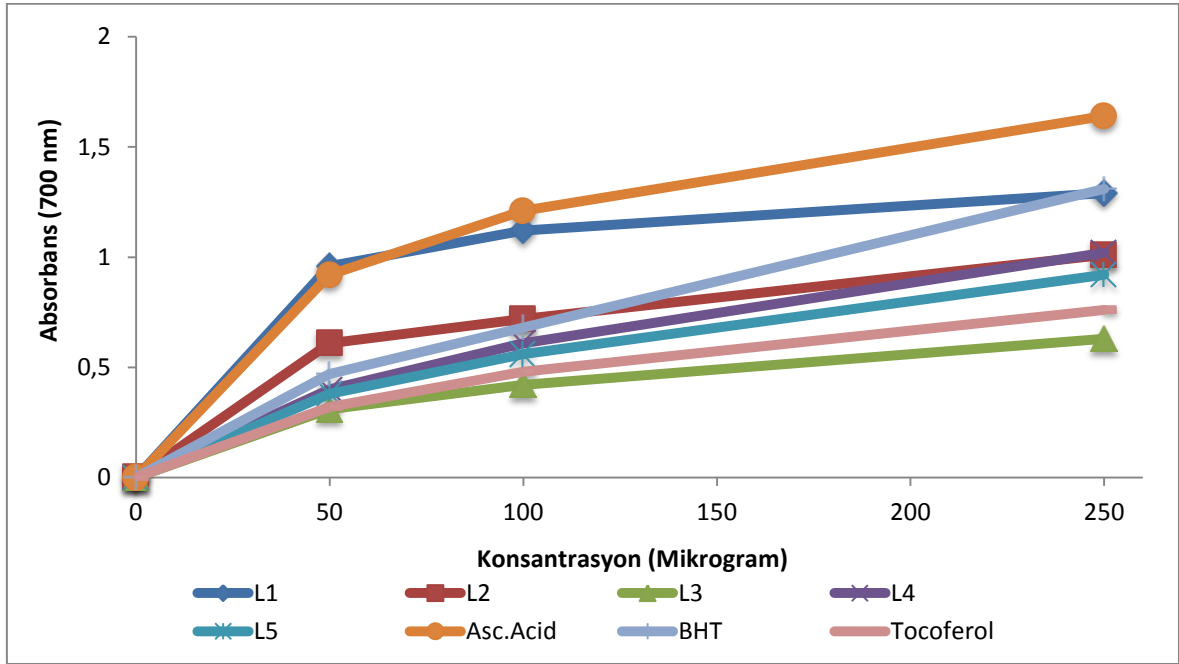
İndirgeme gücü Oyaizu metoduna göre yapılmıştır [156]. Bu metodun prensibi antioksidan bileşiklerin, kullanılan reaktifler ile oluşturduğu renkli komplekslerin UV spektrofotometresinde 700 nm'de ölçümüne dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının absorbansındaki artış numunenin indirgeme gücü ile doğru orantılıdır.

Test bileşikleri ve standart antioksidanların indirgeme kuvveti sonuçları çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

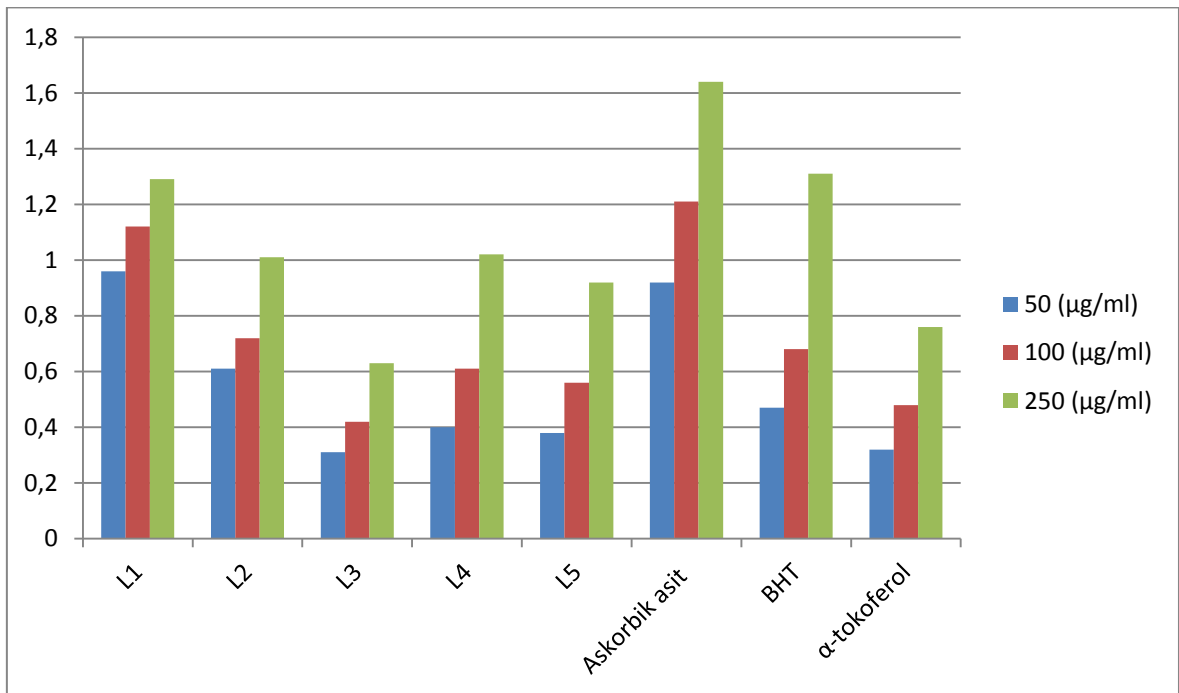
Çizelge 7.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların indirgeme kuvveti sonuçları

Test Bileşikleri	İndirgeme kuvveti		
	50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	100 ( $\mu\text{g/ml}$ )	250 ( $\mu\text{g/ml}$ )
L1	0,96	1,12	1,29
L2	0,61	0,72	1,01
L3	0,31	0,42	0,63
L4	0,4	0,61	1,02
L5	0,38	0,56	0,92
Askorbik asit	0,92	1,21	1,64
BHT	0,47	0,68	1,31
$\alpha$ -tokoferol	0,32	0,48	0,76

Bu metotta, yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kuvveti olarak değerlendirilir. Yukarıdaki çizelgeye baktığımızda her bir test bileşiğinin indirgeme kuvveti kapasitelerinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür. Bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak kendi içlerinde ve kendi aralarındaki değişen indirgeme kapasiteleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 7.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların absorbans grafikleri.



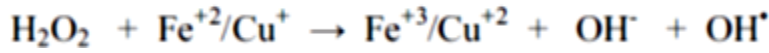
Şekil 7.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı absorbans grafikleri.



Yukarıdaki grafiklere baktığımızda indirgeme kuvveti kapasiteleri artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) indirgeme kuvveti kapasiteleri şu şekilde sıralanmaktadır; Askorbik asit > BHT > L1 > L4 > L2 > L5 > α-Tokoferol > L3.

### 7.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelat aktivitesi tayini Dinis metoduna göre yapılmıştır [157]. Fenton kimyasında da görüldüğü gibi antioksidan kapasite açısından OH<sup>•</sup> radikallerinin oluşmasına sebep olan Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+</sup> gibi metallerin tutulanmasında son derece önemlidir. Metal şelat aktivitesi tayininin prensibi, ferrozin-Fe<sup>+2</sup> kompleks oluşumunun inhibisyonuna dayanmaktadır.



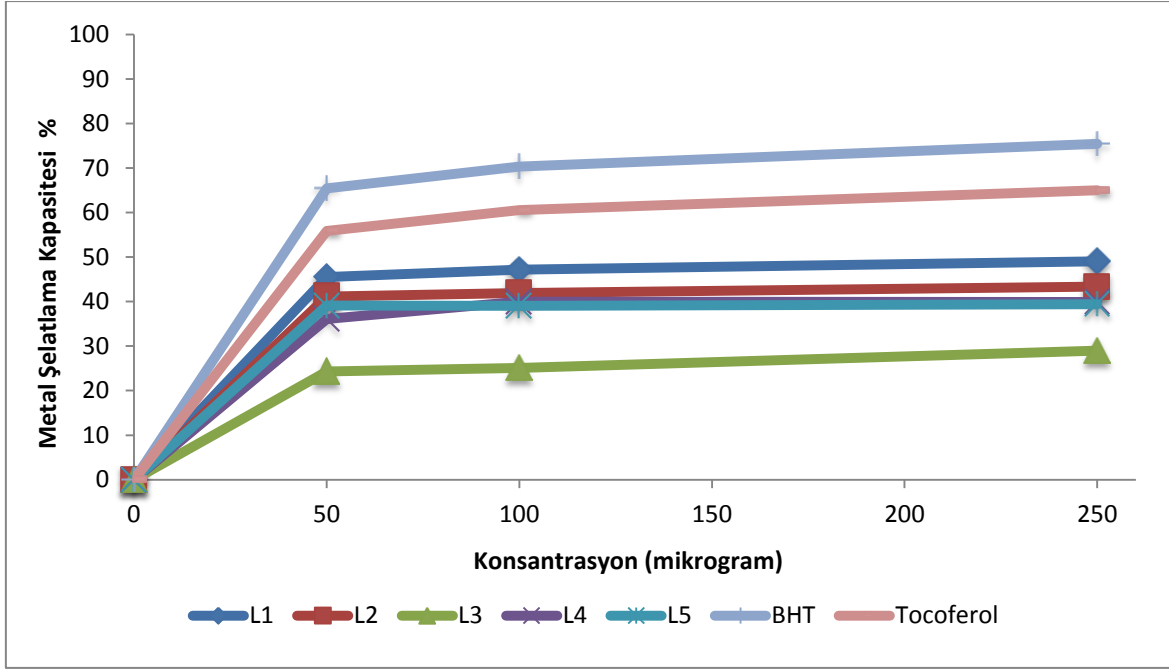
Reaksiyon karışımının 562 nm'deki absorbansındaki düşüş metal şelat aktivitesi ile doğru orantılıdır. Test bileşikleri veya standart antioksidanların varlığında ferrozin-Fe<sup>+2</sup> kompleksi, tam meydana gelmez. Bu durum kullanılan bileşiklerin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir.

Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

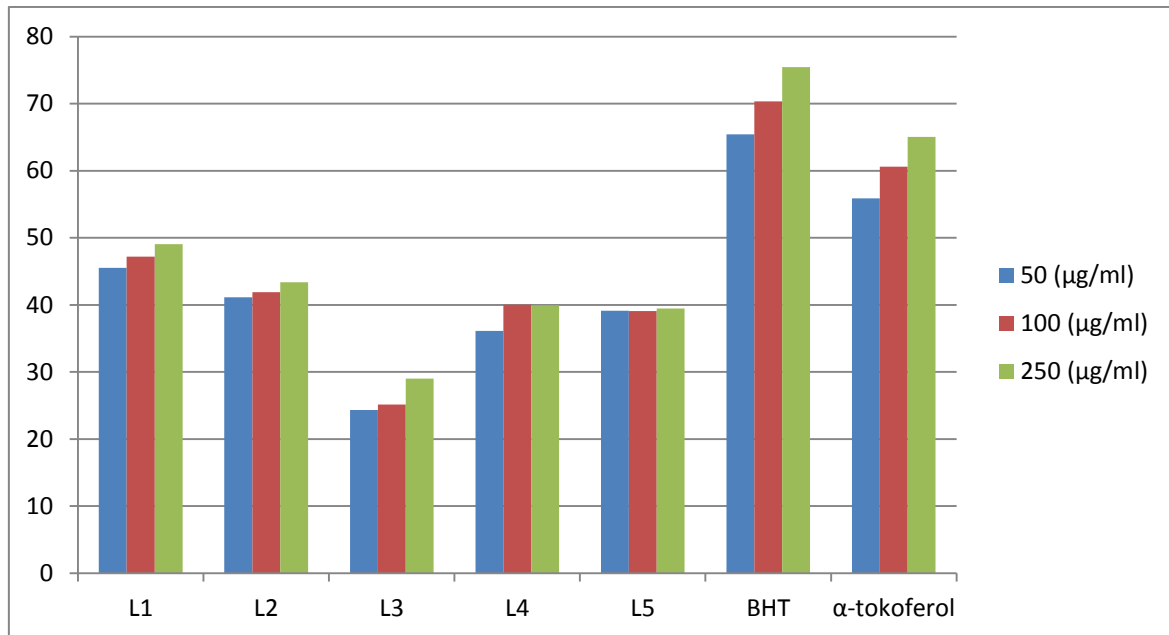
Çizelge 7.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzdeleri.

Test Bileşikleri	Metal Şelatlama Aktivitesi 50 (µg/ml)	Metal Şelatlama Aktivitesi 100 (µg/ml)	Metal Şelatlama Aktivitesi 250 (µg/ml)
L1	45,52	47,21	49,05
L2	41,14	41,9	43,39
L3	24,32	25,14	29,01
L4	36,11	40,01	39,93
L5	39,13	39,07	39,44
BHT	65,42	70,33	75,42
α-tokoferol	55,88	60,58	65,02

Bu metotta, düşük absorbans değeri hesaplama sonucunda yüksek aktivite yüzdesine karşılık gelir. Yukarıdaki çizelgeye baktığımızda her bir test bileşiğinin metal şelatlama aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. Bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak kendi içlerinde ve kendi aralarındaki değişen metal şelatlama yüzdeleri aşağıdaki şekillerde de gösterilmiştir.



Şekil 7.3. Bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzde grafiği.



Şekil 7.4. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri

Yukarıdaki grafiklere baktığımızda metal şelatlama aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) metal şelatlama aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; BHT > α –Tokoferol > L1 > L2 > L4 > L5 > L3.

### 7.1.3 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

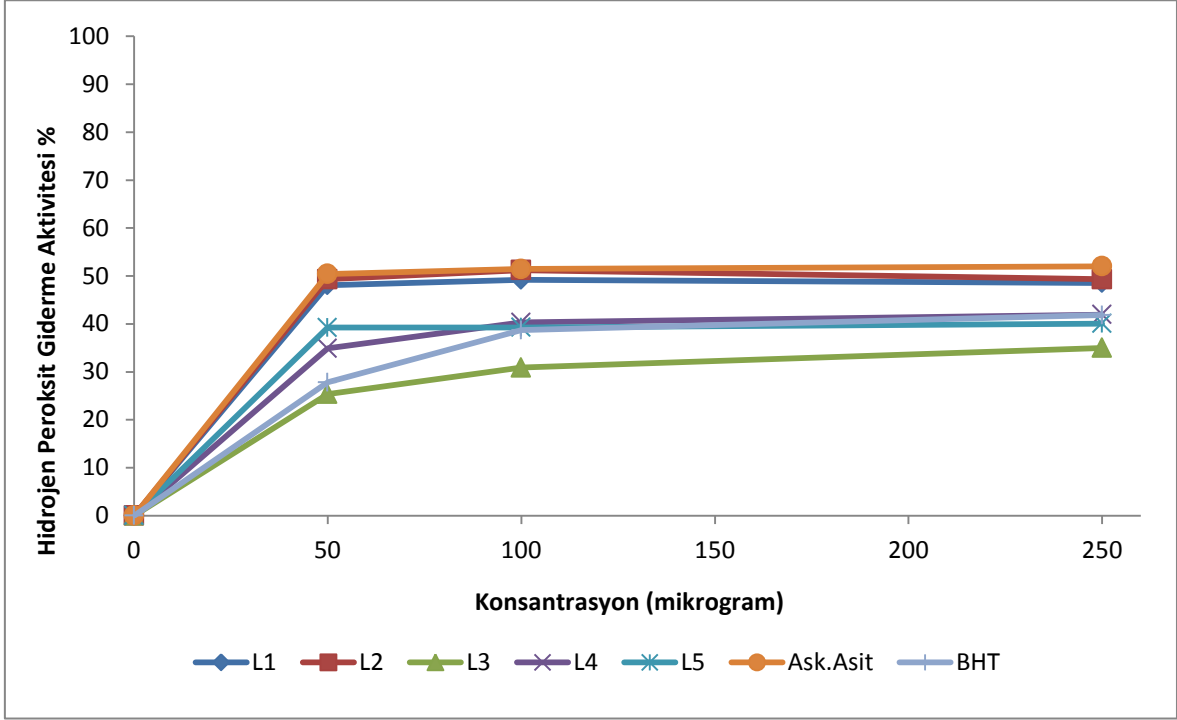
Hidrojen peroksit giderme aktiviteleri Ruch ve ark.'nın belirledikleri yöntemle yapıldı [158]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kendisi çok reaktif bir ürün olmamasına rağmen zaman zaman hücrelerin toksisitesine sebep olabilmekte ve hücrelerde hidroksil radikallerinin artmasını sağlamaktadır [39]. Bu metotta, 230 nm'deki absorbansında düşük absorbans değeri yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi olarak değerlendirilir. Özellikle Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+</sup> gibi metal iyonlarının varlığında kolayca OH'ye dönüşebilmektedir. Bu yüzden hücre ve gıda sistemlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin giderilmesi çok önemlidir.

Hidrojen peroksit giderme aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/L miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen askorbik asit ve BHT örneklerinin 230 nm'deki absorbansları alınmış ve yüzdesi hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

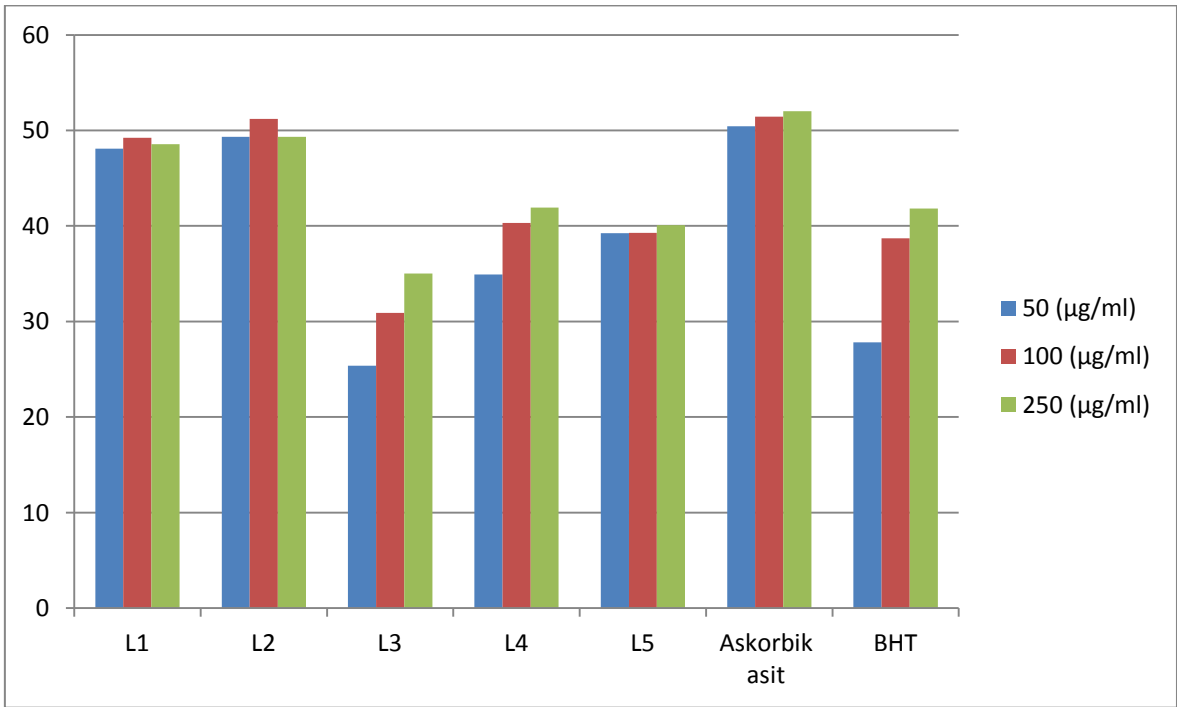
Çizelge 7.3. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme yüzdeleri.

Test Bileşikleri	Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi % 50 (µg/ml)	Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi % 100 (µg/ml)	Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi % 250 (µg/ml)
L1	48,08	49,23	48,55
L2	49,32	51,22	49,33
L3	25,38	30,91	35,01
L4	34,91	40,31	41,93
L5	39,23	39,27	40,08
Askorbik asit	50,43	51,45	52,01
BHT	27,82	38,71	41,83

Sonuçlar aşağıda belirtilen şekillerde gösterilmiştir;



Şekil 7.5. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme yüzde grafiği.



Şekil 7.6. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidrojen peroksit giderme yüzdeleri.

Yukarıdaki grafiklere baktığımızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Giderme Aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; Askorbik asit > L2 > L1> L4 > BHT > L5 > L3.

#### 7.1.4 Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

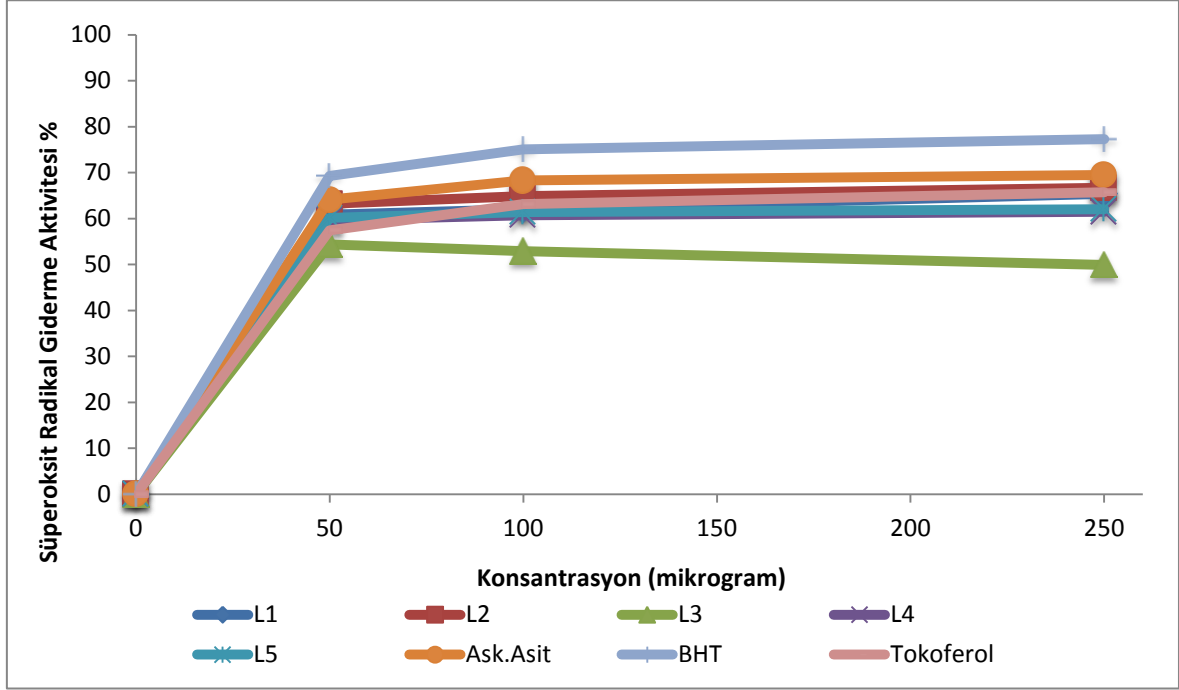
Süperoksit radikallerini giderme aktivitesi Liu ve ark.'nın yapmış olduğu yöntemle göre yapıldı [159]. Bu yöntem PMS/NADH-NBT sisteminde, PMS/NADH çifti tarafından meydana getirilen süperoksit anyonlarının NBT'yi indirgeme reaksiyonlarına dayanmaktadır. İndirgenmiş NBT ürünü ise 560 nm'de maksimum aktivite göstermektedir. Reaksiyon karışımında 560 nm'de absorbans azalması, süperoksit anyonlarının giderildiğini ve dolayısıyla antioksidan aktiviteyi gösterir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular aşağıdaki tablo ve grafiklerde sunulmuştur.

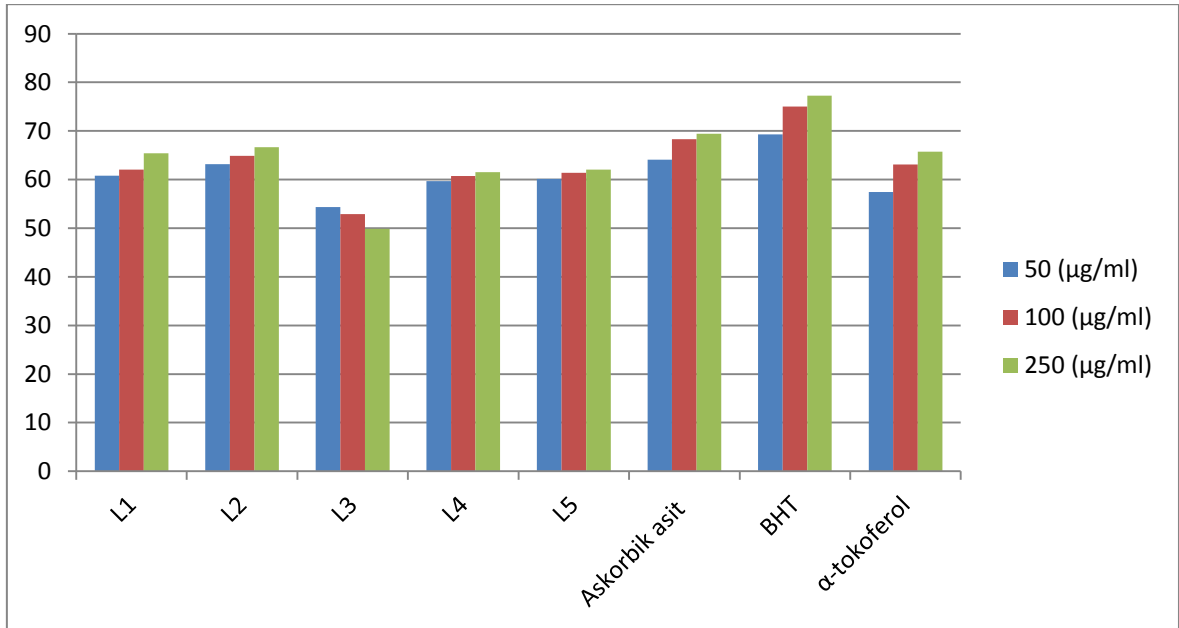
Çizelge 7.4. Test bileşikleri ve standart antioksidanların Süperoksit giderme yüzdeleri.

Test Bileşikleri	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi 50 (µg/ml)	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi 100 (µg/ml)	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi 250 (µg/ml)
L1	60,81	62,04	65,38
L2	63,18	64,85	66,69
L3	54,36	52,87	49,89
L4	59,65	60,7	61,49
L5	60,17	61,42	62,02
Askorbik asit	64,11	68,33	69,45
BHT	69,3	75,05	77,29
α-tokoferol	57,44	63,12	65,73

Sonuçlar aşağıda belirtilen şekillerde gösterilmiştir;



Şekil 7.7. Test bileşikleri ve standart antioksidanların süperoksit giderme yüzde grafiği.



Şekil 7.8. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı süperoksit giderme yüzdeleri.

Yukarıdaki grafiklere baktığımızda süperoksit radikali giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) süperoksit radikali giderme aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; BHT > Askorbik asit > L2 > α-Tokoferol > L1 > L5 > L4 > L3.

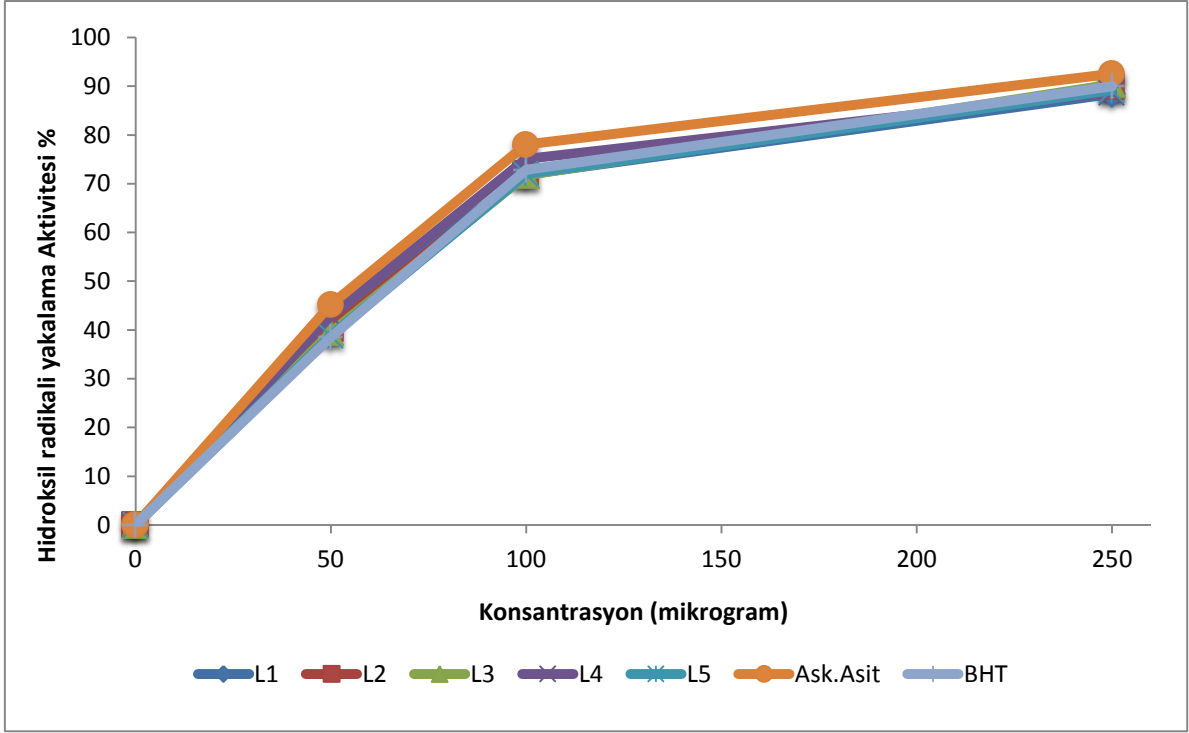
### 7.1.5 Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

Bu yöntemde enzimatik olmayan, deoksiriboz degredasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı [160]. Hidroksil yakalama aktivitesini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olan askorbik asit ve BHT aynı konsantrasyonda kullanıldı. Reaksiyon karışımında 532 nm dalga boyunda UV' de absorbansları kaydedildi.

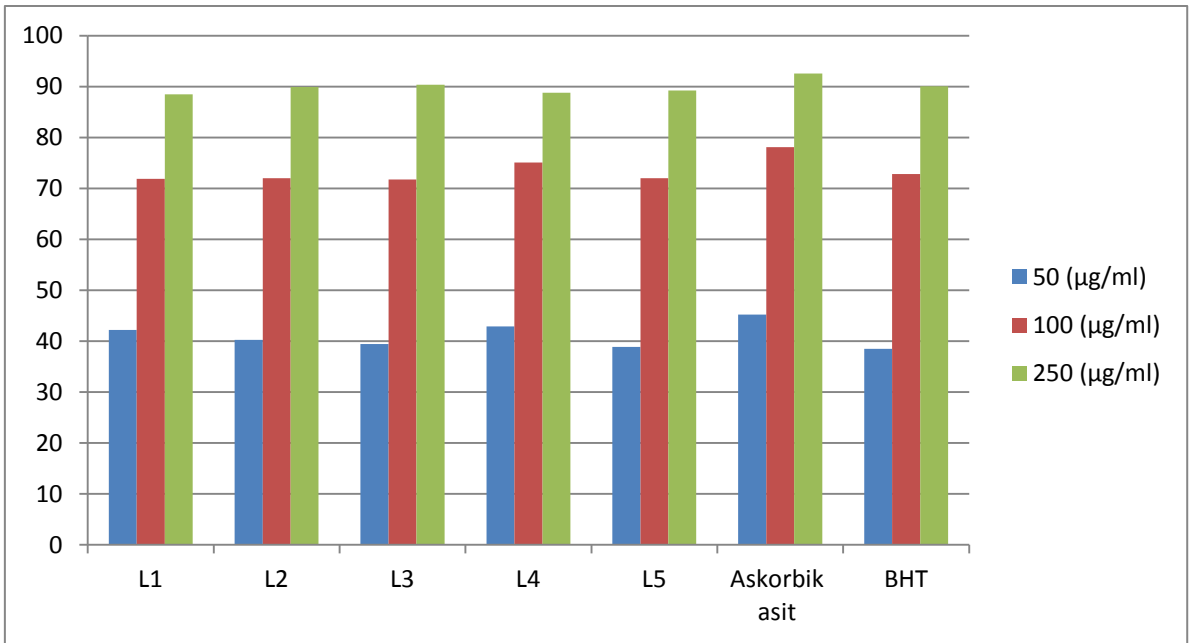
Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

Çizelge 7.5. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama yüzdeleri

Test Bileşikleri	Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi 50 (µg/ml)	Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi 100 (µg/ml)	Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi 250 (µg/ml)
L1	42,22	71,87	88,44
L2	40,28	72,01	89,93
L3	39,46	71,73	90,36
L4	42,92	75,08	88,77
L5	38,85	72,01	89,19
Askorbik asit	45,21	78,07	92,54
BHT	38,52	72,82	90,02



Şekil 7.9. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama grafiği.



Şekil 7.10. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidroksil radikali yakalama yüzdeleri.

Yukarıdaki grafiklere baktığımızda hidroksil radikali yakalama aktivitesi artan konsantrasyonla arttığı görülmüştür. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) hidroksil radikali yakalama aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; Askorbik asit > L3 > BHT > L2 > L5 > L4 > L1.



## 7.1.6 *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerindeki Antioksidan Özellikler

Bis-1,2,4-triazol içeren bileşiklerin türevleri, diğer bir yöntem olan *SAC-SER* (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerindeki antioksidan özelliklerinin incelenerek MDA düzeyleri belirlendi.

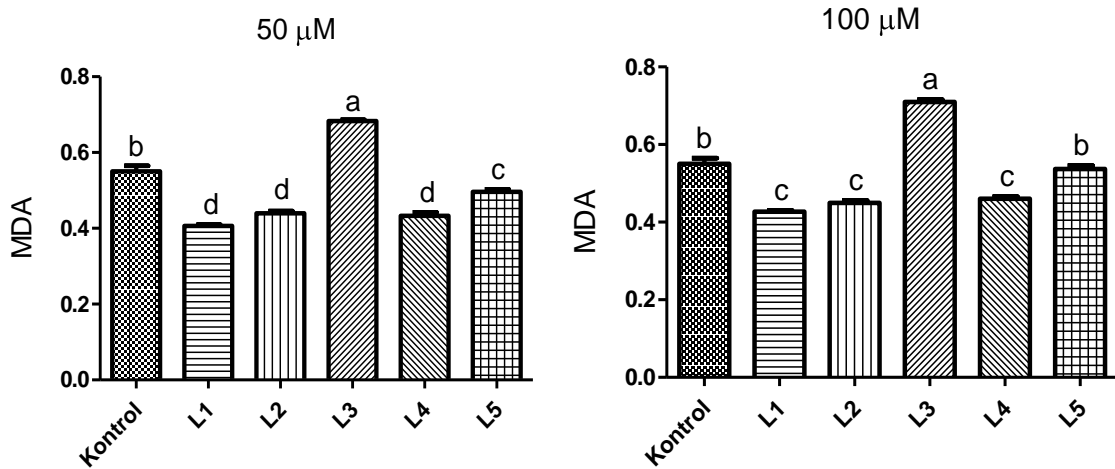
### 7.1.6.1 MDA Analizi

MDA analizi için gerekli kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücreler HPLC'de analizlendi [163]. Test maddeleriyle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeylerine ait sonuçlar çizelge ve şekillerde verilmiştir.

Çizelge 7.6. Bileşiklerle muamele sonrası *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri

Parametre	Gruplar						--P--
	Kontrol	L1	L2	L3	L4	L5	
MDA 50 $\mu$ M (mg/2.10 <sup>6</sup> hücre)	0,55±0,02 <sup>b</sup>	0,41±0,00 <sup>d</sup>	0,44±0,01 <sup>d</sup>	0,69±0,00 <sup>a</sup>	0,44±0,01 <sup>d</sup>	0,50±0,01 <sup>c</sup>	***
MDA100 $\mu$ M(mg/2.10 <sup>6</sup> hücre)	0,55±0,02 <sup>b</sup>	0,43±0,00 <sup>c</sup>	0,45±0,01 <sup>c</sup>	0,71±0,01 <sup>a</sup>	0,46±0,01 <sup>c</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>	***

a-d Aynı satırda farklı harfi taşıyan grupla arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır.  
\*P<0.05 ; \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 ; ÖD p>0.05



Şekil 7.11. Bileşiklerle muamele sonrası *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıda elde ettiğimiz sonuçlara göre L3 dışındaki tüm test maddelerimizin kontrole göre anlamlı şekilde MDA düzeyini düşürdüğü L3 maddesinin ise artırdığını belirledik. Buna göre L3 dışındaki maddelerin antioksidan etki gösterdiğini söyleyebiliriz. L1 maddesi ise en etkili antioksidan olarak görülmüştür.

## 7.2 *In vivo* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

### 7.2.1 Karaciğer Dokusundaki A, E, C Vitamini ve MDA Düzeyleri

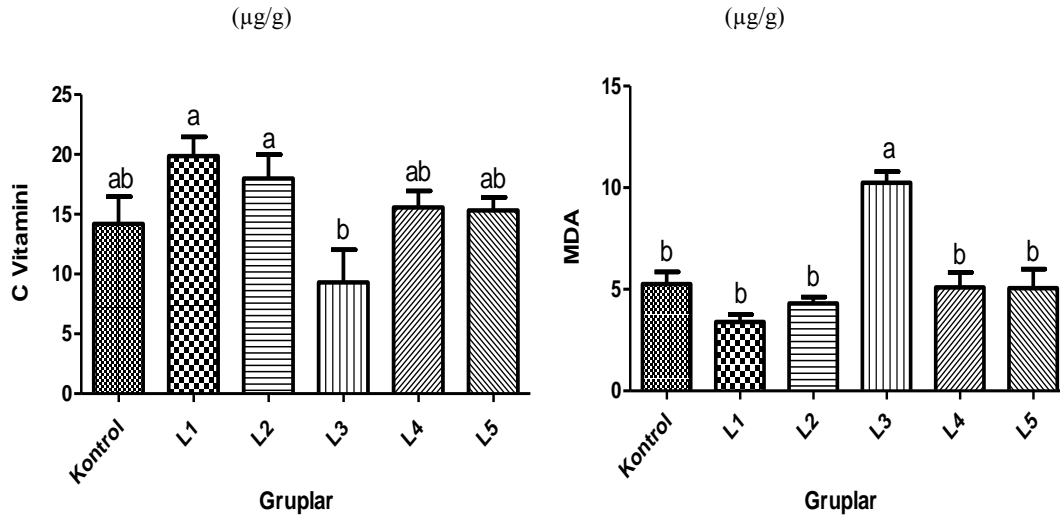
Test bileşiklerinin karaciğer dokusunda A, E, C vitamini ve MDA düzeyleri üzerine etkilerini içeren sonuçlar aşağıda çizelge ve şekillerde verilmiştir.

Çizelge 7.7. Bileşiklerle muamele sonrası karaciğer dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeyleri

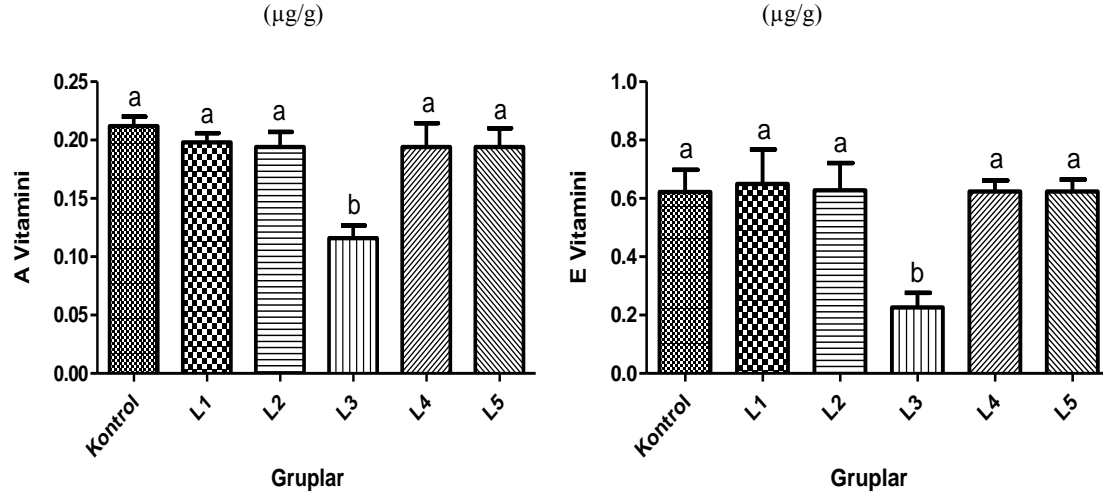
Parametre	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vitamini( $\mu\text{g/g}$ )	14,20 $\pm$ 2,27 <sup>ab</sup>	19,86 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	17,98 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	9,30 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup>	15,58 $\pm$ 1,37 <sup>ab</sup>	15,32 $\pm$ 1,08 <sup>ab</sup>	*
MDA( $\mu\text{g/g}$ )	5,26 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	3,40 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	4,30 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	10,24 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	5,10 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	5,06 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	***
A Vitamini( $\mu\text{g/g}$ )	0,21 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	***
E Vitamini( $\mu\text{g/g}$ )	0,62 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,63 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	**

a-b Aynı satırda farklı harfi taşıyan grupla arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

\*P<0.05 ; \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 ; ÖD p>0.05



Şekil 7.12. Bileşiklerle muamele sonrası karaciğer dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.



Şekil 7.12. “Devam” Bileşiklerle muamele sonrası karaciğer dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıdaki çizelge ve şekillerde gösterildiği gibi sonuçlara baktığımızda L3 bileşiğinin MDA düzeyini artırdığını, vitamin düzeylerini ise düşürdüğünü gözlemledik. Ayrıca diğer bileşiklerin ise kontrole yakın düzeyde MDA’yı düşürdüğü, vitamin düzeylerini de aynı seviyelerde koruduğunu gözlemledik.

## 7.2.2 Böbrek Dokusunda A, E, C Vitamini ve MDA Düzeyleri

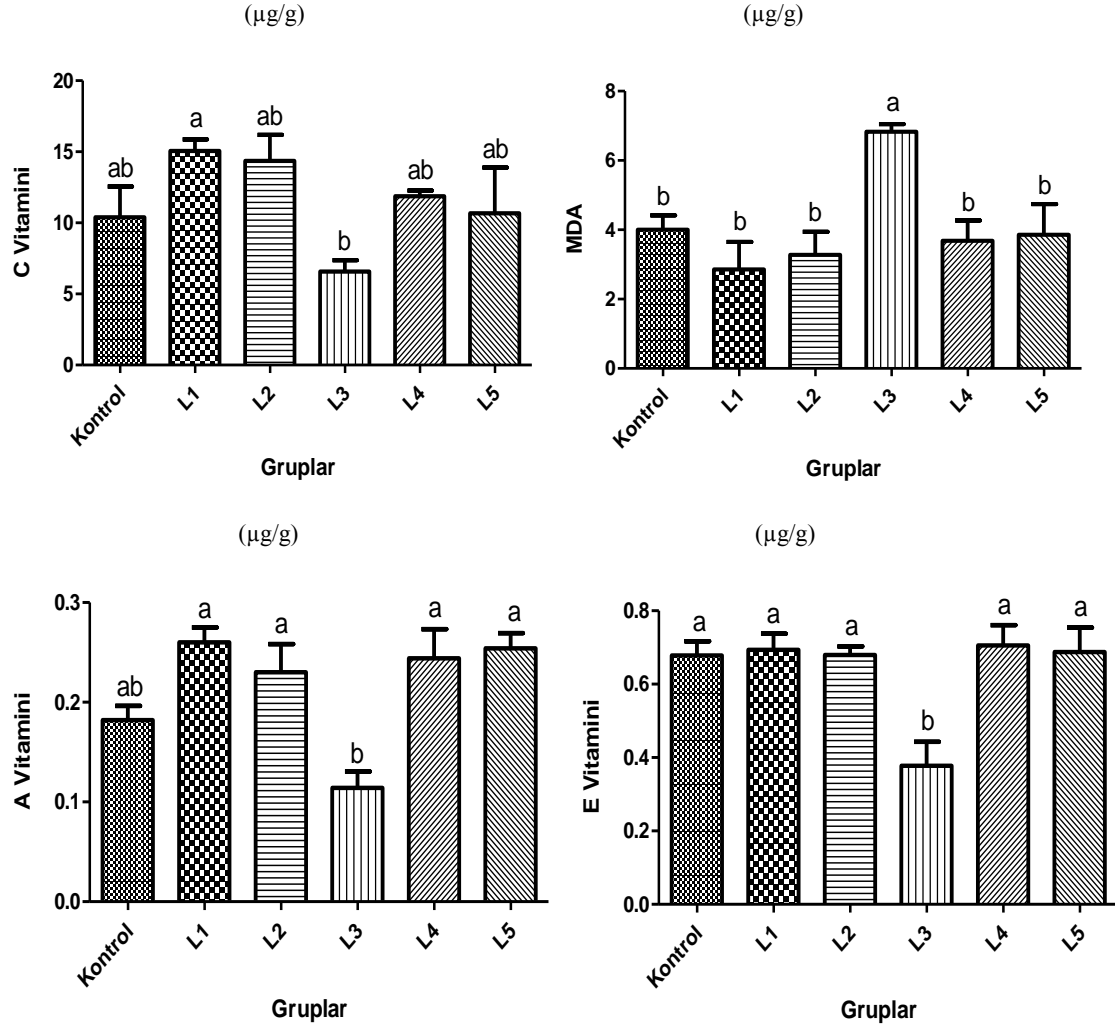
Test bileşiklerinin böbrek dokusunda A, E, C vitaminleri ve MDA düzeyleri üzerine etkilerini içeren sonuçlar aşağıda şekil ve çizelgede verilmiştir.

Çizelge 7.8. Bileşiklerle muamele sonrası böbrek dokusundaki A, E, C vitaminleri ve MDA düzeyleri

Parametre	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vit. (µg/g)	10,40±2,16 <sup>ab</sup>	15,06±0,82 <sup>a</sup>	14,36±1,84 <sup>ab</sup>	6,58±0,79 <sup>b</sup>	11,88±0,39 <sup>ab</sup>	10,68±3,22 <sup>ab</sup>	*
MDA(µg/g)	4,00±0,42 <sup>b</sup>	2,86±0,79 <sup>b</sup>	3,28±0,67 <sup>b</sup>	6,83±0,22 <sup>a</sup>	3,68±0,59 <sup>b</sup>	3,86±0,88 <sup>b</sup>	**
A Vit. (µg/g)	0,18±0,01 <sup>ab</sup>	0,26±0,02 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>	0,11±0,02 <sup>b</sup>	0,24±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	***
E Vit. (µg/g)	0,68±0,04 <sup>a</sup>	0,69±0,04 <sup>a</sup>	0,68±0,02 <sup>a</sup>	0,38±0,06 <sup>b</sup>	0,71±0,06 <sup>a</sup>	0,69±0,07 <sup>a</sup>	**

a-b Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

\*P<0.05 ; \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 ; ÖD p>0.05



Şekil 7.13. Bileşiklerle muamele sonrası böbrek dokusundaki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıdaki çizelge ve şekillerde gösterildiği gibi sonuçlara baktığımızda L3 bileşiğinin MDA düzeyini artırdığı, vitamin düzeylerini ise düşürdüğünü gözlemledik. Ayrıca diğer bileşiklerin ise kontrole yakın düzeyde MDA düzeyini düşürdüğü, vitamin düzeylerini de aynı seviyelerde koruduğunu gözlemledik.

### 7.2.3 Kan Örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA Düzeyleri

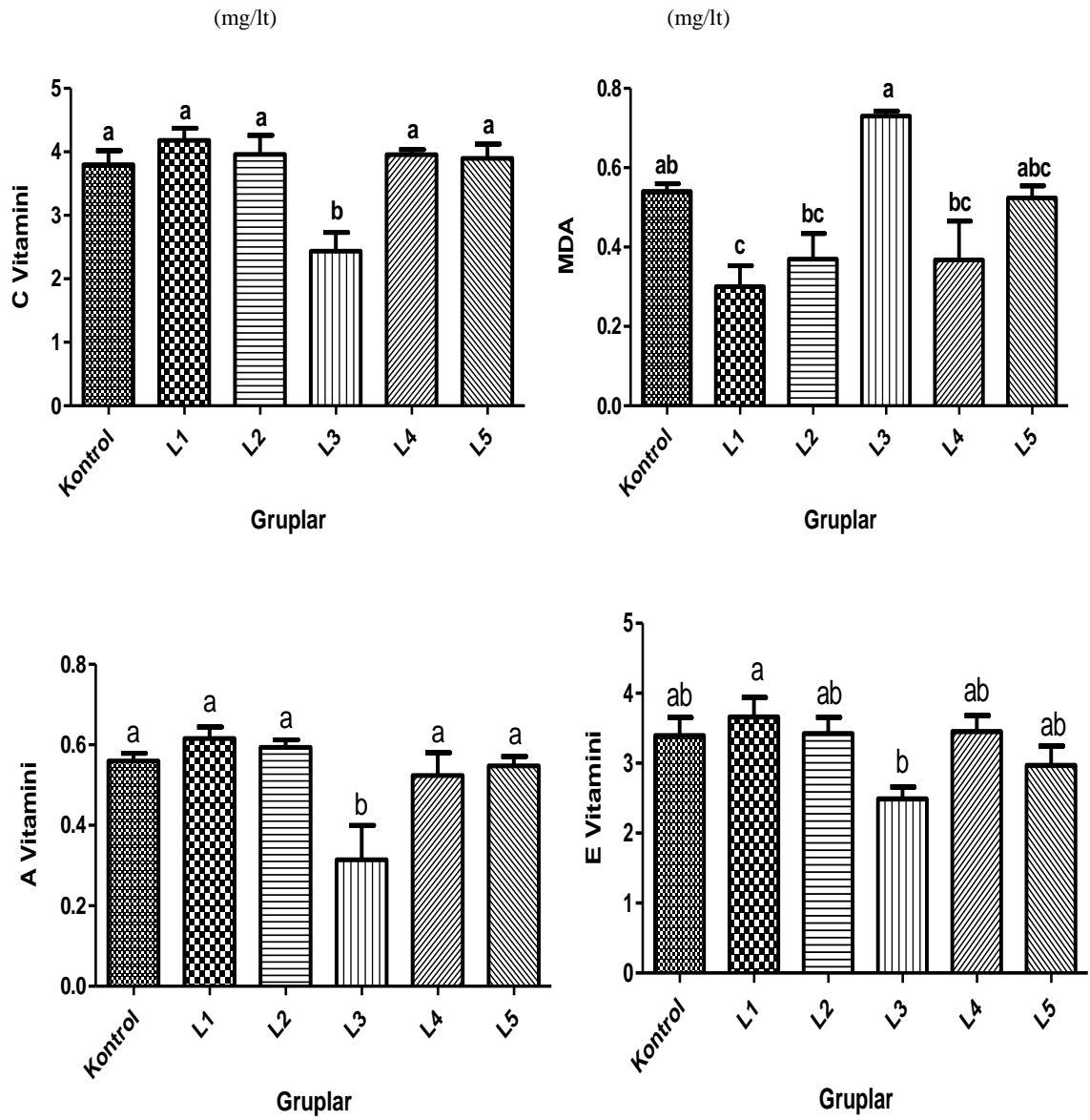
Test bileşiklerinin kan örneklerinde A, E, C vitamini ve MDA düzeyleri üzerine etkilerini içeren sonuçlar aşağıda çizelge ve şekillerde verilmiştir.

Çizelge 7.9. Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA Düzeyleri

Parametre	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vit. (mg/lt)	3,80±0,22 <sup>a</sup>	4,18±0,19 <sup>a</sup>	3,96±0,30 <sup>a</sup>	2,43±0,30 <sup>b</sup>	3,95±0,08 <sup>a</sup>	3,90±0,23 <sup>a</sup>	***
MDA (mg/lt)	0,54±0,02 <sup>ab</sup>	0,30±0,05 <sup>c</sup>	0,37±0,06 <sup>bc</sup>	0,73±0,01 <sup>a</sup>	0,37±0,10 <sup>bc</sup>	0,52±0,03 <sup>abc</sup>	***
A Vit. (mg/lt)	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,59±0,02 <sup>a</sup>	0,31±0,09 <sup>b</sup>	0,52±0,06 <sup>a</sup>	0,55±0,02 <sup>a</sup>	**
E Vit. (mg/lt)	3,39±0,26 <sup>ab</sup>	3,66±0,28 <sup>a</sup>	3,42±0,23 <sup>ab</sup>	2,49±0,17 <sup>b</sup>	3,45±0,23 <sup>ab</sup>	2,97±0,27 <sup>ab</sup>	*

a-c Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

\*P<0.05 ; \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 ; ÖD p>0.05



Şekil 7.14. Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E, C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıdaki çizelge ve şekillere bakıldığında L3 bileşiğinin diğer bileşiklere göre farklı bir mekanizma sergilediğini gözlemledik. L3 bileşiğinin vitamin düzeylerini düşürücü etkisinin olduğunu belirledik. Diğer bileşiklerin ise MDA düzeyini ve vitamin düzeylerini kontrole yakın seviyede etkilediği tespit edildi.

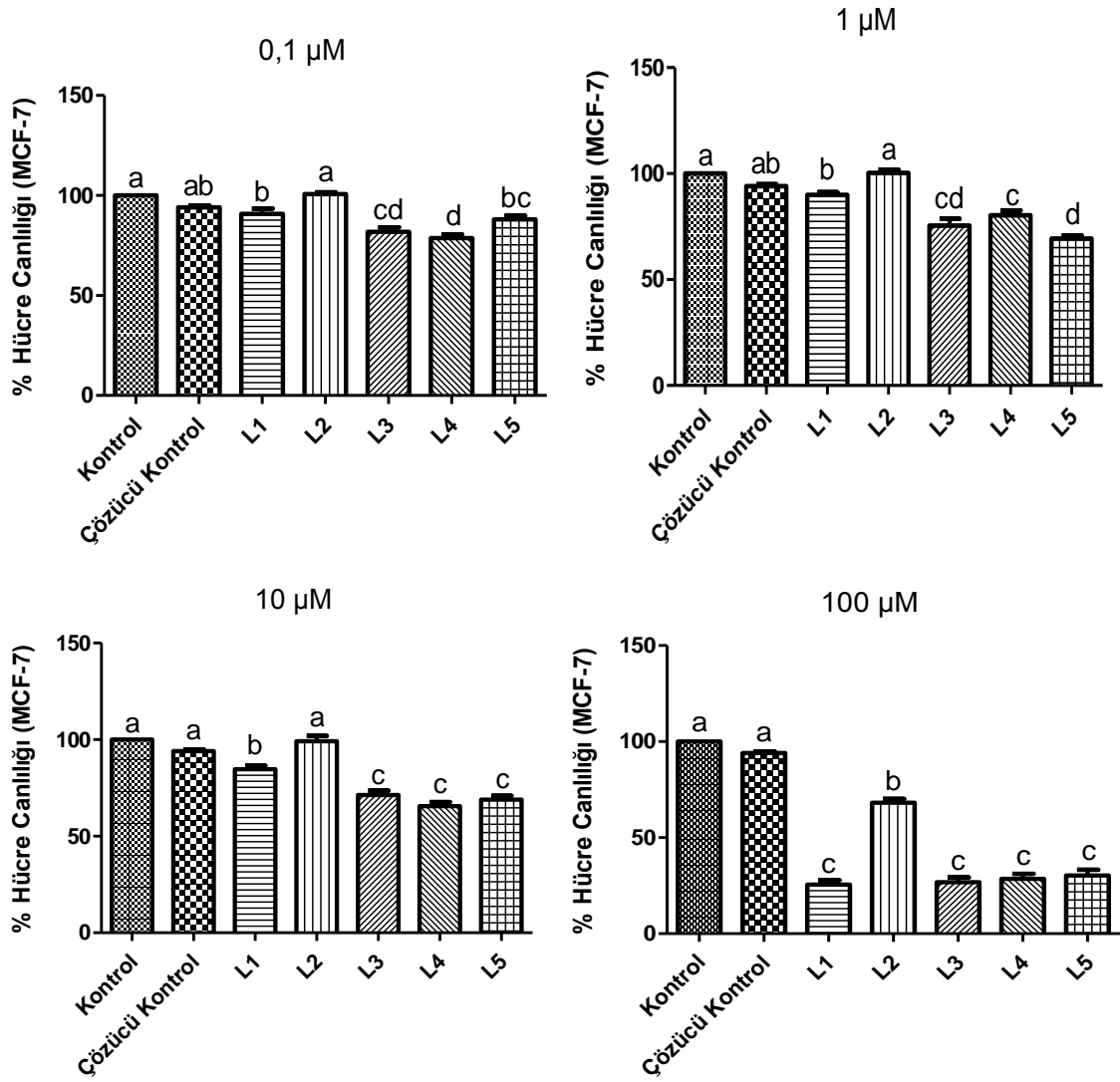
### 7.3 *In vitro* Antitümör Özelliklerin Ölçülmesi

MCF-7 (insan göğüs kanseri ) hücrelerinin test maddeleriyle muamelesi sonucu elde edilen bulgular parametrelerin her birinde uygulama boyunca grupların kontrol grubu ile kıyaslarını gösterecek çizelge ve şekil halinde verildi. Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine ait canlı hücre sonuçları çizelge 7.10.' da verilmiştir.

Çizelge 7.10. Bileşiklerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre yüzde oranında canlılık durumları

% Hücre Canlılığı (MCF-7)	Gruplar							--P--
	Kontrol	Çözücü Kontrol	L1	L2	L3	L4	L5	
0,1 µM	100±0,00 <sup>a</sup>	94,05±0,83 <sup>ab</sup>	90,84±2,58 <sup>b</sup>	100,73±0,80 <sup>a</sup>	81,87±2,25 <sup>cd</sup>	78,67±1,84 <sup>d</sup>	88,10±1,66 <sup>bc</sup>	***
1 µM	100±0,00 <sup>a</sup>	94,05±0,83 <sup>ab</sup>	89,97±1,22 <sup>b</sup>	100,32±1,54 <sup>a</sup>	75,42±3,29 <sup>cd</sup>	80,27±2,36 <sup>c</sup>	69,26±1,44 <sup>d</sup>	***
10 µM	100±0,00 <sup>a</sup>	94,05±0,83 <sup>a</sup>	84,73±1,78 <sup>b</sup>	99,23±2,75 <sup>a</sup>	71,29±2,32 <sup>c</sup>	65,54±2,20 <sup>c</sup>	68,93±2,06 <sup>c</sup>	***
100 µM	100±0,00 <sup>a</sup>	94,05±0,83 <sup>a</sup>	25,56±2,24 <sup>c</sup>	68,22±2,00 <sup>b</sup>	26,81±2,44 <sup>c</sup>	28,60±2,55 <sup>c</sup>	30,30±3,03 <sup>c</sup>	***

a-d Aynı satırda farklı harfi taşıyan grupla arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır.  
\*P<0.05 ; \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 ; ÖD p>0.05



Şekil 7.15. Maddelerle muamele sonrası MCF-7 hücrelerinin doza göre % oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri

Yukarıda elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm test maddelerimizin kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde kanserli hücreleri yok ettiğini belirledik. L2 test maddesi kontrole göre iyi sayılabilecek bir etkide olmasına karşın L1, L3, L4, L5 test maddemizin iyi anti kanserojen etki gösterdiği tespit edilmiştir.

## 8 TARTIŞMA

Biyomoleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen endojen ve eksojen antioksidanlara ilgi giderek artmakta ve organizmaya zarar vermeyen antioksidan özellikteki sentetik bileşiklerin üretimi ve biyolojik sistemlerde oksidan-antioksidan denge üzerine olan etkileri araştırılmaktadır [175, 176].

Çağımızda hareketsiz durağan yaşantı tarzı ve hazır gıdaların tüketilmesi ayrıca sürekli strese maruz kalma sonucu artış gösteren serbest radikal kaynakları oksidatif stresi de artırmaktadır. Diyabet, hipertansiyon, astım gibi birçok hastalıkla ilişkisi yapılan çalışmalarla her gün daha fazla ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROT) organizmada yol açtığı oksidatif hasarı önlemek için değişik mekanizmalarla enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar devreye girer. Ancak vitamin A, E, C, melatonin gibi doğal yollardan edinilen antioksidanlar artan ROT miktarı karşısında yetersiz kalmaktadır. Bu durum yüksek aktivite ve düşük toksisiteye sahip yeni antioksidan türlerinin sentezini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü araştırmacıları tarafından sentezlenen [155] tümü orijinal olan bileşiklerin L1(5,5'-bütan-1,4-diilbis[4-allil-2-(4-[3-(triflorometil)fenil]piperazin-1-il)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-iyon), L2(5,5'-bütan-1,4-diilbis{2-[(4-benzilpiperazin-1-il)metil]-4-allil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-iyon), L3(5,5'-bütan-1,4-diilbis[4-allil-2-(pirolidin-1-ilmetil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-iyon), L4(5,5'-bütan-1,4-diilbis{4-allil-2-[(dipropilamino)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-iyon), L5(5,5'-bütan-1,4-diilbis{4-allil-2-[(4-metilpiperidin-1-il)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-iyon) antioksidan ve antitümör etkilerinin ortaya konulmasını içermektedir.

### ***In vitro* Antioksidan Aktivite**

Çalışmamızda bis-1,2,4-triazol içeren bileşiklerin *in vitro* antioksidan aktivite tayinleri indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki antioksidan özelliklerinin incelenerek MDA düzeyleri belirlendi. Bileşiklerin farklı *in vitro* yöntemlerle antioksidan özellikleri doğal ve standart antioksidan olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen



(BHT), askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Antioksidan aktivite tayinlerinin yapılabilmesi için hazırlanan her bir ekstrenin konsantrasyonunun artması ile antioksidan kapasite arasında doğru orantı olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ekstre miktarı arttıkça ekstrelerde bulunan etken madde miktarının da artmasından kaynaklanmaktadır. Meydana gelen bu korelasyonunun sebebi maddelerin içerdiği antioksidan etkiye sahip birçok serbest radikal temizleyici gruplar olabilir. Böylece tüm in vitro veriler incelendi ve sonuçları aşağıdaki gibi değerlendirildi.

### **İndirgeme Kuvveti**

Antioksidan bileşiklerin, kullanılan reaktifler ile oluşturduğu renkli kompleksler UV spektrofotometresinde yapılan indirgeme gücü testleri sonucunda ele geçen bulgular çizelge 7.1. ve şekil 7.1. ve 7.2.' de verilmiştir. 700 nm'de yapılan ölçümlerde bileşiklerin absorbanlarının, 250  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyondaki standartlara göre askorbik asit ve BHT' den düşük olduğu ve L3 bileşiği hariç geriye kalan 4 bileşiğin  $\alpha$  -Tokoferol' den yüksek absorbansta çıkması L1, L2, L4, L5 bileşiklerin standart antioksidan olan  $\alpha$  -Tokoferol'e göre indirgeyici özelliklerinin olduğunu göstermektedir. L1 maddesinin ise 250  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda BHT' ye çok yakın çıkması ise bileşiğin iyi indirgeme özelliği sergilediğini göstermektedir. Bilindiği gibi, reaksiyon karışımının absorbanındaki artış numunenin indirgeme gücü ile doğru orantılıdır.

Çalışmada ki verilen grafiklere bakıldığında indirgeme kuvveti kapasiteleri kullanılan 50, 100, 250  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlara göre kendi içinde kıyaslanırsa artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca 50, 100, 250  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlar kendi aralarında farklı indirgeme özellikleri de göstermiştir. Örneğin, L1 bileşiğinin 50,100  $\mu\text{g/ml}$  de bütün standart antioksidanlardan daha iyi indirgeme yaptığını söyleyebiliriz. En yüksek konsantrasyona göre (250 $\mu\text{g/ml}$ ) indirgeme kuvveti kapasiteleri Askorbik asit > BHT > L1 > L4 > L2 > L5 >  $\alpha$  -Tokoferol > L3 şeklinde sıralanmaktadır. Sonuçlara bakıldığında L1 maddesinin çok iyi ve L3 maddesinin ise en düşük indirgeme gücüne sahip olduğu söylenebilir. İndirgeme kapasitesi yüksek bileşiğin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu kabul edilir. Özellikle L1 bileşiğinin en iyi aktivite gösterdiği görülmüştür.

Literatürde de elde ettiğimiz sonuçlarla uyum gösteren 1,2,4-triazol halkası içeren aminometil türevlerinin indirgeme kuvveti ile bağlantılı olarak antioksidan etkisi olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada, 3-alkil(aril)-4-(4-

benzensulfoniloksibenzilidenamino)-4,5- dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on türevlerinin iyi indirgeyici aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [177]. Başka bir çalışmada, bazı triazol halkası taşıyan aminometil bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda indirgeyici özellikleri karşılaştırılmış ve bileşiklerin standart antioksidanlardan daha düşük indirgeme kapasiteleri sergiledikleri fakat 4-nitrobenzoksi yapısını içeren 1,2,4-triazol bileşiğinin çok iyi antioksidan aktivite gösterdiği izlenmiştir [178]. Başka bir çalışmada, 10 adet CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.CH<sub>3</sub> (p-), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.OCH<sub>3</sub> (p-), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.Cl (p), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.Cl (m-), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> gruplarını taşıyan yeni 3-alkil(aril)-4-formilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiği sentezlenerek antioksidan özellikleri incelenmiştir [179]. Çalışma kapsamında bileşiklerin antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve sonuçlar, standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve α-tokoferol sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre bileşiklerin indirgeme gücünün düşük konsantrasyonlarda iyi olduğu bulunmuştur.

### **Metal Şelatlama Aktivitesi**

Antioksidan bileşiklerin, kullanılan reaktifler ile oluşturduğu kompleksler metal şelat aktivitesi tayininin prensibine göre, ferrozin-Fe<sup>+2</sup> kompleks oluşumunun inhibisyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının 562 nm'deki absorbansındaki düşüş metal şelat aktivitesi ile doğru orantılıdır. Test bileşiklerinin yapılan metal şelat aktivitesi sonucunda ele geçen bulgular çizelge 7.2. ve şekil 7.3. ve 7.4.'de verilmiştir. 562 nm'de yapılan ölçümlerde bileşiklerin absorbansları 50, 100, 250 µg/ml'lik konsantrasyonlarda BHT ve α -tokoferol standart antioksidanlarla kıyaslandı. Metal şelatlama aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. 250 µg/ml'lik konsantrasyonda BHT ve α-tokoferol standart antioksidanlara göre bileşiklerin düşük metal şelat aktivitesi gösterdiği ve L3 bileşiğinin metal şelat aktivitesinin en düşük olduğu belirlendi. L1 maddesinin ise 250 µg/ml BHT ve α -tokoferol standart antioksidanlara yakın çıkması ise bileşiğin iyi aktivite özelliği sergilediğini göstermektedir. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek metal şelatlama aktivitesi olarak değerlendirilir.

Çalışmada ki veriler grafiklere bakıldığında metal şelatlama aktivitesi kullanılan 50, 100, 250 µg/ml'lik konsantrasyonlara göre kendi içinde kıyaslanırsa artan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmüştür. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) metal şelatlama aktivitesi BHT > α -Tokoferol > L1 > L2 > L4 > L5 > L3 şeklinde

sıralanmaktadır. Sonuçlara bakıldığında L1 maddesinin iyi ve L3 maddesinin ise düşük metal şelat aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

Literatürde de triazollerin antioksidan etkilerini ortaya koymak için metal şelatlama aktivitesi çalışmaları yapılmıştır. Bir çalışmada, 3-alkil(aril)-4-formilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiği sentezlenerek antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre metal şelat aktivitelerinin yüksek olduğu bulunmuştur [179]. Başka bir çalışmada, sentezlenen yeni 1,2,4 triazol bileşiklerinin metal şelat aktivite testleri sonucunda ele geçen verilerde bileşiklerin metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları ve özellikle  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4.\text{CH}_3$  (p-), siklopropil yapıları bulunduran bileşiklerin anlamlı olarak, standart antioksidanlardan daha iyi metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir [180]. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler literatürdeki çalışmaları destekler nitelikte ve bis 1,2,4- triazol türevlerinin iyi şelatör olduklarını göstermektedir.

### **Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi**

Test bileşiklerinin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri kullanılan reaktifler ile oluşturduğu kompleksler hidrojen peroksitin 50, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ lik konsantrasyonlarda 230 nm'deki absorbansını karşılaştırmak için örneklerle aynı konsantrasyonda standart antioksidan olarak kabul edilen askorbik asit ve BHT kullanıldı. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek  $\text{H}_2\text{O}_2$  giderme aktivitesi olarak değerlendirilir. Test bileşiklerinin yapılan hidrojen peroksit giderme aktiviteleri sonucunda ele geçen bulgular çizelge 7.3. ve şekil 7.5. ve 7.6.'da verilmiştir.

Hidrojen peroksit giderme aktiviteleri artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. Örneğin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyonda L2 bileşiği askorbik asit ve BHT den yüksek hidrojen peroksit giderme aktivitesi gösterirken, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de askorbik asit daha etkili özelliكتedir. 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik konsantrasyona göre  $\text{H}_2\text{O}_2$  giderme aktivitesi Askorbik asit > L2 > L1 > L4 > BHT > L5 > L3 şeklinde sıralanmaktadır. Askorbik asit'den sonra en iyi hidrojen peroksit giderme aktivitesi L2 ve L1 maddeleri tarafından sergilenirken en düşük hidrojen peroksit giderme aktivitesi L3 bileşiği tarafından serilenmiştir. Böylece L2 ve L1 bileşiklerinin iyi derecede hidrojen peroksit giderme aktivitelerine sahip oldukları söylenebilir.

Literatürde 1,2,4, triazol bileşiklerinin hidrojen peroksit giderme aktivitesine sahip bileşikler oldukları çalışmamızda da gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, antioksidan

etkilerini değerlendirmek için hidrojen peroksit aktivitelere bakılmış ve triazol içeren bileşiklerin iyi seviyede aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir [181].

Yapılan başka bir çalışmada, triazol bileşiklerinin çeşitli türevleri incelenmiş ve iyi sayılabilecek düzeyde hidrojen peroksit giderme aktivitesi tespit edilmiştir [182].

### **Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi**

Bileşiklerin süperoksit radikallerini giderme aktivitesi test bileşiklerinin yapılan ölümlerinde 50, 100, 250 µg/mL konsantrasyonlarda 560 nm’de standart antioksidanlar olan α-tokoferol, askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Bu yönteme göre; süperoksit radikali giderme aktivitesini azalan absorbans, artan süperoksit radikali giderme aktivitesi şeklinde gösterir. Antioksidan bileşiklerin, kullanılan reaktifler ile oluşturduğu kompleksler süperoksit radikali giderme aktivitesi prensibine göre, bileşiklerin yapılan süperoksit radikali giderme aktivitesi sonucunda ele geçen bulgular izelge 7.4. ve şekil 7.7. ve 7.8.’de verilmiştir.

Süperoksit radikallerini giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. 250 µg/ml α-tokoferol, askorbik asit ve BHT standart antioksidanlara göre bileşiklerin süperoksit radikali giderme aktivitesi BHT > Askorbik asit > L2 > α – Tokoferol > L1 > L5 > L4 > L3 şeklinde sıralanmaktadır. Süperoksit radikali giderme aktivitesi ölümlerinde en iyi aktiviteyi L2 bileşiğinin gösterdiği ve L1, L5, L4 bileşiklerinin sırasıyla antioksidan standartlara yakın aktivite gösterdiği tespit edildi. Sonuçlara bakıldığında L2 maddesinin en iyi L1 maddesinin iyi ve L3 maddesinin ise düşük süperoksit radikali giderme aktivitesine sahip olduğu söylenebilir. Literatürde de 1,2,4, triazol yapısındaki bazı türevlerin süperoksit radikallerini giderme aktiviteleri tespit edilmiştir. Örneğin bir çalışmada 1,2,4, triazol türevlerinin iyi sayılabilecek seviyede süperoksit radikal giderme aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir [183].

## **Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi**

Bu yöntem enzimatik olmayan, deoksiriboz degredasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalıdır. Çizelge 7.5. ve şekil 7.9. ve 7.10.'da görüleceği üzere hidroksil yakalama kapasitesinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. 250 µg/ml askorbik asit ve BHT standart antioksidanlara göre bileşiklerin hidroksil radikali yakalama aktivitesi askorbik asit > L3 > BHT > L2 > L5 > L4 > L1 şeklinde sıralanmaktadır. Çalışmada ki maddelerin L(1-5) tamamı iyi hidroksil radikali yakalama aktivitesi sergiledi. Literatürde yapılan bir çalışmada 1,2,4, triazol içeren türevlerin iyi hidroksil radikali yakalama aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir [184].

1,2,4- triazol türevlerinin antioksidan etkilerini araştıran çalışmalar bir ya da birkaç antioksidan yöntemler birlikte kullanılarak yapılmıştır. Yukarıda tartışılan antioksidan metotların bir arada bulunduğu literatürlerde mevcuttur [185-191]. Örneğin; Bir çalışmada farklı bileşik kombinasyonlarının bir çerçevede toplanmasıyla triazol, tiyadiazol ve hidrazon türevlerin serbest radikal süpürücü aktivitelerinin incelendiği ve yeni sentezlenen bu türevlerin antioksidan aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, nitrik oksit süpürücü aktivitelerinin ve indirgeyici güçlerinin belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Çeşitli antioksidan aktiviteler bütillenmiş hidroksi toluen ve askorbik asit gibi standart antioksidanlarla kıyaslanmış ve sonuçlar tartışılmıştır. Yeni sentezlenen tüm bileşikler çeşitli derecelerde farklı aktif radikaller üzerinde süpürücü etki göstermişlerdir. Özellikle yapıları C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, H, CH<sub>3</sub>, S, Cl, Br gibi yan gruplar taşıyan bileşiklerde aktif radikaller üzerinde süpürücü etki tespit edilmiştir. Bunlar arasında fenil halkasında sırasıyla p-metoksi ve p-hidroksi grupları taşıyan bileşiklerin aktif olarak radikal türleri üzerinde en yüksek süpürme kapasitesine sahip oldukları saptanmıştır [192]. Yine bir çalışmada biyolojik özellikleri incelenen beş üyeli halkalardan 1,3,4-tiyadiazol, 1,2,4-triazol-3-tiyon ve 1,3,4-oksadiazol türevleri sentezlenmiştir. 1,3,4-tiyadiazol, 1,2,4-triazol-3-tiyon ve 1,3,4-oksadiazol türevlerinin antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösteren bileşikler oldukları saptanmıştır. Aynı çalışmada 1,2,4-triazol-3-tiyon türevli bileşiklerin önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği de ayrıca belirtilmiştir [193].

Başka bir çalışmada 1,2,4 triazol içeren bileşiklerin radikal giderme aktivitesi ve metal şelatlama aktiviteleri ölçülmüştür. Antioksidan standartlarla karşılaştırıldığında bileşiklerin anlamlı olarak çok iyi şelatör özellik gösterdikleri ve düşük konsantrasyonda

ise bileşiklerin standart antioksidanlardan BHT'ye yakın değerlerde sonuç verdiği görülmüştür. Fakat bu durumun anlamlı bir sonuç teşkil etmediği bildirilmiştir [194].

Başka bir çalışmada yeni 3-alkil(aril)-4-formilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiği sentezlenerek antioksidan özellikleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında bileşiklerin antioksidan aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), serbest radikal giderme aktivitesi, indirgeme gücü ve ferroz metal (Fe<sup>+2</sup>) şelat aktivitesi testleriyle incelenmiş ve sonuçlar, standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve  $\alpha$ - tokoferol sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre bileşiklerin indirgeme gücünün düşük konsantrasyonlarda iyi olduğu, radikal giderme aktivitelerinin düşük olduğu ve metal şelatlama aktivitelerinin ise yüksek olduğu bulunmuştur [179]. Başka bir çalışmada tiyofenil piperazin grubu içeren bileşik alfa-tokoferol olarak bilinen antioksidandan 10 kat daha güçlü, yaklaşık flunarizin antioksidan standardına eşdeğer etkinliğe sahip antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir [195].

Yapılan başka bir çalışmada yeni sentezlenen 5-[(2-(fenil)-1Hbenzimidazol-1-il)metil-4-metil-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-tiyon bileşiğinin *in vitro* antioksidan çalışmalar sonucunda iyi antioksidan özellikte olduğu bildirilmiştir [196]. Literatürde yapılan çalışmalarda antioksidan yöntemlerin farklı oluşu ve triazole halkasına bağlı grupların farklı olmaları, çalışmamızın orjinal olması yanında tek dezavantajı literatürle birebir kıyaslama yapamıyor olmamızdır. Fakat literatürde test bileşiklerimize yakın grupların olduğu bileşikler ile yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulursa bileşiklerimizin iyi antioksidan oldukları aşıkardır [197, 198]. Elde ettiğimiz veriler literatür ışığında değerlendirildi. İyi antioksidan özellikler sergileyen L1, L2 bileşiklerinin bu özelliklerinin sırasıyla yapılarında ki allil, triflorometil ve benzil piperazin kaynaklı olabileceği ve özellikle piperazin sekonder aminli bis 1,2,4 triazol türevi L1 ve L2 bileşiklerin iyi birer antioksidan olabilecekleri düşünülebilir. Standart antioksidanlara göre L4 ve L5 bileşikleri L1, L2 bileşikleri kadar antioksidan özellik göstermediler, fakat standart antioksidanlara yakın değerlerde olmaları bileşiklerin antioksidan etkilerinin iyi sayılabilecek bir düzeyde olduğunu gösterebilir. Hidroksil yakalama aktivitesi dışında L3 bileşiğinin diğer tüm yöntemlerde standart antioksidanların aktivitelerine göre çok düşük düzeylerde kaldığı görülmüştür. Sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde L1, L2 iyi derecede antioksidan özellikler sergilerken, L3 bileşiğinin diğer bileşiklere göre antioksidan aktivitesinin düşük olduğunu söyleyebiliriz.

### ***Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri MDA Sonuçları**

Maddeler gerekli işlemler sonrasında fungi alemine dahil olan *Saccharomyces cerevisiae* tek hücreli maya hücreleriyle muamele edildi. Bu hücreler sıklıkla moleküler düzeyde oksidatif strese metabolizmanın cevabı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır. MDA analizi için kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat santrifüjlendikten sonra berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi. *Saccharomyces cerevisiae* örneklerindeki ölçümlerinden elde ettiğimiz sonuçlar çizelge 7.6. ve şekil 7.11.' de gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre L3 bileşiğinin dışındaki tüm test maddelerimizin kontrole göre anlamlı şekilde MDA derişimini azalttığı L3 bileşiğinin ise artırdığını belirledik. Bu sonuç kullanılmış olan L3 bileşiğinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. Buna göre L3 dışındaki maddelerin antioksidan etki gösterdiğini söyleyebiliriz. L1 maddesi ise en etkili antioksidan olarak görülmüştür.

50 µM ve 100 µM konsantrasyonda istatistiksel açıdan L1, L2, L4 maddeleri MDA derişimini kontrole göre (P<0.001) anlamlı olarak düşürürken 50 µM konsantrasyonda L5 maddesinin de MDA derişimini kontrole göre (P<0.001) anlamlı olarak düşürdüğü tespit edildi. L3 maddesinin her iki konsantrasyonda da kontrole göre MDA değerini anlamlı şekilde arttırdığı ve diğer test maddeleriyle de anlamlı farklılık gösterdiği söylenebilir. Lipid peroksidasyonu hakkında yapılan çalışmalar sonuçlarımızı destekler yöndedir. Örneğin; Bir çalışmada iki tür difenil alkil piperazin türevi bileşik oksidatif hasar sonrası oluşan lipid peroksidasyonuna karşı inhibe edici aktiviteleri bildirilmiştir [184]. Başka bir çalışmada 1,2,4 triazol türevli bileşiklerin MDA düzeyini azalttığı belirlenmiştir [199].

### ***İn vitro* Antitümör Aktivite**

Bu çalışmada, *in vitro* olarak MCF-7 hücrelerine uygulanan bazı bis 1,2,4 triazol türevi bileşiklerin, antitümör aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı etkilere sahip olduğu görülmüştür. Test maddeleriyle muamele edilmiş MCF-7 (insan meme kanseri ) hücrelerinin MDA düzeylerine ait elde ettiğimiz sonuçlar çizelge 7.10. ve şekil 7.15.' de verilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm test maddelerimizin kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde kanserli hücreleri yok ettiğini belirledik. Bu çalışmada ölçülen parametreler ve deney süresince ölü hücre sayısına bakıldığında L1, L3, L4, L5 test

maddemizin antitümör aktivite göstermiş olduğu söylenebilir. L2 test bileşiği ise canlı kanser hücrelerini çok fazla öldürmemiş ve kontrole yakın değerlerde sonuç vermiştir.

Çalışmada, farklı dört konsantrasyon (0,1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM) üzerinden yürütüldü. Tüm konsantrasyonlarda L1, L3, L4, L5 test bileşiklerinin istatistiksel açıdan anlamlı (P<0.001) şekilde kanserli hücreleri yok ettikleri ve kontrole göre yüzde canlılığı düşürdüklerini tespit ettik.

Çalışmada, 0,1 µM konsantrasyonda MCF-7 kanser hücre canlılığını en çok azaltan L4 bileşiği olmuştur. L4 bileşiğinin kanserli hücreleri yok ettiği ve kontrole göre yüzde canlılığı (P<0.001) düşürdüğünü tespit ettik. Bunun yanında L5, L3, L1 maddelerinin de kontrole göre anlamlı şekilde antikanser özelliğe oldukları söylenebilir. 1 µM konsantrasyonda L5 bileşiğinin en düşük yüzde MCF-7 kanser hücre canlılığı göze çarpmaktadır. İstatistiksel açıdan en anlamlı şekilde kanserli hücreleri yok ettiği ve kontrole göre yüzde canlılığı (P<0.001) düşürdüğünü tespit ettik. Bunun yanında L4, L3, L1 maddelerinin de kontrole göre anlamlı şekilde antikanser özelliğe oldukları (P<0.001) belirlendi. 10 µM konsantrasyonda L3, L4, L5 maddelerinin en düşük yüzde MCF-7 kanser hücre canlılığı tespit edildi. İstatistiksel açıdan en anlamlı şekilde kanserli hücreleri yok ettikleri ve kontrole göre yüzde canlılığı anlamlı şekilde (P<0.001) düşürdüklerini gözlemledik. Bunun yanında L1 maddesinin de kontrole göre anlamlı şekilde antikanser özelliğe olduğu (P<0.001) belirlendi. 100 µM konsantrasyonda L1, L3, L4, L5 maddelerinin en düşük yüzde MCF-7 kanser hücre canlılığı tespit edildi. İstatistiksel açıdan en anlamlı şekilde kanserli hücreleri yok ettikleri ve kontrole göre yüzde canlılığı anlamlı şekilde (P<0.001) düşürdüklerini gözlemledik. Bu konsantrasyonda L2 bileşiğinin de kontrole göre anlamlı (P<0.001) şekilde antikanser özelliğe olduğu tespit edildi. L2 maddesinin artan konsantrasyona göre antikanser özelliğinin de arttığı bu konsantrasyonda ön plana çıkmıştır. L2 bileşiğinin kontrole en yakın değerde olduğu ve diğer maddeler kadar olmasa bile kontrole göre hücre canlılığını düşürdüğü görülmüştür. Elde edilen verilere göre bileşiklerin artan konsantrasyonlarının kanserli hücreleri yok etme kapasitelerini de arttırdığı söylenebilir.

Literatürde sonuçlarımızı destekleyen 1,2,4 triazol halkalı türevlerin antitümör etkisinin gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda 4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on halkasına sahip bu tip heterohalkalı bileşiklerin biyolojik aktivite incelemeleri yanında antitümör ve antioksidan özellik gösterdikleri bilinmektedir [200-203]. Kullanılan 2-(4-(2-(dimetilamino)etil)-4H-1,2,4-triazol-3) piridin türevleri normal hücrelerin (WI-38)



yanı sıra beş kanser hücre tipine (MKN-45, H460, HT-29, A549 ve U87MG) karşı *in vitro* sitotoksik etki göstererek güzel sonuçlar elde edildiği söylenmektedir. Ayrıca bileşiklerin tamamına yakın kısmının MKN-45, H460 ve HT-29 hücrelerinde daha iyi bir seçicilik ile üstün aktivite sergiledikleri görülmüştür [204].

HCT-116, U-87-MG ve MCF-7 insan kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerin incelendiği bir çalışmada, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi kullanılarak triazol türevi bileşiklerin güçlü anti-kanser oldukları bildirilmiştir. Araştırmacılar 1,2,4-triazol piridin halkası içeren bileşiklerin *in vitro* aktiviteleri sonucu antiproliferatif olarak değerlendirildiği ve güçlü anti-kanser ajanlar olduğunu belirtmişlerdir [205].

Başka bir çalışmada 6,7,8,9-tetrahidro-5H-[1, 2, 4]-triazol[1,5,-a]- azepin-2-il)benzil]indol bileşiğinin insan tümör hücresine karşı antikanser aktivitesi değerlendirildi ve kanser hücrelerine karşı etkileri tespit edilmiştir [206]. Ayrıca 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)-4-fenil-4H-1,2,4-triazol bileşiğinin HEPG2 kanser hücrelerine karşı önemli bir anti-tümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [207].

Yapılan bir çalışmada sentezlenen bir seri 3-(2,4-dikloro-5-florofenil)-6-(süstitüe fenil) -1,2,4-triazol [3,4-b]-1,3,4-tiyadiazin bileşiğinin antitümör aktivitesi incelemiştir. Bileşiğin *in vitro* olarak altmış kanser türü paneli karşısında kanserli hücrelerin büyüüp çoğalmasını engelleyen güzel sonuçlar sergilediği bildirilmiştir [208].

4-arilmetilenamin-4H-1,2,4-triazollerin bazılarının insan kanser hücrelerine karşı kayda değer anti-kanser aktiviteleri tespit edilmiştir [209].

### ***In vivo* Antioksidan Aktivite**

Bileşiklerin *in vivo* biyolojik özellikleri Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen ratlara, uygun araştırma yerinde belirli dozlarda deri altı enjeksiyon yapıldı. Bu sürenin bitiminde ratlar dekapite edildi ve karaciğer, böbrek dokuları ve kan örnekleri alındı. Ratlardan alınan kan ve doku örnekleri gerekli kimyasal işlemlerden geçirilerek elde edilen materyaller HPLC'de analizlenerek antioksidan vitaminler (A,E,C), ve lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarları ölçülerek biyolojik aktiviteleri değerlendirildi. Test bileşiklerinin karaciğer dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri çizelge 7.7. ve şekil 7.12.'de verilmiştir.

Doku örneklerindeki analizler sonucu karaciğer dokusunun C vitamini açısından kontrol grubu ile kıyaslanmasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0,05$ ) sonuçlar elde edildi. Kontrol grubu ile maddeler arasında istatistiksel olarak fark gözlenmezken matematiksel değer olarak farklılıklar gözlemlendi. L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre C vitamini derişimini azalttığı tespit edildi. Diğer test maddelerinin uygulandığı gruplarda ise kontrole yakın C vitamini seviyelerinin olduğunu belirlendi. Karaciğer dokusunda MDA sonuçları ise kontrol grubuna göre L3 maddesinin MDA düzeyini anlamlı şekilde artırdığı görüldü. Bu sonuç kullanılmış olan L3 maddesinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. Çalışmada L3 bileşiğinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MDA düzeyini arttırdığını belirledik. L1, L2, L4, L5 maddelerinin sayısal değer olarak kontrole göre MDA düzeyini düşürdüğü de söylenebilir.

Karaciğer dokusunda vitamin A değerlerine bakıldığında, istatistiksel olarak ( $P<0,001$ ) L3 maddesinin kontrole kıyasla anlamlı şekilde vitamin A düzeyini azalttığı görülmüştür. L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin ise kontrol ve kendi aralarında anlamlı bir farklılanmanın olmadığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusu vitamin E değerleri ise istatistiksel olarak ( $P<0.01$ ) L3 maddesinin kontrole kıyasla anlamlı şekilde vitamin E düzeyini düşürdüğü, L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin ise kontrol ve kendi aralarında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Test bileşiklerinin böbrek dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri çizelge 7.8. ve şekil 7.11.' de verilmiştir. Analizler sonucu böbrek dokusunun C vitamini açısından maddelerin kontrol grubu ile kıyaslanmasında istatistiksel olarak anlamlı farklı olmadığı tespit edildi. Sayısal olarak L3 maddesi kontrol grubuna kıyasla C vitamini düzeyinin düşmesi şeklinde gözlemlendi. Böbrek dokusunda kontrol grubuna göre L3 maddesinin MDA düzeyini anlamlı ( $P<0,01$ ) şekilde artırdığı görüldü. Ayrıca L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin kontrole göre MDA düzeylerini düşürdüğü de söylenebilir.

Böbrek dokusu vitamin A değerleri, bileşikler ve kontrol arasında istatistiksel olarak ( $P<0,001$ ) anlamlı bir fark görülmedi. Sayısal olarak L3 maddesinin kontrole kıyasla vitamin A değerini düşürdüğü söyleyebiliriz. Ayrıca, L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin ise kontrole göre anlamlı fark olmamasına karşın L3 maddesi ile aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. Böbrek dokusu vitamin E değerlerine bakıldığında, L3 maddesinin kontrole kıyasla anlamlı şekilde istatistiksel olarak ( $P<0.01$ ) vitamin E

düzeyini azalttığı, L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin ise kontrole göre ve kendi aralarında anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Test Bileşiklerinin serum örneklerinde A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri çizelge 7.9. ve şekil 7.14.'de verilmiştir. Serum örneklerinde C vitamini açısından kontrol grubu ile maddelerimiz arasında sadece L3 bileşiğine ait grubun sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0.001$ ) olduğu ve serum vitamin C düzeyini azalttığını tespit ettik. L1, L2, L4, L5 maddelerinin ise kontrole göre anlamlı fark olmamasına karşın L3 maddesi ile aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. Serum MDA sonuçları ise L1 bileşiğinin kontrole kıyasla ( $P<0.001$ ) MDA düzeyini düşürdüğünü ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliğe sahip olabileceği tespit edildi. Ayrıca L2, L4, L5 bileşiklerinin de istatistik olarak anlamlı olmasa da MDA düzeyini düşürdüğünü belirledik. L3 bileşiğinin MDA değerini kontrole kıyasla sayısal olarak arttırdığı görüldü.

Serum vitamin A değerlerinin kontrole göre istatistik olarak anlamlı çıkmadığı fakat L3 bileşiğinin vitamin A düzeyini sayısal olarak azalttığını belirledik. Serum vitamin E değerinde kontrolle kıyaslanan L3 bileşiğinin vitamin değerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğünü tespit ettik. L1, L2, L4, L5 bileşiklerinin verilerinin kontrole yakın değerlerde olduğunu tespit ettik.

Deney sonuçlarına göre test bileşiklerimizden L3 bileşiğinin uygulandığı grupta MDA düzeyinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Ayrıca L3 bileşiğinin vitamin düzeylerini azalttığı da tespit edildi. Diğer test gruplarında ise genel olarak kontrole göre MDA düzeyini azaltıcı bir aktivite gözlemlendi. Serum örneklerinde özellikle L1 grubunda MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Diğer bileşiklerde de vitaminler açısından kontrolle yakın düzeyler tespit edildi.

Literatür de 1,2,4 triazol yapılarının bizim kullandığımız *in vivo* metotlarına sıkça rastlanmamaktadır. Yapılan bir çalışmada köpek beyin homojenatlarında iki tür difenil allkil piperazin türevi bileşik oksidatif hasar sonrası oluşan lipid peroksidasyonuna karşı inhibe edici aktiviteleri bildirilmiştir [184]. Elde edilen verilere göre L3 bileşiğinin dokuda MDA' yı arttırıcı etki oluşturduğu buna bağlı olarak da vitaminlerin azaldığı söylenebilir. Diğer test bileşiklerinin de tam tersi etki göstererek MDA'yı düşürdükleri ve buna bağlı olarak vitaminlerin kullanımını azaltarak kontrole yakın veya biraz yüksek değerlerde çıktığı söylenebilir.

## 9 SONUÇ

Sağlık bilimleri alanında iddialı olan gelecekte birçok yeni biyolojik profilleri eklenecek ve daha fazla araştırma konusu olacağına inandığımız 1,2,4- triazol bileşiklerinin birçok hastalığın tedavisi için ilaç olarak raflarda yerini alacağı ve yapılan güncel bilimsel çalışmalarda keşfedilen birçok hastalığa ve patolojik durumlara karşı bu türevlerin ilaçların gelecekteki gelişimi için önem arzedeceği söylenmektedir [210] .

Bileşiklerin sahip oldukları antitümör aktivite ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde MDA düzeyleri üzerine olan etkilerine bakıldığında, bileşiklerin hücrelerin canlılık durumuna etkisi ile MDA düzeyleri arasında bir ilişki kurulabilir. Çalışmamızda antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin MDA değerlerini azaltması da dikkat çekicidir.

Çalışmamız sonucu elde edilen veriler bis-1,2,4-triazol içeren aminometil türevlerinin antioksidan ve antitümör özellikte olduklarını destekler niteliktedir. Kullandığımız yapılardan L3 ile kodladığımız 5,5'-bütan-1,4-diilbis[4-allil-2-(pirolidin-1-ilettil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon bileşiği antitümör özellikte olmasına rağmen diğer 4 bileşik kadar antioksidan özellik gösterememiştir. L3 bileşiğinin *in vivo* antitümör ajan olarak kullanımı halinde etki mekanizması yönünden lipid peroksidasyonunu artırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. L1 test bileşiğinin antioksidan ve antitümör olarak güzel sonuçlar sergilediği ve bağlantılı mekanizmalar ile yürüdükleri ayrıca söylenebilir. Ayrıca diğer test bileşiklerinin antioksidan ve antitümör olarak L1 maddesi kadar olmasa bile kayda değer sonuçlar verdiği görülmüştür. İyi düzeyde antioksidan özellikler sergileyen L1, L2 bileşiklerinin sırasıyla yapılarında taşıdıkları allil, triflorometil ve benzil piperazin grupları dikkat çekicidir. Bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatüre ve ilaç kimyasına katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Chavez, D. E. and Parrish, D.A., 2009, New heterocycles from tetrazines and oxadiazoles”, *J. Heterocycl. Chem.*, 46: 88–90.
2. Tozkoparan, B., Gökhan, N., Aktay, G., Yeşilada, E. ve Ertan, M., 2000, “6-Benzylidenethiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazole-5(6H)-ones substituted with ibuprofen: synthesis, characterization and evaluation of anti-inflammatory activity”, *Eur. J. Med. Chem.*, 35: 743-750.
3. Demirbas, N., Ugurluoglu, R. ve Demirbas, A., 2002, “Synthesis of 3-alkyl(aryl)-4-alkylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones and 3-alkyl-4-alkylamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones as antitumor agents”, *Bioorg Med Chem.*, 10: 3717-3723.
4. Sahin, D., Bayrak, H., Demirbas, A., Demirbas, N. ve Karaoglu, S. A., 2012, “Design and Synthesis of some Azole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents”, *Med. Chem. Res.*
5. Turan-Zitouni, G., Sivacı, M., Kılıc, FS. ve Erol, K., 2001, “Synthesis of some triazolyl- antipyrine derivatives and investigation of analgesic activity”, *Eur J Med Chem.*, 36: 685-689.
6. Maccarrone, M., Ullrich, V., 2004, “Redox regulation in disease and ageing”, *Cell Death and Differentiation*, 11: 949–951.
7. Kelly, F. J., 1998, “Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease”, *J Int Fed Clin Chem.*, 10(1):21-3
8. Georgopapadakou N. H., “Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs”, *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1, 547- 548.
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Imidazole>
10. Bennet J. E., 1996 “Antimicrobial agents-antifungal agents, Editors: Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Gilman A. G., Goodman and Gilman’s”, *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 2nd ed., The McGrawHill Companies, New York*, 1175.
11. R, M., Shaker, 2006, “The chemistry of mercapto- and thione- substituted 1,2,4-triazoles and their utility in heterocyclic synthesis”, *Arkivoc*, 9, 59.

12. Demirbaş, A., 2004, "A convenient synthesis of 3,6-disubstituted-1,4-dihydro-[1,2,4,5] tetrazines and preparation of new acetic acid derivatives containing 5-oxo-4 phenylamino-4,5-dihydro-[1,2,4]triazole", *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 311-323.
13. Joshi, S.,Khosla, N. and Tiwari, P., 2004.*Bioorg. Med. Chem.*,12, 571.
14. Amir, M., and Shikha, K., 2004., *Eur. J. Med. Chem.*, 39, 535–545.
15. Lopes, F., Capela, R., Goncaves, J. O., Horton, P. N., Hursthouse, M. B., Iley, J., Casimiro, C. M. and Bom, J., 2004.*Tetrahedron Lett.*, 45, 7663.
16. Holla, B. S., Veerandra, B. and Shivanada, M. K., 2003. *BojaPoojaryEur. J. Med. Chem.*, 38, 759.
17. Seriabine, et, al., "Experientia., 1968. Cohen J. Clin., 1970", *Pharmacol., J. New. Drugs.*, 10, 408; 24, 1150.
18. Filler, R., and Kobayashi, Y., 1982, "In Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry; 1997. Elsevier: Amsterdam", *P. Curr. Med. Chem.*, 4, 1.
19. Conde, S.,Corral, C. and Madroero, R., 1974.*Synthesis.*, 28.
20. Schoentensack, V. W., Bischler, P. and Dittmann, E., 1977. *Steinijans, Ch. Arzneium Forsch.*, 27, 1908.
21. Dimmock, J. R., Chamankkah, M., Allen, T. M. and Halleran, S., 1995. *Pharmazie.*, 50, 221.
22. Vanden, Bossche, H., 1985, "Biocemical targets for antifungal azole-derivative. Hypothesis of the mode of action", *Curr Top MedMycol*,1:313-351.
23. Vanden, Bossche, Hi., 1986, "Bellens D, et al: Cytochrome p-450: target for itraconazole", *Drug Dev Res*, 8:287-298.
24. Vanden, Bossche, HG., 1983, "Willemsens W: Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activation of N-substituted imidazoles and triazoles", *Biochem Soc Trans*, 11:665-667.
25. De Nollin, S., Van, Belle, H., et al.,1977,"Cytochemical and Biocemical studies of yeasts after *in vitro* exposure to miconazole", *Antimicrob Agents Chemother.* 11: 500-513.

26. Demirbaş, N. ve Uğurluoğlu, R., 2004, "Synthesis and Antitumor Activity of Some New 4- (1-Naphthylidenamino)- and 4-(1-Naphthylmethylamino)-1,2,4-Triazol-5-one", *Derivatives, Turk. J. Chem.*, 28: 679-690.
27. Singh, H. H., Nager, S., Chaudheri, A. and Parmar, S. S., 1973, "Inhibition of Pyruvic Acid Oxidation by 2,5-Substituted 1,3,4-Oxadiazoles", *J. Pharm. Sci.*, 62: 504.
28. Aboulwafa, O. M., and El-Metwalli, M. A. E., 1992, "Benzo[b]thiophenes: Synthesis of Novel Benzo[b]thienylhydrazine and 1,3,4-Oxadiazole Derivatives as Potential", *Antidepressant Agents, Arch. Pharm.*, 325:603-608.
29. Chandra, J. N. N. S., Sadashiva, C.T., Kavitha, C.V. and Rangappa, K.S., 2006, "Synthesis and in vitro antimicrobial studies of medicinally important novel N-alkyl and N- sulfonyl derivatives of 1-[bis(4-fluorophenyl)-methyl]piperazine", *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 6621-7.
30. Dixit, P.P., Patil, V.J., Nair, P.S., Jain, S., Sinha, N. and Arora, S.K., 2006, "Synthesis of 1- [3-(4-benzotriazol-1/2-yl-3-fluorophenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-3-substituted- thiourea derivatives as antituberculosis agents", *Eur. J. Med. Chem.*, 41:423-8.
31. Castellano, S., Stefancich, G., Chillotti, A. and Poni, G., 2003, "Synthesis and antimicrobial properties of 3-aryl-1-(1,1'-biphenyl-4-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)propanes as 'carba- analogues' of the N-arylmethyl-N-[(1,1'-biphenyl)-4-ylmethyl]-1H-imidazol-1- amines", *a new class of antifungal agents, Il Farmaco*, 58:563-568.
32. Rao, B. M., Sangaraju, S., Srinivasu, M. K., Madhavan, P., Devi, M. L., Kumar, P. R., Chandrasekhar, K. B., Arpitha, C. and Balaji, T. S., 2006, "Development and Validation of a Specific Stability Indicating High Performance Liquid Chromatographic Method for Rizatriptan Benzoate", *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 41: 1146-1151.
33. Cottineau, B., Toto, P., Marot, C., Aline, P. and Chenault, J., 2002, "Synthesis and hypoglycemic evaluation of substituted pyrazole-4-carboxylic acids", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 2105-2108.
34. İközler, A.A., Ucar, F.I., Demirbaş, N., D., Yasa, I., Demirbaş, A. ve Genzer, T., 1999, "Antimicrobial Activities of some 4H-1,2,4-triazoles", *Indian J. Pharm. Sci.*, 61: 271-274.
35. Holla, B. S., Shivananda, M.K., Shenoy, M. S. and Antony, G., 1998, "Studies on arylfuran derivatives - Part VII, Synthesis and characterization of some Mannich bases carrying halophenylfuryl moieties as promising antibacterial agents", *Il Farmaco.*, 53: 531- 535.

36. Dainippon, Pharmaceutical, Co. Ltd., 1981, "Japan Patent 81 05, 482,CA", 95: 62188n.
37. Machida Y., Saito I., Sugiyama I. and Negi S., 1982, "Europe Patent 62, 328,CA", 98: 125757g.
38. İşbilir, Ş. S., 2008, "Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
39. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1990 "Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human disease - an overview", *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
40. Kaur, C., Kapoor, H.C., 2001, "Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health", *Inti. J. Food Sci. Tech.*, 36, 703-725.
41. Süzen, S., 2007, "Antioxidant Activities of Synthetic Indole Derivatives and Possible Activity Mechanisms, Khan" *Topics in Heterocyclic Chemistry, Bioactive Heterocycles*.
42. Süzen, S., 2006 "Recent developments of melatonin related antioxidant compounds, Com" *Chem High T Synt*, 9(6): 409-419.
43. Akkuş, İ., 1995, "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri", *Mimoza Yayınları, Konya*.
44. Onat, T., Emerk, K., Sözman E. Y., (Ed.), 2002, "İnsan biyokimyası", *Palme Yayıncılık, Ankara*.
45. Frenkel, K., 1992, "Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidatif DNA damage", *Pharmac. Ther*, 53: 127-166.
46. Winternbourn, C. C., Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1985, "Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>." *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 1(1), 43-49.
47. Weijl, N.I., Cleton, F.J., Osanto, S., 1997, "Free radicals and antioxidants in chemotrathy-induced toxicity." *Cancer Treatment Reviews*, 23, 209- 240.
48. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A, Rodwell, V.W, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), 1996, "Harper" in Biyokimyası 24. baskı", *Bariş Kitabevi, İstanbul*.
49. Reilly, P.M, Schiller, H.J, Bulkley, G.B., 1991, "Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites", *Am J, Surgery*; 161: 488-501



50. Halliwell, B, Gutteridge, J.M.C., 1984, "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", *Biochem J*; 219: 744-52.
51. Klebanoff, S.J., 1980, "Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes", *Ann Intern Med*, 100: 480-9.
52. Simpson, R., Alon, R., Kobzik, L., Valeri, R., Shepro, D., 1993, "Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia reperfusion", *Annals of Surgery*, 218(4): 444-54.
53. Halliwell, B., Chirico, S., 1993, "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance", *Am J Clin Nutr*, 57: 715-65.
54. Jabs, C.M., Heglen, P., Eklof, B., 1995, "Breakdown of adenine nucleotides formation of oxygen free radicals, and early markers of cellular injury in endotoxic shock", *Eur J Surg*, 161: 147-55.
55. Lefer, A.M., 1977, "Eicosanoids of ischemia and shock. Fed Proc 1985; 44: 275-80.
56. Kellogg EW, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide", *J Biol Chem*; 6721-5.
57. Hawkins, C. L., Davies, M. J., 1998, "Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono- saccharides, and model compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation", *Free Radical Biology and Medicine*, 24 (9): 1396-1410.
58. McNeil, J. D., Wiebkin, O. W., Betts, W. H., Cleland, L. G., 1985, "Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 44, 780-789.
59. Van Der Vliet, A., Neill, O.C.A., Halliwell, B., Cross, C., Kaur, H., 1994, "Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite", *FEBS Letters*, 339: 89-92.
60. Trelstad, R.L, Lawley, K.R, Holmes, L.B., 1981, "Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine on reduced oxygen derivatives", *Nature*, 289: 310-5.
61. Kanofsky, J.R., 1989, "Singlet oxygen production by biological systems", *Chem Biol Interact*; 70: 1-28.
62. Floyd, R.A., 1990, "Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia", *Faseb J*, 4: 2587-97.

63. Halliwell, B., 1994, "Free radicals and antioxidants: A personal view", *Nutrition Reviews*, 52 (8): 253-265.
64. Slater, T.F., 1984, "Free radical mechanism in tissue injury", *Biochem J*; 222: 1-15
65. Akyol, Ö., 2004, "Şizofrenide oksidatif stres", *Kocatepe Tıp Dergisi*; 5 (ek sayı 1): 15-25.
66. Lee, J.D., 1991, "Concise inorganic chemistry", *Chapman & Hall, 4th Ed., New York*.
67. <http://www.mustafaaltinisik.org> (Ocak 2007).
68. Kılınc, K., Kılınc, A., 2002, "Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri", *Hacettepe Tıp Dergisi*; 33(2): 110 - 118
69. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1999, "Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B", *Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania*.
70. Diplock, A., 1998, "Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients", *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
71. Öztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, U., 2001, Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması", *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11(3)155-159.
72. Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S., 1996, "Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach, Lippincott Williams & Wilkins", *Baltimore, Maryland*.
73. Mecocci, P., Polidori, M.C., Ingegneri, T., Cherubini, A., Chionne, F., Ceccetti, R., Senin, U., 1998, "Oxidative damage to DNA in lymphocytes from", *AD patients, Neurology*, 51: 1014-1017.
74. Wheeler, C.R., Salzman, J., Elsayed, N., Omaye, S., Korte, D., 1990, "Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity", *Anal Biochem*, 2: 184-193.
75. Nordberg, J., Arner, E.S., 2001, "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system", *Free Radic Biol Med*. 31: 1287-1312.
76. Gutteridge, J.M.C., 1995, "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage", *Clin Chem*, 41:12,1819-28.
77. Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H., 2000, "Hydrogen peroxide in the human body", *Febs Letter*, 486: 10-13.

78. Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993, "An Introduction to radical biochemistry, Br", *Med. Bull*; 49: 481–493.
79. McCord, J.M., 2000, "The evolution of free radicals and oxidative stres", *Am JMed*, 108: 652–659.
80. Halliwell, B., 2001, "Food-derived antioxidants: How to evaulate their importance in food and in vivo", *Handbook of Antioxidants*, pp:1-45, New York.
81. Kılınç, A., Kılınç, K., 2003, "Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri", *Palme yayıncılık*.
82. Lüscher, T.F., Barton, M., 1997, "Biology of the endotelium", *Clin Cardiol*:20 (suppl II): II- 3- II-10.
83. Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., 2006, "Oxidative stress relationship with exercise and training", *Sports Med*; 36 (4): 327–58.
84. Altan, N., Dingel, A.S., Koca,C., 2006, "Diabetes mellitus and oxidative stres", *Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem*, 31(2); 51-56.
85. Percival, M., 1998, "Antioxidants", *Clinical Nutrition Insights*; 10: 1-4.
86. Podda, M., 2001, "Grundmann- Kollmann M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing", *Clinical and Experimental Dermatology*; 26: 578-582.
87. Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I., Kohen, R., 2007, "Interplay among oxidants, antioxidants and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations", *Biomedicine and Pharmacotherapy*; 61: 412-22.
88. Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001, "Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System", *Free Rad. Biol. and Med.*, 31(11), 1287-1317
89. Halliwell, B., Gutteridge, W.M.C., 1999, "Free Radicals in Biology and Medicine", *Oxford Medicine Press*, 246-351.
90. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., 2007, "Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *Int J Biochem Cell Biol*;39(1):44-84.
91. Logani, M.K, Davies, R.E., 1980 "Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants-a", *reviewLipids*;15(6):485-95.

92. Koizumi, A., Weindruch, R., Walford, R.L., 1987, "Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice", *J Nutr*;117(2):36-7.
93. Neal, R., Matthews, R.H., Lutz, P., Ercal, N., 2003, "Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation", *Free Radic Biol Med*;34(6):689-95.
94. Mansour, H.H., Hafez, H.F., Fahmy, N.M., Hanafi, N., 2008, "Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats", *Biochem Pharmacol*,75(3):773-80.
95. Sener, G., Tosun, O., Sehirli, A.O., Kaçmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., et al., 2003, "Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion", *Life Sci*;72(24):2707-18.
96. Martinez, M., Hernandez, A.I., Martinez, N., 2000, "N Acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria", *Brain Res*;855(1):100-6.
97. Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U., 2000, "Serbest Radikaller", *Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi*, 1, 52-58.
98. Şanlı, Y. ve Kaya, S., 1994, "Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri", *2nci Baskı. Medisan Yayınevi. Yayın No: 15. Ankara.*
99. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., and Symons, M.C.R., 1991, "Techniques in free radicals research", *Elsevier, Amsterdam*, vol 22
100. Köse, K., Doğan, P., 1992, "Lipid Peroksidasyonu", *Erciyes Üniv. Tıp Dergisi*, Ek 1, 340-350.
101. Dikici, İ., 1999, "Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması", *Uzmanlık Tezi, S. Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.*
102. Gutteridge, J.M., 1995, "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage", *Clin. Chem.*, 41, 1819-1828.
103. Dergel, R., 1992, "Lipid Peroxidation a Common Pathogenetic Mechanism, Exp", *Toxicol Pathol.*, 44 (4), 169-181.
104. Cao, G., Prior, R.L., 1999, "In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods", *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 1173-1181.

105. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, "Antioxidant properties of phenolic compounds", *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
106. Ito, N., Hirose, M., Fukushima S., Tsuda H., Shirai T., Tatematsu M., 1986, "Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis", *Food and Chemical Toxicology*, 24(10/11), 1071-1082.
107. Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., 2001, "Antioxidants From Residual Sources", *Food Chem*, 72:145-171.
108. Zulueta, A., Esteu, M.J., Frascuet, I., 2007, " Vitamin C, Vitamin A, Phenolic Compounds and Total Antioxidant Capacity of New Fruit Juice and Skin Milk Mixture Beverages Marketed in Spain", *Food Chem*, 103:1365-1374.
109. Bitkisel Sağlık Rehberi. <http://www.saracoğlu.at/bolum.php=bitki>
110. Krinsky, N.I., 1998, "The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids", *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 854: 443-47.
111. Giovannuci, E., Asherio, A., Rimm, E.B., 1995, " Intake of Carotenoids and Retinol in Relation to Risk of Prostate Cancer", *J. Natl .Can. Inst*, 87:1767-76.
112. Yüce, A., Aksakal, M., 2007, "Ratların Karaciğer ve Testis Dokusundaki Antioksidan Aktivite Üzerine Nar Suyunun Etkisi", *Fırat Üniv. Vet. Fak. Der*, 21:253-256
113. Halsam, E., 2003, "Thoughts on Thearubigins", *Phytochem* 64:61-73.
114. Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., 1995, "Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonoids are Powerfull Antioxidants Using an in vitro Oxidation Moder for Hearts Disease", *J. Agricul. Food Chem*, 43:2-2800.
115. Seven, A., Candan, G., 1996, "Antioksidan savunma sistemleri." *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27(1), 41-50.
116. Block, G., 1999, "Emerging role of nutrition in chronic disease prevention: A look at the data, with an emphasis on vitamin C." Chapter 3, p.45-54, In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.
117. Anderson, R.A., 2007, "Prescribing antioxidants." Chapter 103, p.1083-1094, In: *Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders.

118. Stahl W., Sies H., 1999, "Carotenoids: Occurrence, biochemical activities, and bioavailability." *Chapter 13*, p.183-202 In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.
119. Stahl, W., Sies, H., 2003, "Antioxidant activity of carotenoids." *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
120. Miller, N.J., Luiz-Larrea, M.B., 2002, "Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants." *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 12, 39-51.
121. Rice-Evans, C., 1999, "Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity." *Chapter 16*, p.239-253, In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc.
122. Ross, J.A., Kasum, C.M, 2002, "Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety." *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
123. Stryer, L., 1995, "Biochemistry, 4th Ed., W.H" *Freeman and Company*, New York.
124. Yeşilkaya, A., Yeğen, A., Özdem, S., Aksu, T.A., 1998, "The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroperoxide- treated erythrocytes." *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 28, 230-234.
125. Reiter, R.J., 1998, "Melatonin and human reproduction." *The Finnish Medical Society Duodecim*, 30(1), 103-108.
126. Yazıcı, C., Köse, K., 2004, "Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü." *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 56-65.
127. Percival M., 1998 "Antioxidants." *Clinical Nutrition Insights*, 10, 1-4.
128. Packer, L., Witt, E.H., Tristchler, H.J., 1995, "Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant." *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 227-250.
129. Scott, B.C., Auroma, O.I., Evans, P.J., O'Neill, C., Van Der Vliet, A., vd., 1994, "Lipoic acid and dihydrolipoic acid as antioxidants. A critical", *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (2), 119-133.
130. Sjödin, K., Nilsson, E., Hallberg, A., Tunek, A., 1989, "Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability", *Biochem Pharmacol*;38(22):3981-5.

131. Halliwell, B., 1996, "Antioxidants in human health and disease", *Annu Rev Nutr*;16:33-50.
132. De Rosa, S.C., Zaretsky, M.D., Dubs, J.G., Roederer, M., Anderson, M., Green, A., et al., 2000, "N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection", *Eur J Clin Invest*;30(10):915-29.
133. Ratjen, F., Wönne, R., Posselt, H.G., Stöver, B., Hofmann, D., Bender, S.W., 1985, "A double-blind placebo controlled trial with oral ambroLol and N-acetylcysteine for mucolytic treatment in cystic fibrosis", *Eur J Pediatr*;144(4):374-8.
134. Sölen, G., 1993, "Radioprotective effect of N-acetylcysteine in vitro using the induction of DNA breaks as endpoint", *Int J Radiat Biol*;64(4):359-66.
135. Spapen, H., 2004, "N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage" *Crit Care*;8(4):229-30.
136. De Flora, S., Izzotti, A., D Agostini, F., Balansky, R.M., 2001, "Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points", *Carcinogenesis*;22(7):999-1013.
137. Omura, T., 1999, "Forty years of cytochrome P450", *Biochem Biophys Res Commun*, 266 (3), 690-698.
138. Zhou, S.F., Liu, J.P., Chowbay, B., 2009, "Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact", *Drug Metab Rev.*;41(2):89-295
139. Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T., 1989, "Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease", *Nutr. Res. Rev.* 2; 51-62.
140. Diplock, A., 1998, "Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients", *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
141. Reaven, P.D., Khouw, A., Beltz, W.F. , Parthasarathy, S. and Witztum, J.L. 1993, "Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by  $\beta$ -carotene", *Arterioscler Thromb.* 13(4);590-600.
142. Di Mascio, P. Murphy, M.E., Sies, H. 1991, "Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols", *Am. J. Clin. Nutr.* 53; 194-200.
143. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B. 1995, "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids", *Free Rad. Res.* 22; 375-383.

144. Siegel, R., ark., 2012, "Cancer Treatment and Survivorship Statistics", *Ca Cancer J Clin*, 2012. 62:220-241
145. Society, A.C., 2012, "*Cancer Facts and Figures*", p. 1-64
146. <http://turkkanser.org.tr>
147. Ringer, D.P., Schnipper, L.E.,2001, "Principles of Cancer Biology. İn:Lenhard, R.E., Osteen, R.T.,Gansler, T.;eds. Clinical Oncology Atlanta", *American Cancer Society*;21-35.
148. Icli, F., Akbulut, H., 2005, "Onkolojiye Giriş. İn. İliçin, G.,Biberoğlu, K., Süleymanlar, G. ve ark.;eds",*İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi*;2007- 2014.
149. Nowell, P.C.,1976, "The clonal evolution of tumor cell populations",*Science* 194: 23-28.
150. Halliwell, B.,1994, "Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence",*Lancet*; 344:721-724.
151. Tripathy, D., Neoplasia. I.N, Mcphee, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F., ET AL.,1997, eds. "Pathophysiology of Disease.2nd ed.Connecticut", *Appleton&Lange*;78-97.
152. Dalay, N.,2000, "Kanser Biyolojisi. Topuz, E, Aydınar, A, Karadeniz, A.N; eds",*Klinik Onkoloji.İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*;48-53.
153. Sun, Y., 1990, "Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis"*Free. Rad. Biol. and Medicine*. 8:583-99,
154. Hossfeld, D.K., Sherman, C.D., Love, R.R., Bosch, F.X., 1990, "Manual of Clinical Oncology de., 5.baskı",*Springer-Verlag*, New York.,
155. Koparır, M., 2013, "Synthesis and biological activities of some new mannich bases of 5,5'-butane-1,4-diylbis[4-ethyl-2,4-dihydro-3h -1,2,4-triazole-3-thiones, Chem Sci Trans", *Chemical Science Transactions*. 2(3), 701-710,2278-3458/2278-3318.
156. Oyaizu, M., 1986, "Studies on products of browningreactionprepared fromglucosamine", *Jpn. Nutr.* 44, 307–316.
157. Dinis, T.C.P., V.M.C., Madeira, L.M., 1994, "Almeida, Arch. Biochem", *Biophys.* 315:161–169.
158. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.F., 1989, *Carcinogenesis* 10: 1003–1008.



159. Liu, F., Ooi, V.F.C., S.T. Chang, *Life Sci.* 60 (1997) 763–771.
160. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., & Aruoma, O.I., 1987, “The deoxyribose method: a simple ‘test-tube’ assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals”, *Analytical Biochemistry*, 165, 215–219.
161. Biçici, M., 1990, “Mikrobiyoloji”, *Çukurova Ü. Ziraat Fak.*, Adana
162. Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D., 2006, “Eleutherio, Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from Lipid peroxidation during oxidative stress”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1760, 340–346.
163. Karatepe, M., 2004, “Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC/UV.” *LC-GC North America*. 22, 362-5; April.
164. Offeing, B.M., Martelli, S., 1997, “Stoichiometry and Antitumour Activity of Platinum Metal Complexes of 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazone”, *Transition Metal Chemistry*., 22; 263-269.
165. Ferrari, B.M., Capacchi, S., Pelosi, G., Reffo, G., Tarasconi, P., Albertini, R., Pinelli, S., Lungni, P., 1999, “Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of Helicin Thiosemicarbazone Monohydrate and a Copper (II) Complexes of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone”, *Inorganica, Chimica Acta*., 286; 134-141.
166. Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yashimura, Y., Kawada, J., Kubota, S., 1990, “Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4-Triazole-3-Thiones and Thiosemicarbazones on Iodide Uptake by the Mouse Thyroid, The Relationship Between Their Structure and Antithyroid Activity”, *Chem. Pharm. Bull.*, 38(9); 2595-2596.
167. Esefsi, S. A., 2004, “Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein synthesis and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone”, *Toxicology in vitro* 18 467–474.
168. Skehan P., Storeng R, Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyol M.R., 1990, “New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening”, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1107–1112.
169. Varvaresou, A., Tsantili-Kakoulidou, A., Siatra-Papastaikoudi, T., Tiligada, E., 2000, “Synthesis and biological evaluation of indole containing derivatives of thiosemicarbazide and their cyclic 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole analogs”, *Arzneimittelforschung*., 50:48-54.
170. Cesur, N., Birteksöz, S., Ötük, G., 2002, “Synthesis and Biological Evaluation of some new thiosemicarbazide, 4-thiazolidinone, 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole-

3-thione derivatives bearing imidazo[1,2-a]pyridine moiety”, *Acta Pharm., Turcica*; 44: 23-41.

171. Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C., 1966, “Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems”, *Anal Biochem*; 16: 359-364.
172. Cetinkaya, N., Ozcan, H., 1991, “Investigation of seasonal variations in cow serum retinol and beta-carotene by high performance liquid chromatographic method”, *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*; 100:1003-8.
173. Stocks, J., Gutteridge J.M.C., Sharp, R.J., Dormandly T.L., 1974, “The Inhibition Of Lipid Autoxidation By Human Serum And Its Relationship To Serum Proteins And AlphaTocopherol”, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 47:223.
174. Catignani, G.L., 1983, “Simultaneous determination of Retinol and  $\alpha$ -Tocopherol in Serum of Plasma by Liquid Chromatograph”, *Clinical Chemistry*, 29:708-712.
175. Hussain, H. H., Babic, G., Durst, T., Wright, J. S., Fluerau, M., Chichirau, A., Chepelev, L.L., J. 2003, *Org. Chem.*, 68,7023-7032,.
176. McClements, D. J., Decker, E. A., 2000, *J. Food Sci.*, 65,1270-1282,.
177. Tomruk, Z., 2010, “Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-(4-benzensulfoniloksibenzilidenamino)-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on Bileşiklerinin Sentezi ve İn-vitro Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi”, *Kimya Kongresi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak*.
178. Gürsoy, Ö., Ayazoğlu, Elif., 2014, “Antioxidant activities and acidic properties of some novel 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxy)-benzylidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives”, *Arabian Journal of Chemistry*.
179. Yüksek, H., 29 Haziran-2 Temmuz 2010, “Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-formilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on Bileşiklerinin Sentezi ve İn-vitro Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi”, *Kimya Kongresi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi*.
180. Gürsoy, Ö., 2014, “Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-Benzilidenamino-4,5-Dihidro-1h-1,2,4-Triazol-5-On Bileşiklerinin Sentezi ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi”, *Caucasian Journal Of Science /Volume 1*.
181. Sorrenti, V., Salerno, L., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Siracusa, M. A., ve Vanella, A., 2006, “Imidazole Derivatives as Antioxidants and Selective Inhibitors of nNOS, Nitric Oxide,” 14, 45-50.

182. Qinrong, W., Ying, P., Jinzhi, W., Qing, P., Hongjun, L., and Jinhong, Z., 2011, “Synthesis and biological activities of substituted N'-benzoylhydrazone derivatives,” *African Journal of Biotechnology* 10(78), 18013-18021.
183. Vijesh, A.M., Isloor, A.M., Shetty, P., Sundershan, S., Hoong, Kun Fun., 2013, “New pyrazole derivatives containing 1,2,4- triazoles and benzoxazoles as potent antimicrobial and analgesic agents”, *Eur. J. Med Chem*, 62: 410-415.
184. Yao, K., Ina, Y., Nagashima, K., Ohmori, K., Ohno, T., 2000, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 766.
185. Kuş, C., Ayhan-Kilcigil, G., Ozbey, S., Kaynak, F.B., Kaya, M., Çoban, T., Can-Eke, B., 2008, “Synthesis and antioxidant properties of novel N-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amine and 4-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione derivatives of benzimidazole class,” *Bioorg. Med. Chem.* 16 ,4294-4303.
186. Kol, O.G., Ayazoglu, E., 2014, “Antioxidant activities and acidic properties of some novel 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxo)-benzylidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives,” *Arabian Journal of Chemistry*.
187. Ul-Haq, Khan, Z., A., Ali, S., Choudhary, M.I., 2010, “ Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives,” *Eur. J. Med. Chem.* 45, 5200-5207.
188. Hanif, M., Saleem, M., Hussain, M.T., Rama, N.H., Zaib, S., Aslam, M.A.M., Jones, P.G., Iqbal, J., 2012, “Synthesis, urease inhibition, antioxidant and antibacterial studies of some 4-amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazole-3-thiones and their 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]1,3,4-thiadiazole derivatives,” *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 854-860.
189. Aswathanarayanappa, C., Bheemappa, E., Bodke, Y.D., Krishnegowda, P.S., Venkata, S.P., Ningegowda, R., 2013, “Synthesis and evaluation of antioxidant properties of novel 1,2,4-triazole-based Schiff base heterocycles,” *Arch. Pharm. (Weinheim.)* 346, 922-930.
190. Nadeem, H., Mohsin, M., Afzaal, H., Riaz, S., Zahid, A., Muhammad, S.A., 2013, “Synthesis and in vitro biological activities of 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3-thiols,” *Adv. Microbiol.* 3) 366-375.
191. Tumosiene, I., ve Beresnevičius, Z. J., 2009, “Synthesis of azoles from 3,3'-[(4-alkoxyphenyl)imino]bis(propanoic acid hydrazides),” *Monatsh Chem*, 140 1523–1528.
192. Yabanoğlu, C. S., January 2011, “ Free-Radical Scavenging Activities of 2-Benzoxazolinone Derivatives Containing Thiosemicarbazide, Triazole, Thiadiazole

and Hydrazone Units”, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* Volume 31 / Number 1 // pp. 27-50

193. Başaran, E., Eylül 2012, “Bazı, Yeni 1,2,4-triazol-3-tyon, 1,3,4- tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol Türevli Bileşiklerin Antibakteriyel Aktiviteleri”, *Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir*, 03–07.
194. Berkyürek, A., “Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-[2-(4-Nitrobenzoksi)-Benzilidenamino]-4,5-Dihidro-1h-1,2,4-Triazol-5-On Bileşiklerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması, Antioksidan Ve Asitlik Özelliklerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*
195. Kimura, M., Masuda, T., Yamada, K., Kubota, N., Kawakatsu, N., Masaki Mitani, Kishii, K., Inazuy, M., and Namiki, T., 2002, “Novel Diphenylalkyl Piperazine Derivatives with Dual Calcium Antagonistic and Antioxidative Activities”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 1947–1950.
196. Canan, K., Gulgun, A.K., Suheyla, O., Melek, K., Tulay, C. and Benay, C.E., 2008, “Synthesis and antioxidant properties of novel N-methyl-1,3,4- thiadiazol-2-amine and 4-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)- thione derivatives of benzimidazole class”, *Bioorg. Med. Chem.* 16: 4294–4303.
197. Koparir, M., Orek, C., Parlak, A.E., SoylemezA., Koparir, P., Karatepe,M., Dastan, S.D., 2013,“ Synthesis and biological activities of some novel aminomethyl derivatives of 4-substituted-5-(2-thienyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones,”*Eur. J. Med. Chem.* 63,340-346.
198. <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp>
199. Nagaraja, G. K., Reshma, K., Manjunath, B., Peethambar, S.K., Arulmoli, T., 2014, “Antioxidant and Metal Chelating Activities of some Novel Imidazoquinolie Incorporated [1,2,4]-Triazolo Heterocycles,”*Journal of Pharma Research.*, 3(3) 23-25.
200. İkizler, A., Gümüş, F., Özden, S., Abbasoğlu, U., 1989,*Pharmazie*, 54, 506.
201. Yüksek, H., Demirbaş, A., Johansson, C.B., Çelik, C., İkizler, A.A., 1997, *Arzneim.- Forch./Drug Res.*, 47, 405.
202. Yüksek, H., Küçük, M., Alkan, M., Bahçeci, Ş., Kolaylı, S., Ocak, Z., Ocak, U., Şahinbaş, E., Ocak, M., 2006, *Asian J. Chem.*, 18, 539.
203. İkizler, A.A., Demirbaş, A., Johansson, C.B., Çelik, C., Serdar, M., Yüksek, H., 1998, *Acta Polon Pharm.*, 55, 117.

204. Qin, M., 2014, "Design and synthesis of novel 2-(4-(2-(dimethylamino)ethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)pyridines as potential antitumor agents", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 47-58.
205. Xiao-Meng, W., 2013, "Synthesis and anticancer activity evaluation of a series of [1,2,4] triazolo[1,5-a]pyridinylpyridines in vitro and in vivo ", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67: 243-251.
206. H. Mujagic., Chen, R., Geist, S.J., Occhipinti, B.M., Conger, C.A., Smith, W.H., Schuette, S.E., 1983, "Schackney: Effects of Vincristine on cell survival, cell cycle progression and mitotic accumulation in asynchronously growing Sarcoma 180 cells", *Cancer Res*, 43: 3591– 3597 .
207. Hou, Y .P., Sun, J., Pang, Z.H., Lv PC, Li DD., Yan, L., Zhang, H.J., Zheng, EX., Zhao, J., Zhu, H.L. , 2011, " Synthesis and antitumor activity of 1,2,4-triazoles having 1,4-benzodioxan fragment as a novel class of potent methionine aminopeptidase type II inhibitors", *Bioorg. Med. Chem*, 19:5948–5954.
208. Bhat, K.S., Poojary, B., D. Jagadeesh Prasad, Naik P., Holla, B.S. , 2009, "Synthesis and antitumor activity studies of some new fused 1,2,4-triazole derivatives carrying 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety", *Eur. J. Med Chem*. 44: 5066–5070.
209. Bekircan, O., Kahveci, B., Kucuk, M. , 2006, "Synthesis and Anticancer Evaluation of Some New Unsymmetrical 3,5-Diaryl-4H-1,2,4-Triazole Derivatives", *Turk. J. Chem*, 30: 29-40.
210. Rakesh, S., Anuja, C., 2014, "Importants methods of synthesis and biological significance of triazole derivatives", *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, Volume 3, Issue 8, 874-906.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: ALAYUNT, Naci Ömer

Uyruğu: T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 03.09.1980 Elazığ

Medeni hali: Evli

Telefon: 0 531 421 76 27

e-mail: nacialayunt@hotmail.com

## Eğitim

### Derece

### Eğitim Birimi

### Mezuniyet tarihi

Lisans

Fırat Üniversitesi

Kimya Bölümü 2005

Lise

Elazığ

Balakgazi Lisesi 1999

## İş Deneyimi

### Yıl

### Yer

### Görev

2008-.....

Fırat Üniversitesi Hastanesi

Merkez laboratuvarı Kimyager

## Yabancı Dil

İngilizce