

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

BİS-1,2,4- TRİAZOL İÇEREN BAZI MANNİCH BAZLARININ
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

AKİF EVREN PARLAK

MART 2015

UŞAK

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

KİMYA ANABİLİM DALI

**BİS-1,2,4- TRIAZOL İÇEREN BAZI MANNİCH BAZLARININ
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

AKİF EVREN PARLAK

UŞAK 2015

Akif Evren Parlak tarafından hazırlanan Bis-1,2,4- Triazol İçeren Bazı Mannich Bazlarının Biyolojik Etkilerinin Araştırılması adlı bu tezin Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) Prof. Dr. Sarit 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. Sarit GELİK

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) Prof. Dr. Cengiz SÖZMAN

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

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

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

(Ünvanı, Adı ve Soyadı) Yrd. Doç. Dr. Yaşemin SUNDUÇ KARAFALİOĞLU

(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)

Tarih: 06.03.2015

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.

Akif Evren Parlak

**BİS-1,2,4- TRIAZOL İÇEREN BAZI MANNİCH BAZLARININ
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

Akif Evren PARLAK

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mart 2015

ÖZET

1,2,4- triazol ve türevlerinin çok sayıda farmakolojik aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Mannich bazlarının antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antitümör gibi güçlü biyolojik aktiviteleri vardır.

Bu çalışmada, bis-1,2,4-triazol içeren Mannich bazlarının malondialdehit (MDA) ve antioksidan vitaminler (A,E,C) düzeyleri ratların serum, karaciğer ve böbreklerinde incelendi. Malondialdehit düzeyi (MDA) ve vitaminler (A,E,C) HPLC ile belirlendi. Ayrıca bu çalışmanın amacı bis-1,2,4, triazol içeren bazı Mannich bazlarının antioksidan etkilerini incelemektir. Bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi, süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi ve hidroksil radikali giderme aktivitesi gibi farklı yöntemler kullanılarak ölçüldü. Ayrıca bileşiklerin MCF-7 insan göğüs kanseri hücrelerine karşı antitümör etkileri araştırıldı.

Sonuç olarak bileşikler askorbik asit, BHT ve α -tokoferol gibi standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında etkili antioksidan aktivite gösterdi. Bununla beraber, bileşiklerin *in vitro* antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Bilim Kodu :

Anahtar Kelimeler: 1,2,4-Triazol, Mannich bazları, antioksidan, radikal temizleme, biyolojik aktiviteler

Sayfa Adedi : 92

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Sait ÇELİK

**THE INVESTIGATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF THE SOME MANNICH
BASES WHICH CONTAIN BIS-1,2,4 - TRIAZOLE**

(Phd. Thesis)

Akif Evren PARLAK

UŞAK UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 2015

ABSTRACT

It was proclaimed that 1,2,4-triazole and its derivatives show numerous pharmacological activities. Mannich bases have strong biological activities such as antibacterial, antifungal, antioxidant, antitumor features.

In this study, effects of some Mannich bases which contain bis-1,2,4 – triazole on the level of malondialdehyde (MDA) and antioxidant vitamins (A,E,C) of the serum, liver and kidney tissue of rats were investigated. Level of malondialdehyde (MDA) and vitamins (A,E,C) were determined by HPLC. Furthermore in this study aims to examine the antioxidant effects of some Mannich bases containing bis-1, 2, 4 triazole. The antioxidant activities of the derivatives were measured using different methods in this study, including reducing power capacity, metal chelating activity, superoxide anion radicals scavenging activity, H₂O₂ scavenging activity and hydroxyl radical scavenging. In addition, antitumor effects of derivatives 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 α -tocopherol as standard antioxidants. In addition, cell viability experiments show that compounds have effective *in vitro* antitumor activity.

Science Code :

Key Words : 1,2,4 - Triazole, Mannich bases, antioxidant, radical scavenging, biological activities

Page Number: 92

Adviser : Prof. Dr. Sait ÇELİK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımı yönlendiren, desteğini, bilgisini, tecrübelerini paylaşan ve her konuda destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Sait ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin bütün deney ve planlama aşamalarında, deneylerin gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi aşamasında, bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa KARATEPE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tezle ilgili deneylerin gerçekleştirilmesi esnasında, bilgi birikimini esirgemeyen, sayın hocam Doç. Dr. Nurallah ŞANLI'ya, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin SUNUCU KARAFKIOĞLU'na, sayın hocam Prof. Dr. Metin KOPARIR'a, sayın hocam Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ'a, sayın hocam Doç. Dr. Süleyman SANDAL'a, sayın hocam Prof. Dr. Cengiz SOYKAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Nevin ÇANKAYA'ya tezle ilgili birlikte çalıştığımız, bana yardımcı olan arkadaşım kimyager Naci Ömer ALAYUNT'a, teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince desteklerini her zaman yanımda hissettiğim başta eşim ve oğlum olmak üzere tüm aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mannich Bazları.....	2
2.2 Triazoller	5
2.3. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	7
2.3.1. Oksidatif Stres	7
2.3.2. Serbest Radikaller.....	8
2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri	10
2.3.4. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$)	12
2.3.6. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$).....	15
2.3.7. Singlet Oksijen (1O_2)	16
2.4. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri	17
2.4.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	18
2.4.2. Protein Oksidasyonu.....	20
2.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	21
2.4.4. DNA Oksidasyonu.....	21
2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri.....	22
2.5. Antioksidan Maddeler	24
2.5.1. α -Tokoferol (Vitamin E) Antioksidan Etkisi	24
2.5.2. A Vitamininin Antioksidan Etkisi.....	26
2.5.3. C Vitamininin Antioksidan Etkisi	27

2.5.4. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)	28
2.6. Kanser.....	29
3. MATERYAL ve METOT.....	32
3.1. <i>In vivo</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	32
3.1.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar	32
3.1.3. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler	33
3.2. <i>İn Vivo</i> Ortamda Yapılan Deney Yöntemleri.....	35
3.2.1. Doku örneklerindeki C Vitamini ve MDA Analizi.....	35
3.2.2. Doku örneklerindeki A ve E Vitamini Analizi	35
3.2.3. Kan Örneklerindeki C Vitamini ve MDA Analizi	35
3.2.4. Kan Örneklerindeki A ve E Vitamini Analizi	36
3.3. <i>İn Vitro</i> Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	36
3.3.1. Kullanılacak Yardımcı Aletler ve Cihazlar	36
3.3.2. <i>İn vitro</i> Yöntemlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	36
3.3.3. <i>İn Vitro</i> Antioksidant Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	38
3.3.3.1. İndirgeme Kuvveti Tayini	38
3.3.3.2. Metal Şelatlama Aktivitesi	38
3.3.3.3. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi.....	39
3.3.3.4. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi.....	39
3.3.3.5. Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi	40
3.3.4. <i>İn vitro</i> Antioksidan yöntem olarak <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Örneklerindeki Ölçümler	40
3.3.5. <i>In Vitro</i> Antitümör Özelliklerin Araştırılması	41
3.3.5.1. MCF-7 Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi.....	41
3.3.5.2. Kullanılacak hücre sayısı ve madde dozlarının belirlenmesi.....	42
3.4. İstatistiksel Analiz.....	42
4. DENEYSEL BULGULAR	43
4.1. İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Bulgular	43
4.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular	45
4.3. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular	47
4.4. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular	49
4.5. Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular	51

4.6. <i>In vitro</i> Antioksidan yöntem olarak <i>Saccharomyces cerevisiae</i> örneklerindeki ölçümler.....	53
4.7. <i>In vitro</i> Antitümör özelliklerin araştırılması MCF-7.....	54
4.8. <i>In vivo</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	56
4.8.1. Karaciğer Dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri	56
4.8.2. Böbrek Dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri	57
4.9. Kan Örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri.....	58
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ.....	72
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa No
Çizelge 2.1 Mannich reaksiyonunda kullanılan diğer sekonder ve primer aminler .	4
Çizelge 2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	10
Çizelge 2.3 Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	18
Çizelge 2.4 Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	22
Çizelge 3.1 Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi	32
Çizelge 3.2 Ligandların kodları ve IUPAC adlandırılması	34
Çizelge 4.1 Test bileşikleri ve standart antioksidanların indirgeme kuvveti sonuçları	43
Çizelge 4.2 Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzdeleri.	45
Çizelge 4.3 Test bileşikleri ve standart antioksidanların Hidrojen peroksit giderme yüzdeleri.	47
Çizelge 4.4 Test bileşikleri ve standart antioksidanların Süperoksit giderme yüzdeleri.	49
Çizelge 4.5 Test bileşikleri ve standart antioksidanların Hidroksil Rad. Yakalama yüzdeleri	51
Çizelge 4.6 Bileşiklerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA Düzeylerinin Dozlara Göre Ortalama Değerleri	53
Çizelge 4.7 Bileşiklerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre % de oranında canlılık durumları	54
Çizelge 4.8 Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre % de oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri	55
Çizelge 4.9 Bileşiklerle muamele edilmiş Karaciğer Dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri	56
Çizelge 4.10 Bileşiklerle muamele edilmiş Böbrek Dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri	57
Çizelge 4.11 Bileşiklerle muamele edilmiş Kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 2.1 Mannich reaksiyonu ve Mannich Bazı.....	2
Şekil 2.2 Mannich bazı ve türevlerinin ilaç kimyasındaki uygulamaları	3
Şekil 2.3 Mannich Bazları Kullanım Alanları	4
Şekil 2.4 İzomer üç triazol halkası	5
Şekil 2.5 İmidazol ve 1,2,4- Triazol halkası	6
Şeki 2.6 Metabolik olaylar sonucu oksijen radikallerinin oluşumu	12
Şekil 2.7 Elektron taşıma zinciri ve süperoksit radikalinin açığa çıkması	13
Şekil 2.8 Linoleik asidin OH [*] radikalinin bulunduğu ortamda lipid peroksidasyona uğraması ve son ürün olarak farklı aldehit moleküllerinin oluşması.	20
Şekil 2.9 Antioksidan gruplar ve görevleri	24
Şekil 2.10 BHT, BHT– 1, BHT–2, BHT-3 ve BHT-4 yapıları.....	29
Şekil 2.11 BHT ‘nin peroksit radikallerinin etkisini yok ediş mekanizması.....	32
Şekil 3.1 Ligandların yapısı	34
Şekil 4.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların absorbans grafikleri.	44
Şekil 4.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı absorbans grafikleri.	44
Şekil 4.3. Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzde grafikleri	46
Şekil 4.4 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri.....	46
Şekil 4.5 Test bileşikleri ve standart antioksidanların Hidrojen peroksit giderme yüzde grafiği.	48
Şekil 4.6 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı Hidrojen peroksit giderme yüzdeleri	48
Şekil 4.7 Test bileşikleri ve standart antioksidanların Süperoksit giderme yüzde grafiği.	50

Şekil 4.8.	Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı Süperoksit giderme yüzdeleri.....	50
Şekil 4.9	Test bileşikleri ve standart antioksidanların Hidroksil radikali yakalama grafiği.	52
Şekil 4.10	Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı Hidroksil radikali yakalama yüzdeleri.....	52
Şekil 4.11	Bileşiklerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	53
Şekil 4.12.	Bileşiklerle muamele edilmiş Karaciğer Dokusundaki C vitamini ve MDA Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	56
Şekil 4.13.	Bileşiklerle muamele edilmiş Karaciğer Dokusundaki A ve E vitamini Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	57
Şekil 4.14	Bileşiklerle muamele edilmiş Böbrek Dokusundaki C vitamini ve MDA Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	58
Şekil 4.15	Bileşiklerle muamele edilmiş Böbrek Dokusundaki A ve E vitamini Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	58
Şekil 4.16	Bileşiklerle muamele edilmiş Kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

SOR	: Serbest oksijen radikalleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
BHT	: Bütilenmiş hidroksitoluen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
O₂^{•-}	: Süperoksit radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
PBS	: Fosfat tamponu
PMS	: Fenazin meta sülfat
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
HClO₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat(Redükte)
TocOH	: Tokoferol
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
CAR	: β- karoten

1. GİRİŞ

Mannich bazları biyolojik potansiyeli olan bileşiklerdir. Son yıllarda mannich bazları tıp alanında oldukça büyük uygulama alanı bulmuştur. Antitürbekiler, anti-enfalamatuar, antimalaryal, antikanser ve analjezik ilaçlarda olduğu bilinmektedir.

Günümüzde, yoğun biyolojik aktivite göstermeleri nedeniyle azot içeren heterosiklik moleküller üzerine de ilgi gittikçe artmaktadır. Triazol bileşiklerinin oldukça dikkate değer biyolojik karakterleri sebebiyle pek çok araştırma grubu tarafından bu bileşiklere ilişkin çok yoğun çalışmalar yapılmıştır.

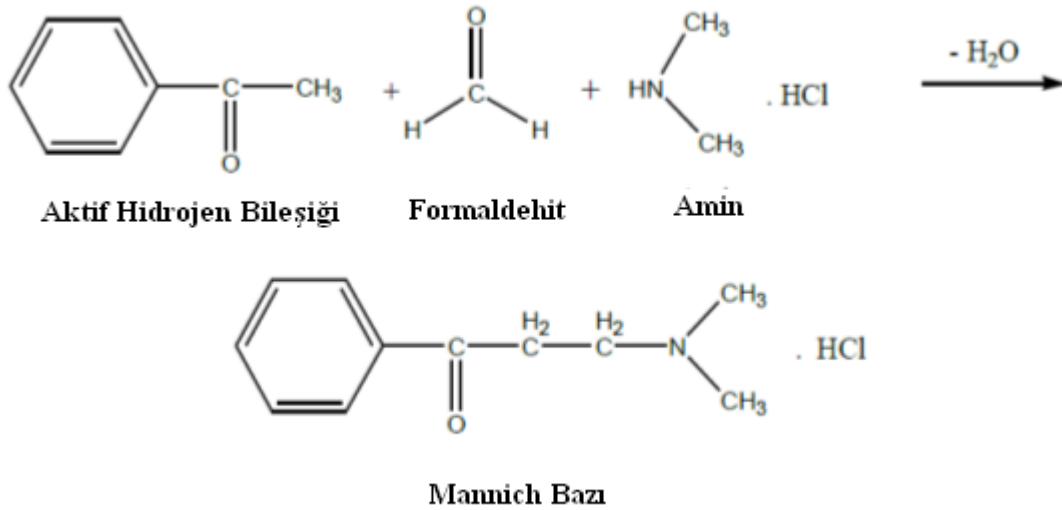
Gerek triazoller gerekse mannich bazlarının biyolojik aktif bileşikler olması, 1,2,4-triazoller üzerinden mannich bazları sentezlenmesi fikrini ortaya atmıştır ve bu bileşiklerin farmasötik kimyada geniş bir uygulama alanı kazanmasına yol açmıştır. Tez çalışmamızda bis-1,2,4- triazol içeren bazı mannich bazlarının biyoaktivitesini araştırarak bu konudaki çalışmalara katkıda bulunabileceğimizi düşünmekteyiz. Bu amaçla yapacağımız çalışmada bis-1,2,4- triazol içeren bazı mannich bazlar alınarak indirgeme kuvveti, süperoksit radikali giderme aktivitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi, hidroksil radikali yakalama aktivitesi ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde Malondialdehi (MDA) tayini gibi çeşitli *in vitro* yöntemleri kullanarak antioksidan özellikler ve ayrıca MCF-7 insan meme kanseri hücresi kullanılarak da antitümör özellikler araştırılacaktır. Ayrıca *in vivo* yöntem olarak ratlardan karaciğer ve böbrek dokuları ve kan örnekleri alınıp bu bileşiklerin antioksidan A, E ve C vitaminlerine ve MDA'ya olan etkileri araştırılacaktır. Son 15 yıl içerisinde bis-1,2,4-triazol ile ilgili yapılan sentez ve biyolojik etkilerinin araştırılması çalışmalarında bu grubu içeren çalışmalara çok az rastlanmaktadır. Bu nedenle bu grubu içeren türevlerle çalışacağımız için bu çalışmanın özgün olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullanılan triazol halkası taşıyan mannich bileşiklerinin yüksek oranda biyolojik aktiviteye sahip olması durumunda ise daha ileri araştırmalarla ilaç sektöründe önem arz edebileceği düşünülmektedir. Öte taraftan bu konunun literatüre kazandırılması da önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mannich Bazları

Mannich bazları; genellikle aktif hidrojen atomu içeren bir bileşik, formaldehit ve bir sekonder amin arasındaki reaksiyonu sonucu oluşurlar [1]. Reaksiyonda oynak hidrojen amino grupları ile yer değiştirir ve Mannich Bazı olarak bilinen amino substitüe bileşikler sentezlenir. Bu reaksiyon “Mannich Reaksiyonu” ismini kimyacı Carl Mannich’den 1912 yılında almıştır [2].

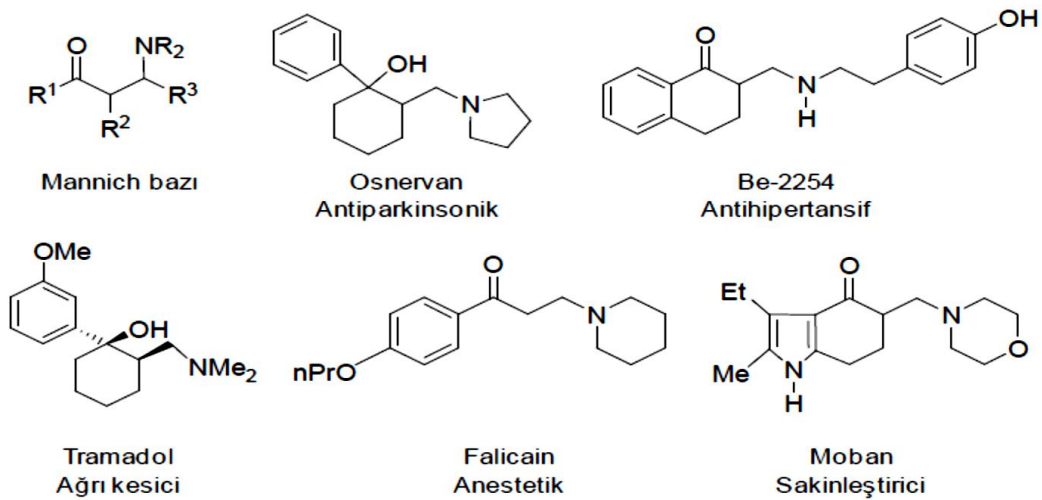
Mannich bazlarının sitotoksik [3-7], antineoplastik [8-9], antimikrobiyal [10-11], antikonvülzan [12-15], antienflamatuvar [16-17], antimalaryal [18] ve antiviral [19] etki gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir.



Şekil 2.1 Mannich reaksiyonu ve mannich bazı [2].

Mannich reaksiyonu, biyoaktif molekül elde etme çalışmalarında sıklıkla başvurulan bir reaksiyon tipidir. Mannich bazları *in vivo* veya *in vitro* koşullar altında deaminasyona uğramak suretiyle biyoaktif α , β - doymamış ketonları verirler [20-21]. α , β - doymamış ketonlar antineoplastik aktivitelerini hücre nükleofillerini β -tiyoeterleri vermek üzere alkilemek suretiyle gerçekleştirirler [22]. Bu nedenle bu tip bileşiklere biyolojik alkilleyiciler denir. Mannich bazlarının antibakteriyel, antifungal, antiherpes gibi biyolojik aktivite ve toksisite ile alkileme güçleri arasındaki ilişki birçok araştırmanın konusu olmuştur [20-23].

Mannich reaksiyonu, keşfedildiğinden beri, yeni bileşik sentezinde ana ya da ara basamak olarak artarak kullanılmış ve büyük bir öneme kavuşmuştur. Mannich bazının eldesinde yaygın olarak kullanılan mannich reaksiyonu, organik kimyadaki en önemli karbon-karbon bağı reaksiyonu türlerinden biri olup azot içeren pek çok ilaç aktif madde ve doğal ürünün (alkaloid) sentezinde anahtar basamak olarak görülmektedir [24]. Farklı fonksiyonel grupları tek bir moleküler yapıda içeren organik moleküllerin tek basamakta sentezine yol açan mannich reaksiyonları, ilaç dizaynı çalışmalarında da da sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri haline gelmiştir. Mannich bazları, suda çözünürlükleri yüksek olan, ön ilaç hazırlamada tercih edilen kimyasal yapılardır [25,26]. Eczacılık kimyası, mannich bazının en önemli kullanım alanıdır ve bu alandaki yayınların %35'i mannich Bazı hakkındadır. Eczacılık kimyasında; ağrı kesici, antibiyotik ve antikanser ilaçlarında kullanılır [27].



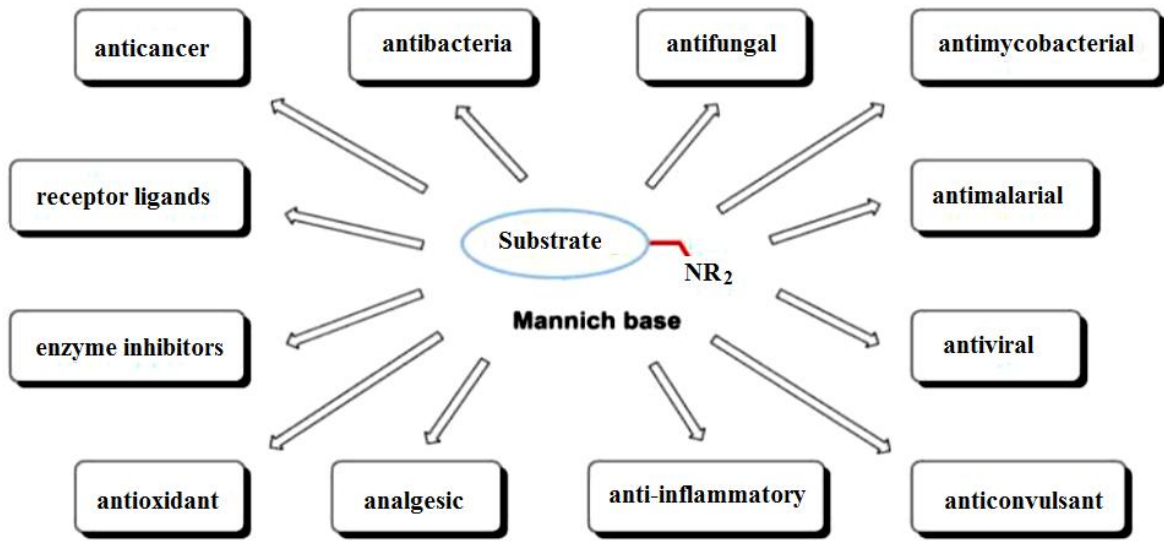
Şekil 2.2 Mannich bazı ve türevlerinin ilaç kimyasındaki uygulamaları [24].

Biyolojik olarak aktif bileşiklerin çeşitli modifikasyonlarının elde edilmesi amacıyla aromatik bileşiklerin Mannich reaksiyonu yoluyla aminoalkillendirilmesi pratik öneme sahip yöntemler olarak bildirilmiştir [28]. Dimetilamin, dietilamin, piperidin gibi klasik aminlerin yanında farklı farmakolojik açıdan önemli ürünlerin ya da şelatların oluşturulması için kullanılan çok sayıda amin bileşiği vardır. Bunlardan gentamisin ve bis-2-kloroetilamin veya boronların bazı amino türevleri gibi amin bileşikleri antibiyotiklerin ve çeşitli ilaçların sentezinde kullanılmıştır. Mannich reaksiyonunda kullanılan diğer sekonder ve primer aminler çizelge1.'de görülmektedir [29].

Çizelge 2.1. Mannich reaksiyonunda kullanılan diğer sekonder ve primer aminler [29].

Primer Amin	Sekonder Amin
Metilamin	Dimetilamin
Etilamin	Dietilamin
Alilamin	Dizaoamilamin
Benzilamin	Piperidin
Etilaminoasetat	Morfolin
β -kloretilamin	Piperazin
ω - Aminoasetofenon	1,2,3,4-Tetrahidizoizokinolin
Tetrahidro- β -nafilamin	6-Metoksi-1,2,3,4-tetrahidizoizokinolin
B-hidroksietilamin	Benzil-(-2-sikloheksanonilmetil)-amin

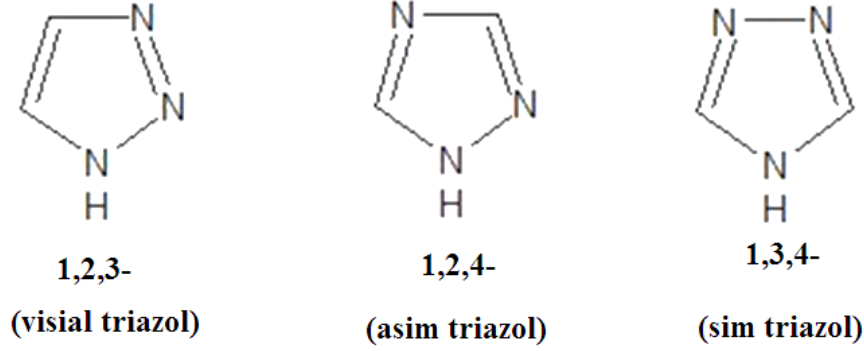
Günümüzde ise kanser tedavisinde sitostatik olarak Mannich bazlarının kullanımı önemli çalışma alanlarından biri olmuştur [30-31]. Günümüze kadar olan en önemli uygulama alanı doğal ürün sentezi ve ilaç kimyasında olmuştur. Mannich bazları biyolojik potansiyeli olan bileşiklerdir. Mannich bazı ve türevleri tarımda bitki koruma amaçlı, boya ve polimer kimyasında güçlendirici, reaksiyon hızlandırıcı ve çapraz bağlayıcı olarak geniş bir kullanıma sahiptir.



Şekil 2.3 Mannich bazları kullanım alanları [31].

2.2 Triazoller

Beş üyeli bir halkada üç azot atomu içeren sistem “triazasiklopentadien” veya kısaca triazol olarak bilinir. Heteroatomların halkadaki durumlarına göre 1,2,3- (visinal triazol) 1,2,4- (asimetrik, asim-triazol) ve 1,3,4 (simetrik, sim-triazol) olmak üzere birbirine izomer üç triazol halkası vardır [32].

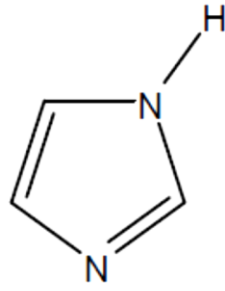


Şekil 2.4. İzomer üç triazol halkası [32].

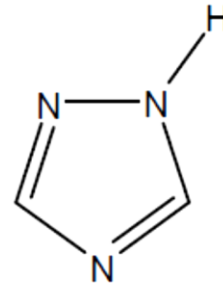
Triazoller 1880’li yıllarda Bladin [33] ve Andreocci [34] tarafından bilim dünyasına tanıtılmış ve bu konudaki çalışmalar günümüze dek yoğun bir şekilde devam etmiştir. Triazoller, başta tautomerik özellikleri olmak üzere, değişik sübstitüentlerin yapısı üzerinde yerleştirilmesine uygun kimyasal aktiflikleri ile işlek bir konuyu oluşturmaktadırlar.

Konuyla ilgili olarak Potts [35] tarafından 1961 yılında bir “Review”, Temple [36] tarafından da 1981 yılında “Triazols” adlı kitap yayınlanmıştır. Triazoller H. Von Pechmann tarafından osazonlardan elde edilmiştir ve osotriazones veya osotriazols olarak adlandırılmıştır [37]. Triazol çekirdeği içeren herhangi bir doğal bileşiğe rastlanamamıştır. Ancak triazol yapısı, pek çok bileşiğin yapısında yer alan ve bazı önemli fizyolojik olaylarda rol oynayan maddelerin (Histamin, Histedin, B12 vitamini) yapısında bulunan İmidazol’un bir izosteri sayılabilir.

Buna en çarpıcı örnek, histamindeki İmidazol halkası yerine biyoizoster olarak triazol çekirdeğinin getirilmesiyle elde edilen bileşikte de histamine benzer etkilerin elde edilebilmesidir [38].



İmidazol (3)



1,2,4- Triazol

Şekil 2.5 İmidazol ve 1,2,4- triazol halkası [38].

Aromatik karakterde olan bu halkalarda hidrojen taşıyan azot atomlarının elektronik durumu, piroldaki azot atomunun elektronik durumunun aynısıdır. Diğer azot atomlarının elektronik durumu ise diazollerdeki hidrojen taşımayan azot atomlarının durumu gibidir [10].

Literatürde triazol türevleriyle yapılan çalışmalarda antimikrobiyal [39], virostatik [40], sitostatik [41], antiinflamatuar [42], analjezik [43], antikalzunvan [44], merkezi sinir sistemi depresanı [45], antihistaminik [46], hipotansif [47], diüretik [48], herbisit [49], antihelmintik [50], antifungal [51], pestisit [52], ve insektisit [53] etkili bileşiklere ulaşılmıştır. Bohm ve Karow [54], farmakolojik etki verebilen triazol türevleri üzerinde yapılan araştırmaları bir “Review” de toplamıştır.

Yaklaşık 20 yıldır AIDS, organ nakli, tüberküloz ve kemoterapi sebebiyle bağışıklık yetmezliği olan hastalarda, mantar enfeksiyonlarında hızlı bir artışın ortaya çıktığı ve bu vakaların çoğunlukla ölümlerle sonuçlandığı açıklanmıştır. 1,2,4-triazoller (flukonazol, vorikonazol ve intrakonazol) günümüzde en çok kullanılan antifungal ilaçlar olup, en hızlı şekilde yayılan levür ve filamentöz mantarlarına karşı geniş spektrumlu aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Ancak, uzun süreli kullanımlarda, yüksek toksisite riski ve ilaç direncinin oluşumu nedeniyle antifungal aktivitelere etkinlikleri sınırlı kalmıştır [13]. Bu nedenle, geniş spektrum aktivitesi ve düşük toksisite etkisine sahip yeni antifungal ilaçlara (yeni triazol türevlerine) yönelik acil bir gereksinim söz konusudur ve pek çok araştırma grubu tarafından farklı substituentler taşıyan triazol bileşiklerinin literatüre kazandırılmasına ilişkin sentez çalışmaları devam etmektedir. Triazol halkasının substitüsyonu ile biyolojik aktivitesi modifiye edilir [55].

Amin, tiyon ve alkil süstitüe triazoller antiülser ve kan basıncını düşürücü aktiviteler gözlenmiştir [56]. Yapılan çalışmalar sonucunda 1,2,4 - triazol halkası ihtiva eden bileşiklerin önemli derecede biyolojik aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır [57]. 1,2,4-triazol halkasındaki azot ve merkaptto grupları nükleofil merkezdir ve elektrofiller ile tepkimeye girebilmektedir. Örneğin S ve N atomunda bazı alkilasyon ve mannich reaksiyonlarının gerçekleştirildiği bildirilmektedir [58]. Bu nedenle kullanımları yaygınlaşmıştır.

2.3. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.3.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres ifadesi, reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan dengesizliği ifade eden bir terimdir. Bu dengesizlik reaktif oksijen türleri lehine, başka bir deyişle antioksidan savunma sistemi aleyhinedir. Şiddetli oksidatif stres, hücre hasarlarına ve ölümlere bile sebep olabilmektedir [59]. Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) "Oksidatif Stres" denir. "Oksidatif Stres" olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır [60- 61].

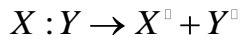
Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek bir düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı ürünlerdir [60].

2.3.2. Serbest Radikaller

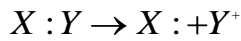
Serbest radikal, orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan herhangi bir bileşiktir. Bu radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif ve toksik bileşiklerdir. Serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını eşleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışmaktadırlar [62-63]. Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler "oksidan" veya "prooksidan" olarak tanımlanır [64].

Serbest radikaller üç temel yolla oluşur [65-70].

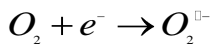
a) Kovalent Bağların Homolitik Bölünmesi İle: Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık (500–600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftirler.



b) Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi İle: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin, tokoferol ve askorbik asit gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



c) Normal Bir Moleküle Tek Bir Elektron Transferi İle: Radikal özelliği göstermeyen bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi meydana getirir.



Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik

ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir [71].

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller, radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksiste ortaya çıkmaz. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyararla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır.

Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkar. Özellikle eklem ve beyin omurilik sıvılarında antioksidan savunmanın yetersiz olması nedeniyle, bu bölgelerde serbest radikallere bağlı yıkımın daha fazla olduğu gözlenmektedir. Hücreler kendilerini serbest radikallerin oluşturacağı hasarlardan korumak için enzimler, antioksidanlar ve serbest radikal yok edicileri gibi detoksifikasyon sistemlerine bağılıdır [72]. Organizmada sürekli serbest radikal üretimi devam ettiği için bu serbest radikallerin karşı da birçok savunma sistemi işlemektedir [73].

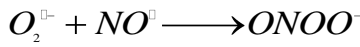
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla beraber; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. 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 [65- 66]. Tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıdaların bozulmasında serbest radikaller gittikçe artan yoğun bir ilgi alanına sahiptir. Lipid peroksidasyonunun serbest radikalik reaksiyonları, gıda endüstrisinde imalat süreçleri boyunca karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. İmalatçılar antioksidanları kullanarak, lipid içeren gıdaların oksidasyonunu en aza indirmeyi hedeflerler. Bunun yanı sıra biyomedikalçiler ve klinisyenler de vücudu, reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hasara karşı korudukları için antioksidanlara ilgi duymaktadırlar. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir [74-76].

2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. Bunlar arasında süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin (H_2O_2) özel yerleri vardır ve “reaktif oksijen türleri (ROT)” olarak bilinirler [120].

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R\cdot$), peroksil (peroksi) radikalleri ($ROO\cdot$), alkoksil (alkoksi) radikalleri ($RO\cdot$), tiyil radikalleri ($RS\cdot$) gibi önemli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Tiyil radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($RSO\cdot$) veya tiyil peroksil ($RSO_2\cdot$) gibi radikalleri de oluşturabilirler [65,66 - 77].

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 $NO\cdot$ ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin çok hızlı reaksiyonu ile bir nonradikal ürün olan peroksinitritin oluşumu verilebilir [66,78]



Bununla birlikte bir serbest radikal, radikal olmayan bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturabilir. Biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı radikal olmadığı için, *in vivo* şartlarda reaktif bir radikalın oluşumu, genellikle zincir reaksiyonunun başlamasına yol açabilir [66, 79].

Çizelge 2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Tür	Adı
1O_2	Singlet oksijen
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\cdot OH$	Hidroksil radikali
$ROO\cdot$	Peroksi radikali
$ROOOH$	Hidroperoksit
$RO\cdot$	Alkoksil radikali
$ROOR$	Endoperoksit
$ROOH\cdot$	Hidroperoksil radikali
(O_3)	Ozon
$(HOCl)$	Hipoklorik asit

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları:

I - Normal biyolojik işlemler:

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar:

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a-) İnhale edilenler
 - b-) Alışkanlık yapan maddeler
 - c-) ilaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
 - a-) Ksantin oksidaz
 - b-) indolamin dioksigenaz
 - c-) Triptofan dioksigenaz
 - d-) Galaktoz oksidaz
 - e-) Siklooksigenaz
 - f-) Lipooksigenaz
 - g-) Monoamino oksidaz
- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma
- 6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar
- 7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara [80].

Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları:

- Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücresinin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,

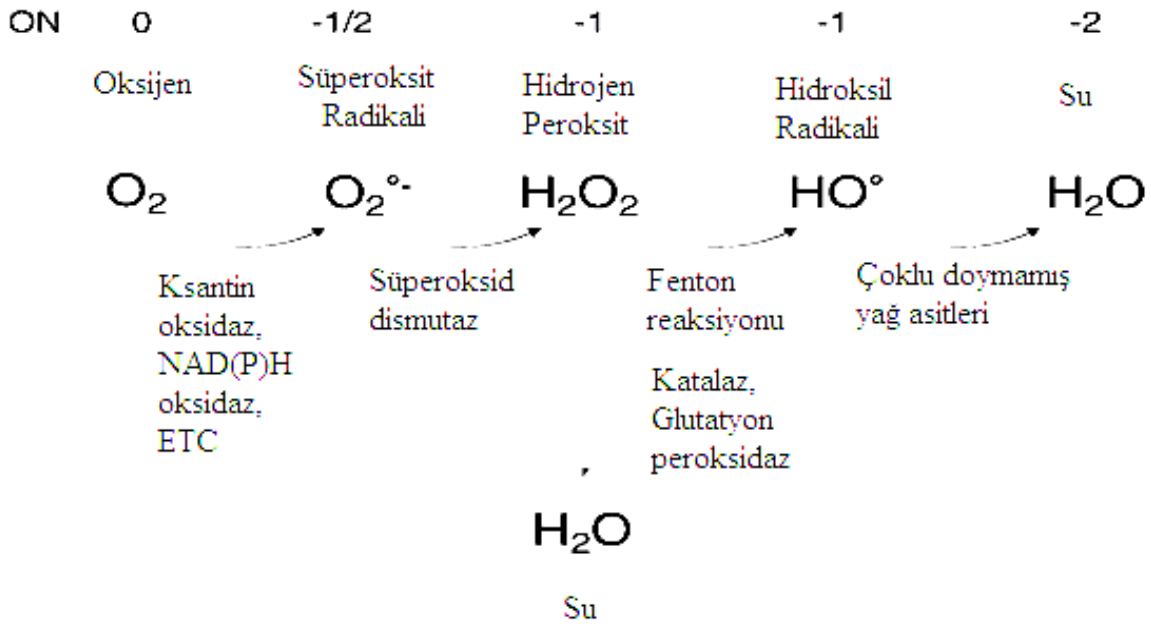
-Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar [81].

Oksijen sadece anaerobik organizmalarda değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkiye neden olabilmektedir. Oksijenin canlılardaki toksik etkileri başlıca iki tür mekanizma ile gerçekleşir:

1. Aerobik canlılarda gözlenen oksijen toksisitesinin ilk açıklaması, moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe ettiği şeklindedir. Örneğin; nitrojen fiksasyonunu katalizleyen nitrojenaz enzimleri ve CO₂ fiksasyonunu katalizleyen ribuloz bifosfat karboksilaz, oksijen tarafından kompetitif olarak inhibe edilirler.

2. Oksijenin enzim inhibisyonu etkisi sınırlı ve çok zayıftır. İlk kez 1954 yılında oksijenin toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Günümüzde, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin "oksijen radikalleri" olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir [82].



Şekil 2.6 Metabolik olaylar sonucu oksijen radikallerinin oluşumu [82].

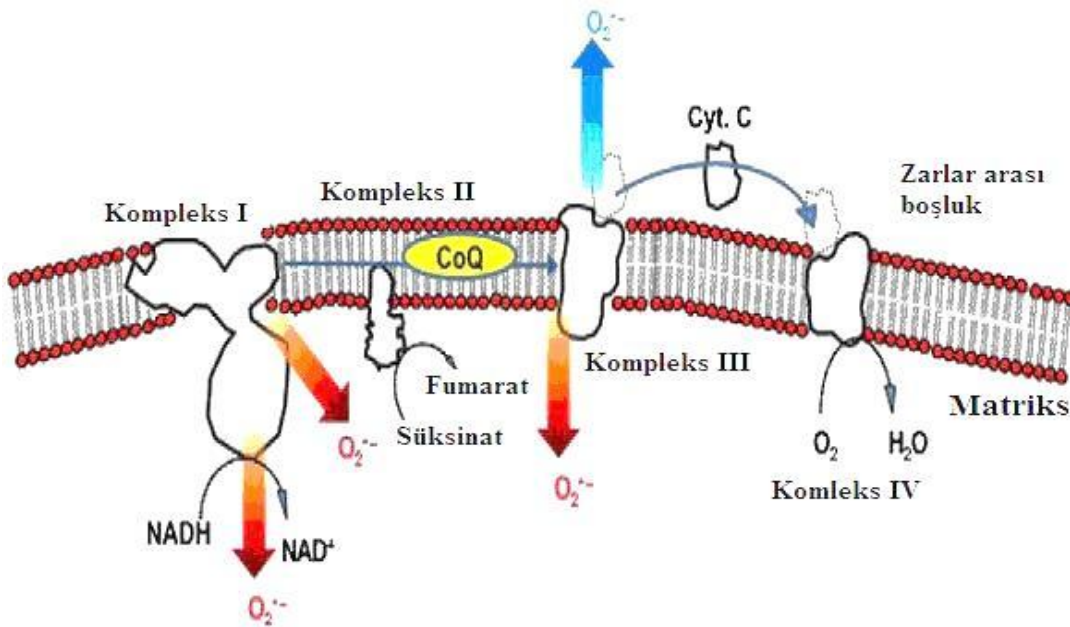
2.3.4. Süperoksit Anyonu (O₂^{°-})

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir [83]. Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri aynı yönde

olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali $O_2^{\cdot-}$), iki elektron alması ile de peroksi anyonu oluşur (O_2^{2-}) [84]. Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikaldır.

Serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir [85,86]. Süperoksit radikali normalde mitokondriyal solunum esnasında oluşmaktadır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin % 2'si süperoksit haline gelir. Oksijen mitokondride redükte olduğunda primer ürün sudur. Su, sitokrom oksidaz moleküler oksijene 4 elektron eklediğinde oluşur [87]. Süperoksit anyonu, diğer moleküllerden elektronları çekerek enerji gereksinimlerini karşılayabildiklerinden, oksitleyici ajanlar olarak kabul edilir. Ayrıca süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir [85,88].

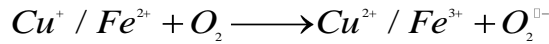
Hücre membranındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri lökosit membranındaki NADH oksidaz enzimi, stoplazmadaki ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla da süperoksit radikali oluşmaktadır [87,89].



Şekil 2.7 Elektron taşıma zinciri ve süperoksit radikalinin açığa çıkması [85,88].

Başlıca şu yollarla üretilmektedir [66, 90-92]:

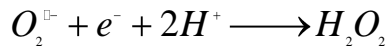
1. Katekolaminler, hidrokinoonlar, redükte flavinler, tiyoller, tetrahidrofolatlar gibi biyolojik moleküllerin aerobik ortamda otooksidasyonu sonucu süperoksit meydana gelir.
2. Aktive olmuş fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller), virüs veya bakteriyi inaktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler.
3. Mitokondriyal enerji metabolizması sırasında oluşan elektron sızıntısı sonucu kullanılan oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikali yapımı ile sonlanır.
4. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi oluşturabilir.



Süperoksit radikalinin önemi H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücrel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Örneğin; ferrisitokrom c ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve oksijene dönüşür. Epinefrin oksidasyonunda ise oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve H_2O_2 'ye indirgenir [65, 66]. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan olan perhidroksil radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ve perhidroksi radikali birbiriyle reaksiyona girince biri yükseltgenir, diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşur [66].

2.3.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

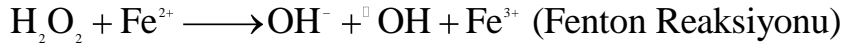
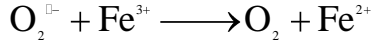
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 meydana gelir [66 - 93,94].



Yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir. Ancak biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidandır [66 - 90,91].

H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, ROT içine 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 [66,95].

Haber-Weiss reaksiyonu süperoksidin direkt olarak H₂O₂ ile reaksiyonudur, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe³⁺) süperoksit tarafından ferro demire (Fe²⁺) indirgenir. Sonra Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den [•]OH ve [•]OH üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki verilmiştir. [66, 96] :

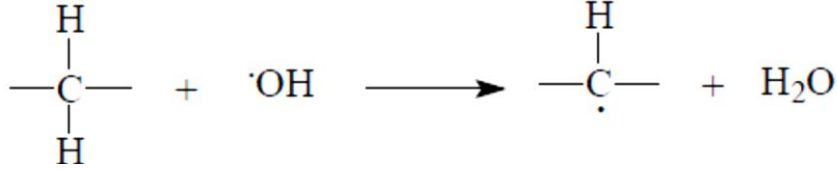


Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki "hem" grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidan düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir [108].

2.3.6. Hidroksil Radikali ([•]OH)

Hidroksil radikali, kimyada en aktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle *in vivo* da oluşan bir OH[•] radikali hemen her moleküle saldırır ve oluştuğu yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır [109,110]. Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında H₂O₂'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur [66].

Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomoleküle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olur [65, 66, 90]. Tiyoller ve yağ asitleri gibi molekülerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[•]), C merkezli organik radikaller (R[•]), organik peroksitler (RCOO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olur [100,101].



Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girse de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedefleridir. Nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik amino asitler) ile çeşitli radikalik tepkimeler verir [66].

$\text{OH}\cdot$ radikali, organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur, ancak normalde $\text{OH}\cdot$ radikali oluşmaz. Çünkü $\text{OH}\cdot$ oluşumu için moleküler oksijenin üç değerlikli olarak indirgenmesi gerekir ki, bu oldukça zordur. $\text{OH}\cdot$ meydana gelebilmesi için $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 gereklidir. Bunlarda SOD, CAT veya GSH-Px sistemiyle uzaklaştırılır. Bu antioksidan moleküllerin aktivitesi sonucu fizyolojik şartlarda fazla miktarlarda $\text{OH}\cdot$ oluşmaz [102,103].

2.3.7. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşiğidir [65, 66, 77]. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kJ) olduğundan sigma şekline (155 kJ) göre daha uzun yarı ömürlüdür [66, 104]. Vücutta, pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyon tepkimesi sırasında, porfiry gibi porfirin metabolizması hastalıklarında oluşabilir [66, 90].

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve $\text{OH}\cdot$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet

oksijenin sigma ve delta diye iki tipi vardır [105]. Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı omru kısadır, hızlıca bozularak delta formuna dönüşür [106]. Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *in vivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2–5-difenilfuran, 1,4-diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizlerler [105]. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur [105].

2.4. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Serbest radikaller; hücrelerin lipit, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi fonksiyonel bileşiklerine etki ederler. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu ve kapiller geçirgenliği bozar, hücrenin elektrolit kaybına ve trombositlerin kümeleşmesine neden olurlar. Ayrıca proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, lipooksigenaz, triptofan dioksigenaz ve galaktoz oksidaz gibi hidrolitik enzimleri aktifleştirirken alfa 1-antitripsin gibi antiproteolitik enzimleri inaktif hale getirirler.

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en fazla zarar gören yapılar membranlardır. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolaylıkla reaksiyona girerek çeşitli peroksidasyon ürünleri meydana getirirken, membranların yapısını, permeabilitesini ve fonksiyonunu bozarlar. Membrandaki enzimleri inaktif hale getirirler [65]. Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar [63,107].

Çizelge 2.3 Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Hiyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

2.4.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipit, 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 lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler [108].

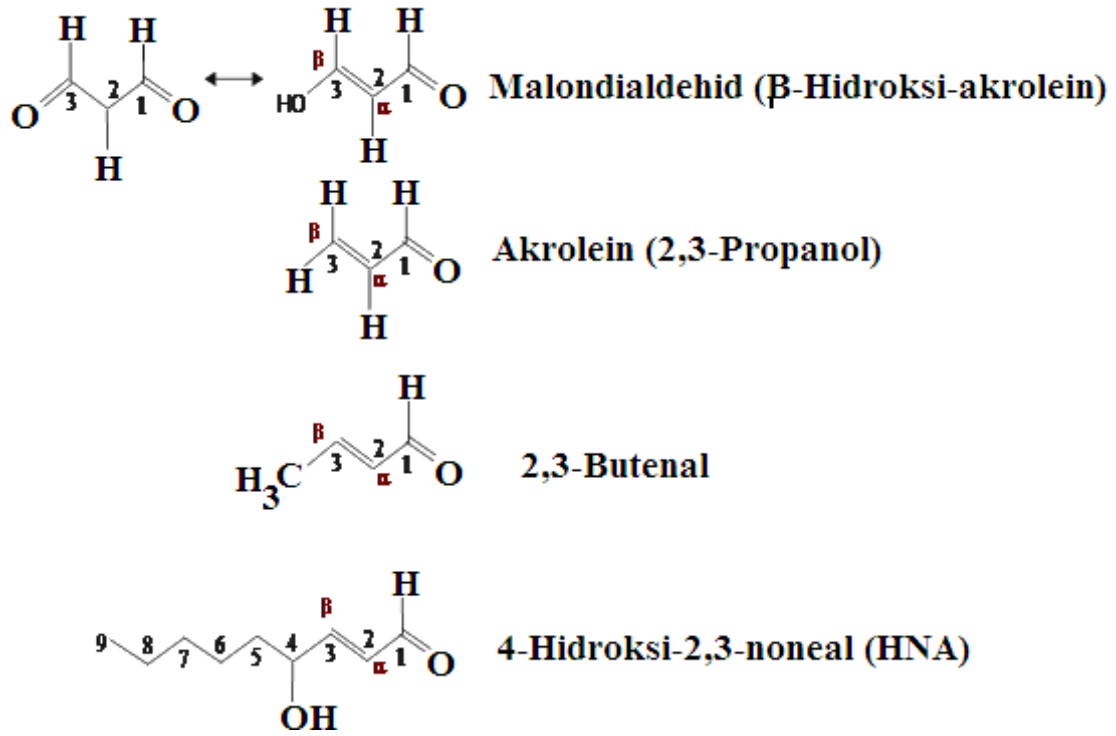
Hücreleri saran membranlar hücre organelleri, geniş miktarda poliansature yağ ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipit peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipit radikallerin oluşumuna sebep olurlar. Lipit peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonun indirekt bir işaretidir. Biyolojik membranların en önemli unsurları lipit ve proteinlerdir. Lipit peroksidasyonu, lipitler kadar membran proteinlerini de hasara uğratabilir [109].

Çeşitli patolojik durumlar arasında 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 lipid peroksidasyonudur [108].

Oksijen molekülleri lipitlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobin ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipitlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokulara da bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipit peroksidasyon kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir.

Lipit peroksidasyonun zar yapısı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerinde zararlı etkileri ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [110]. Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlere zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar.

MDA (Malondialdehit), biyolojik sistemde lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücre olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden difüze olup, hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehytler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler [111]. LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder [112,113].



Şekil 2.8 Linoleik asidin OH[•] radikalinin bulunduğu ortamda lipid peroksidasyona uğraması ve son ürün olarak farklı aldehit moleküllerinin oluşması [112,113].

Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerazasyonuna sebep olur. Bu deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinogenetik olduğunun açıklar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insandaki hem de doğadaki lipit peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [114].

2.4.2. Protein Oksidasyonu

Proteinler serbest radikal etkisine karşı PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit bileşimlerine bağlıdır.

Serbest radikaller proteinleri yükseltgeyebilirler. Amino asitlere ve disülfid (S-S) bağlarına saldırırlar ve özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana getirirler. Bu reaksiyonlar sonucunda immunglobülin G ve albümin gibi fazla sayıda

disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozularak fonksiyon kaybına uğrarlar ve proteolitik yıkım gösterirler [65].

2.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksialdehitler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patojenik proseslerde önemli rol oynarlar.

Hücrede karbonhidratlar üzerine serbest oksijen radikallerin etkisi çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır. Özellikle glikoz, mannitol ve bazı sakkarit türevleri, hidroksil radikalleri ile reaksiyon verirler. Monosakkaritlerin yükseltgenmesi ile oluşan çeşitli peroksit türevleri ve oksialdehitler, protein ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllerle etkileşerek ve bu moleküller üzerinde çapraz bağlar oluşturarak bu moleküllerin yapısını bozabilmektedir. Böylece oluşacak hasar hücre yaşlanması veya kanserle sonuçlanabilmektedir [115].

2.4.4. DNA Oksidasyonu

Kararlı bir molekül olan DNA endojen etkenlerin yanı sıra elektromanyetik, ultraviyole ve X-ışınları gibi eksojen kaynaklara maruz kaldığında diğer biyomoleküller gibi spontan olarak kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. Serbest radikallerin etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi hücrede mutageneze, karsinogeneze ve hücre ölümüne sebep olabilmektedir.

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, dolayısıyla da hücrede fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilir, önemli bir hedeftir.

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 104 kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikoru oluşmaktadır [116-118].

2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türevleri prooksidantlar olarak bilinir ve normal aerobik hayatı oldukça etkilerler. Oksijen ise aerobik hayatın vazgeçilmez bir yakıt kaynağıdır. Normal metabolik reaksiyonlar sırasında, serbest radikallerin endojen olarak ortaya çıkmaları nedeniyle, tüm aerobik organizmalar doku hasarından korunmak için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engellemek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. Canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme “Antioksidan Savunma Sistemi” veya kısaca “Antioksidanlar” denilmektedir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmakla beraber serbest radikal oluşumunu engelleyenler ve mevcut radikalleri etkisiz hale getirenler veya enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir [119, 120]. Hücrelerin hem sıvı hemde membran kısımlarında bulunabilirler [105, 121].

Çizelge 2.4 Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

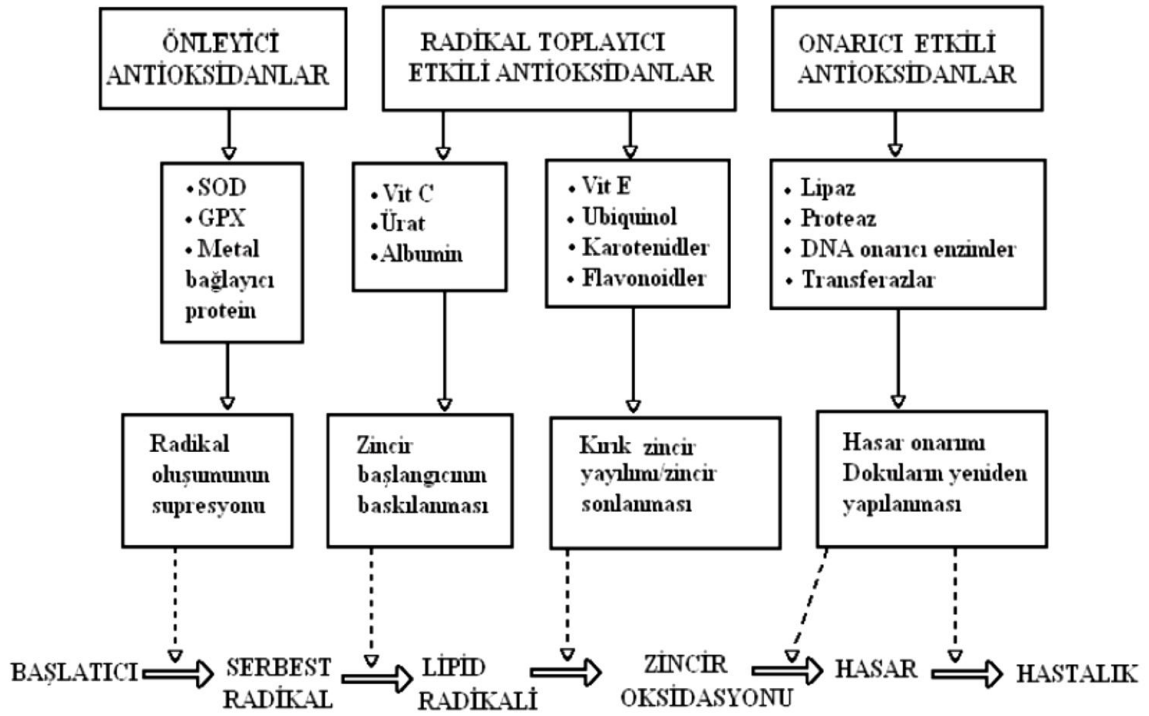
A- Endojen (Doğal) Antioksidanlar		
I. Enzimler	II. Makromoleküller	III. Mikromoleküller
- Süperoksid dismutaz	- Seruloplazmin	- E vitamini ve analogları
- Katalaz	- Transferrin	- C vitamini
-Glutatyon peroksidaz	- Ferritin	- Tiyol içerenler: GSH
- Glutatvon redükaz	- Hemoglobin	-N-asetil sistein, Metiyonin kaptopril
- Hidroperoksidaz	- Miyogloblin	- A vitamini-(3-karoten
- Sitokrom -C oksidaz		- Glikoz
		- Ürik asit
		- Ubikinon
		- Bilirubin
B - Eksojen Antioksidanlar (ilaçlar)		Gıda Antioksidanları
- NADPH oksidaz inhibitörleri		- Bütil Hidroksitoluen (BHT)
-Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler		- Bütil Hidroksianisol (BHA)
- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları		- Sodyum benzoat
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri		- Etoksikuin
- Nötrofil adezyon inhibitörleri		- Propilgalat
- Rekombinant h-SOD		
- 21 - Aminosteroidler. Indopamid		
- Sitokinler. Flavonoidler		
- Ksantin oksidaz inhibitörleri		
- Barbitüratlar. Trimetazidin		

Enzimatik olan ve enzimatik olmayan tüm antioksidanların 5 değişik mekanizma ile etkili oldukları savunulmaktadır. Bu mekanizmalar Şu Şekilde sıralanabilir:

1. Lokal oksijen konsantrasyonunu azaltmak,
2. OH \cdot , O $_2^{\cdot-}$ gibi anahtar reaktif oksijen turlerini ortadan kaldırmak yoluyla zincir reaksiyonunun başlamasını engellemek,
3. Peroksitleri parçalayarak onların zincir reaksiyonunu oluşturan radikallere dönüşümünü engellemek,
4. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak, radikal oluşumunun başlamasını engellemek,
5. BaŐlamıŐ olan bir zincir reaksiyonunu kırmak [122].

Hidroksil radikalleri (\cdot OH), süperoksid anyonları (O $_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) gibi reaktif oksijen radikalleri düşük miktarlarda hem eksternal ve hemde internal uyarılara cevap olarak aerobik organizmalarda sürekli olarak üretilirler [123]. ROS hücre büyümesi, farklılaşması, gelişmesi ve ölümüne katılmaktadırlar [124]. Düşük seviyede ROS intraselüler haberleşme, hücre farklılaşması ve hücrenin büyümesinin durdurulması, apoptoz, immunité ve mikroorganizmalara karşı savunma gibi birçok biyokimyasal olayda kaçınılmaz ve faydalı olabilir [125]. Organizmada oksidan etkenler ve antioksidan mekanizmalar bir denge halinde bulunmaktadır. Yüksek doz ve/veya ROS'un elimine edilmesindeki yetersizlik sonucunda oksidan-antioksidan dengenin dengenin oksidan lehine değişmesi ile oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres ise kanser, iskemi, ve endokrin fonksiyonlardaki yetersizliklere yol açan biyolojik makromoleküler hasarlar gibi çeşitli metabolik fonksiyon bozukluklarına sebep olur [126].

Vücutta serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif stresden korumak için antioksidan sistem devreye girer. Birinci defans hattını, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin supresyonu ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlar oluşturur. İkinci defans hattını, vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincir oksidasyonunun başlamasını inhibe etmesi ve zincirleme reaksiyonların yayılımını önlemesi oluŐturmaktadır. Üçüncü olarak da hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalıŐan onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve tranferazlar gibi) defansta rol alırlar [127].



Şekil 2.9 Antioksidan gruplar ve görevleri [127].

2.5. Antioksidan Maddeler

2.5.1. α -Tokoferol (Vitamin E) Antioksidan Etkisi

E vitamini, tokoferol yapısında olup, yağda çözünen bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoidlerin değişime uğratıldığı 6-hidroksi kromanlar veya tokoferollerdir. α -tokoferol geniş dağılım gösteren ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan formudur [63].

Doğal olarak mevcut olan sekiz adet tokoferolden biri olan α -tokoferol (E vitamini) antioksidant olarak en aktifi olanı ve doğada en yaygın olarak bulunanıdır. Tokoferollerin biyolojik olarak bu etkinliği halka sisteminde bulunan hidroksil grubunun varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler izoprenoid yan zincirleri de içerirler. Vitamin E nin başlıca fonksiyonu hücre bileşenlerinin moleküler oksijen ve serbest radikallerin oksidasyonundan korumasıdır. Güçlü ve doğal bir antioksidant olan E vitamini, membran lipidlerini serbest oksijen radikallerinden koruyan ilk savunmayı gerçekleştirir. Süperoksit ve hidroksil radikalini, singlet oksijeni ve lipid peroksit radikallerini süpürme yeteneği vardır.

Taşıdığı fenolik hidrojeni peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikallerine aktararak serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktadır. Oluşan serbest fenoksi radikali daha sonra bir serbest peroksit radikali ile reaksiyona girer ve böylece geriye dönüşümlü oksidasyona uğramayan α -tokoferol, kroman halkası ve yan zinciri serbest radikal olmayan ürünlere yükseltgenmektedir.

Oluşan oksidasyon ürünü, halka üzerindeki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjuge olarak safra salgısı ile atılmaktadır. Görevini tamamlayan α -tokoferol tekrar kullanılmadığı için yenilenmesi gerekir.

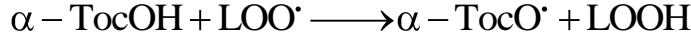
İnsanlarda E vitamini eksikliği belirtileri eritrositlerin peroksitlere karşı duyarlılığı ve anormal hücre membranlarının oluşmasıdır. Enzim ve bileşiklerin çoğu oksidatif stresin etkilerine karşı hücreleri korurlarken E vitamini antioksidan savunmanın tümünde önemli bir yere sahiptir. E vitamini serbest radikallerin oksidasyonuna karşı hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada ilk savunma hattını oluşturur [128].

Son çalışmalar α -tokoferol ve askorbik asidin döngüsel olarak beraber fonksiyon gösterdiklerini kanıtlamıştır. Antioksidan reaksiyonu sırasında α -tokoferol, lipid veya lipid peroksil radikaline kararsız hidrojenini vererek α -tokoferol radikale dönüşür. α -tokoferol radikali, askorbik asit tarafından tekrar orijinal α -tokoferol şekline dönüştürülmektedir [129,130].

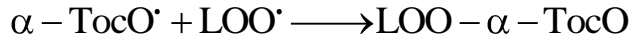
Birkaç epidemiyolojik çalışmada Vitamin E'nin vücuda girmesinin etkileri rapor edilmiştir. Vitamin E'nin günlük 200 IU alınmasının kanser hücrelerinin apoptozisini tetikleyerek kolorektal kanserin oluş sıklığını azalttığı kanıtlanmıştır. Böylece Vitamin E'nin güçlü bir hücre döngüsü inhibitörü olduğu kabul edilmiştir. Genellikle Vitamin E'nin koruyucu etkisi, endonükleazların aktivasyonunun ve serbest radikal oluşumunu inhibisyonunun bir sonucudur.

Vitamin E çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E; süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir. E vitamini diğer biyolojik moleküllerden

daha fazla peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önler ve hücre yapısını koruyarak güçlü bir antioksidan etki gösterir [131]. Lipid peroksidasyonunda oluşan peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek çok fazla zayıf ve etkisiz bir radikal olan tokoferoksil radikalini oluşturur.



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



Böylece her tokoferol molekülü, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını önleyerek antioksidan etkisini gösterir [132].

2.5.2. A Vitamininin Antioksidan Etkisi

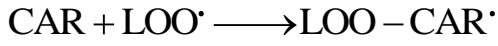
A vitamini suda çözünmeyen, yağda ve organik çözücülerde çözünen bir madde olup, bir primer alkol grubuna ve çok sayıda doymamış bağa sahiptir. Bir büyüme vitamini olan A vitamininin alkol (retinol), aldehit (retinal) ve asit (retinoik asit) formları da mevcuttur.

Memelilerde sadece retinol A vitamini etkisi göstermez, karotenoidler de (α , β ve γ -karotenler) A vitamini etkisi gösterir [133]. Ayrıca α -karoten ve γ -karotenin birleşmesiyle bir molekül A vitamini oluşur. A vitamini karaciğerde yağ asidi esteri halinde depolanır [134]. Gıda ile alınan β -karotenler, karoten dioksigenaz enzimi ile oksidatif parçalanmaya uğramaktadırlar. Bu parçalanmada moleküler oksijenden yararlanılmakta ve safra tuzlarının varlığında hızlanan olay sonucunda iki molekül retinal açığa çıkmaktadır. İntestinal mukozada retinal NADPH yardımıyla spesifik bir retinal redüktaz enzimi tarafından retinole indirgenmektedir. Retinolun büyük kısmı doymuş yağ asitleri ile ester oluşturarak kan dolaşımına lenf kanalı ile verilmektedir.

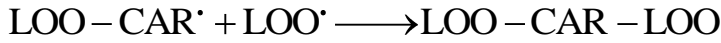
A vitamini görme, büyüme, üreme ve epitel hücrelerin sağlamlığı fonksiyonlarına sahiptir. İnsanın günlük A vitamini ihtiyacı 1 mg civarındadır. Karaciğer, böbrek, yağ, yumurta sarısı A vitamini için zengin kaynaklardır. Sarı ve koyu yeşil sebzeler ve meyveler A vitamini öncülü olan karotenler bakımından zengindirler. A vitamininin eksikliğinde eklemlerde iltihaplanmalar ve beraberinde göz kornealarında iltihaplar, hastanın görme netliğinin azalması, gözaltı derilerinde büzülmeler, hastanın gece ile gündüz görmelerinde

uyumsuzluk gözlenmektedir [135]. A vitamini singlet oksijen temizleyicisi özelliği nedeniyle diğer oksijen radikallerine karşı da koruyucu etki yapar [62].

Vitamin A'nın ön maddesi olan β - karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır. Karotenoitler, lipit peroksidasyonu esnasında ortaya çıkan radikalleri önlemede etkilidir ve aktif oksijen çeşitlerini durdurmada etkili olan pigmentler olarak görülürler. Karotenoitlerin uzun, konjuge, çift bağlı sistemleri radikal saldırılarına karşı onları üstün hale getirmektedir. β - karotenin (CAR) peroksil radikali ile direkt olarak reaksiyona girebileceği ve karbon merkezli radikal oluşturarak rezonans kararlı hale geleceği belirtilmektedir [136].



Karotenoitler α - tokoferollerde görüldüğü gibi iki peroksil radikali ile reaksiyona girebilir



Bununla birlikte bu antioksidan etki burada bitmez. Aşağıda gösterildiği gibi çoklu rezonans kararlılığı ile bir karoten molekülü, karbon merkezli radikaller oluşturarak iki peroksil radikale daha etki eder [137].



β - karoten ile peroksil radikalının reaksiyonundan oluşan ürünlerin bazısı son zamanlarda ESR ile tarif edilmiştir. Ürünler bazı epoksitler ile β - karotenin karbonil türevleridir [138,139].

2.5.3. C Vitamininin Antioksidan Etkisi

Vitamin C, kapalı formül $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ olan bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Suda çözünebilen vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil taze sebze, patates, domates, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. Askorbik asit yeterince alınmadığı zaman skorbut hastalığı, kansızlık ve uyuşukluklar başlar ilerledikçe kanamalar olur, bağ dokuları zayıflar ve kemikler kırılabilir. C vitamininin besinlerle fazla alınması, koroner kalp hastalığı ve

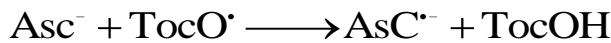
bazı kanserler gibi kronik hastalıkların görülme sıklığını azaltır. C vitamini fazlası idrar ve terle dışarı atılır. Böylece alınan fazla miktar depo edilmez (134).

C vitamini güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların temizlenmesinde rol oynar. C vitaminin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir [62]. İnsanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yiyen yarasaların, L-glukonolakton oksidaz enzimini icermedikleri için sentezleyemedikleri gerekli bir diyet vitaminidir. Askorbik asit güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur.

C vitamini (askorbik asit) bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır [140,141].

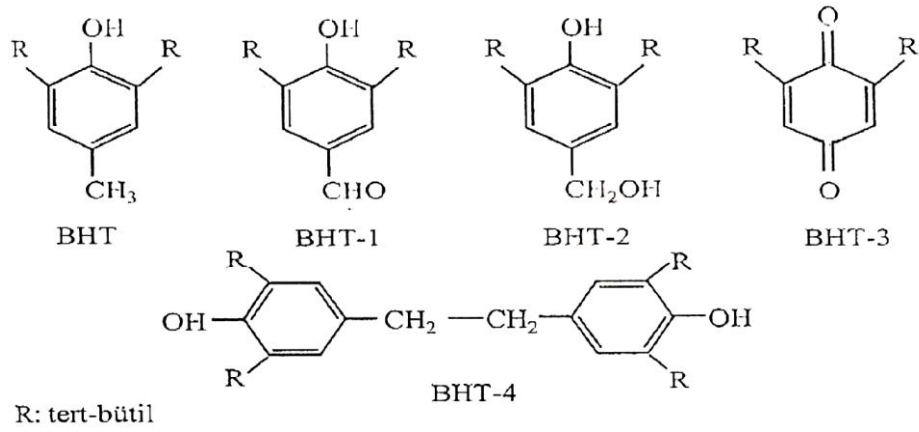
Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. C vitamininin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir. [142]. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir [143].

Ayrıca C vitamini askorbat radikali oluşturarak, radikalik tokoferollerin yenilenmesini sağlar [144].



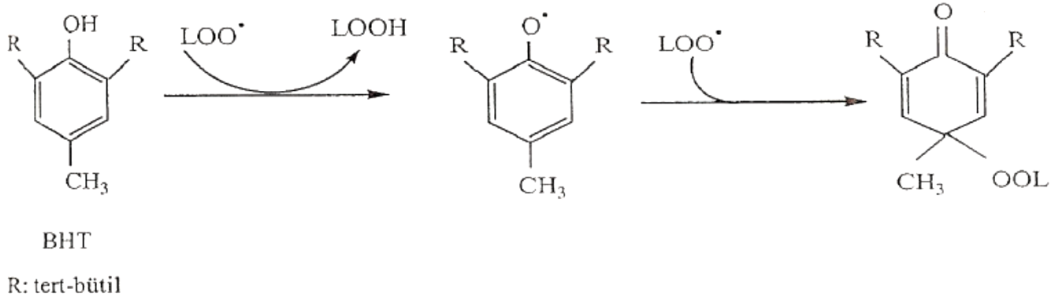
2.5.4. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen en çok kullanılan antioksidantlardandır. BHT ilk defa soya yağının otoksidasyonunda bozunma ürünlerinin tayin edilmesiyle fark edilmiştir. BHT içeren soya yağı ultraviyole ışığına maruz bırakılacak olursa bozunma ürünleri olan BHT-1, BHT-2, BHT-3 ve BHT-4 oluşmaktadır [145].



Şekil 2.10 BHT, BHT- 1, BHT-2, BHT-3 ve BHT-4 yapıları [145].

BHT yağlar ve yağ asitlerinin oksidasyonunda okside olmuş lipidlerle verdiği reaksiyon sonucu peroksit radikallerinin etkisini yok eder [145].



Şekil 2.11 BHT 'nin peroksit radikallerinin etkisini yok ediş mekanizması[145].

2.6. Kanser

Kanser kompleks bir hastalıktır. Moleküler ve hücre biyolojisine göre kanser anormal bir gen ekspresyonu hastalığıdır [146]. Kanser genelde normal olmayan hücre çoğalmasına verilen isimdir. Hücreler vücudumuzun yapı taşlarıdır. Çekirdeğin içinde ise kromozom adı verilen iğsi parçalar bulunur. Her normal hücre 46 kromozom içerir. Kromozomlar, molekül yapıları çok iyi bilinen DNA (deoksiribonükleik asit) zinciri ile histon denilen protein zincirinden oluşur. DNA zincirleri de özgül proteinleri sentezlemekle görevli gen adı verilen birimlerden oluşur. DNA kontrol edicidir ve kromozomlardaki genetik karakterleri ebeveynlerden çocuklara geçecek şekilde aktaran bir taşıyıcıdır [147]. Kromozomlar, vücudumuzun büyümesini, fonksiyonlarını ve davranışlarını nasıl yapacağını anlatan milyonlarca mesajı içerir. Çoğu zaman bu genler

düzgün çalışır ve doğru mesajlar gönderirler. Kromozomların kendilerini çoğaltması hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hücre bölünmesi kompleks bir olaydır ve bölünme safhaları bir şeylerin yanlış gitmesi için büyük bir fırsattır. Hücre bölünmesi sırasındaki bu hataların büyük bir kısmı dış kaynaklı faktörlerin neden olduğu hatalardır ve vücut çoğu zaman bu hataları kendi kendine tamir ediyor olabilir de bazen bu tamir gerçekleşmez ve bir ya da daha fazla gen mutasyona uğrar. Sonuçta bir hücredeki kromozomun zarar görmesi ve genetik değişime uğramasından dolayı kanser ortaya çıkar. Değişen gen hatalı ya da farklı mesaj gönderir ve o hücre hızla büyür ve tekrar bölünür. Bu durum kanser veya malign tümör adı verilen bir yumru oluşuncaya kadar tekrarlanır. Hızlı hücre çoğalması her zaman anormal olarak değerlendirilmez. Vücut dokularının normalden hızlı büyüdüğü normal durumlar mevcuttur. Bunlardan birincisi; tek bir hücreden insan vücudunun oluştuğu dokuz aylık evredir. İkincisi ise; vücudun normal ergin boyutta yetişkin insan oluşturduğu gelişme dönemidir. Bunun dışında vücutta meydana gelen yaralanma ve doku tahribi durumlarında dokuların hızla yenilenmesi sırasında da hızlı hücre çoğalması görülür. Yalnız bu normal süreçlerin sonunda, genler hücre çoğalmasını durdurma komutu verirler. Fakat kanserli hücre bu 'dur' komutuna uymaz ve kontrolsüz şekilde büyümeye başlar. Son çalışmalar herhangi bir kanser tipi için vücuttaki 300-500 arası normal genin modifikasyona uğraması sonucu kanserin ortaya çıktığına işaret etmektedir [148]. Tümör kelimesi kanser oluşumu ve yeniden oluşum anlamına gelen neoplazm olarak da bilinir [146]. Neoplazmlar temelde ikiye ayrılır. Bunlar;

1- Benign (iyi huylu) neoplazmlar: Siğil veya papilloma gibi

2- Malign (kötü huylu) neoplazmlar: Katı tümörler veya lösemi gibi

Türkiye'de elde edilen bulgulara göre, erkeklerde akciğer, mesane ve larinks gibi sigara kullanımı ile ilişkili kanserler ilk sıralarda yer almaktadır. Kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanserdir. Kolorektal kanserler, hem erkeklerde hem de kadınlarda üst sıralarda bulunmaktadır. Bu bulgular, ülkemizde en yaygın görülen kanserlerin önlenebilir nitelikteki kanserler olduğunu ortaya koymaktadır [148]. Günümüzde kanserli bir hastanın tedavisinde cerrahi ve ışın tedavisi öncelikli olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tedavilere ek olarak kemoterapi de sıklıkla uygulanmaktadır. Kemoterapi, genellikle çok sayıda ilaçla gerçekleştirilen, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla uygulanan tedavidir. Kemoterapide kanser hücrelerini ortadan kaldıran ilaçlar kullanılır. İdeal ilacın normal hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerini öldürmesi beklenir, ancak bu

özelliik Şu anda klinikte kullanılan ilaçların çoğunda bulunmaz. Çünkü malign kanser hücresi ile normal insan hücresi arasında nicelik olarak çok fark yoktur. Kanser tedavileri sıklıkla sağlıklı hücre ve dokulara hasar verir. Yan etkiler temel olarak tedavinin tip ve kapsamına bağlıdır ve herkeste aynı Şekilde seyretmez, hatta aynı kiside bir seanstan diğerine deęiŐebilir. Örneğin, sitotoksik ilaçlarla gerçekleştirilen tedavi sıklıkla bulantı, kusma, istah kaybı, zayıflama, halsizlik ve kansızlık ile enfeksiyon riski artısına yol açan kan hücrelerinde azalmaya neden olur. Kemoterapi yapılan kisilerin çoğunun saçı dökülürken, diğer yan etkiler ilaç tipine göre deęiŐiklik gösterir. Sonuç olarak günümüzde kanserin herhangi bir Őeklini tamamen tedavi edecek kimyasal bir bileşik henüz bulunamamıŐtır [149]. Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser tipi olup, tüm kanserlerin %18'ini oluŐturmaktadır. Meme kanserinin tedavisi oldukça zordur, çünkü tedavide farklı cevaplar sergileyen, farklı tümör sınıfları vardır. Meme kanser gelişiminde, apoptoz ve hücre proliferasyonu arasında bir dengesizlik söz konusudur. Hücre siklusunun sorunsuz olarak çalışması, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu için önemlidir [150-153]. Meme kanseri, kadınlar arasında kanser nedenli ölümlerin baŐında yer almaktadır. Meme kanseri, semptom göstermeden metastaz yapabilir. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifen'in, meme kanser hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu açıklanmıştır [154]. Kanser tedavisinde amaç, hem selektif (seçici) toksisitesi artırılarak çok daha etkili bir tedaviye olanak veren hem de tedavi süreci ve sonrası ortaya çıkan birçok istenmeyen yan etkisi azaltılmıŐ veya olmayan bileşiklerin geliŐtirilmesidir. Bu nedenle, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde de yeni alternatif ajanların araŐtırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni ilaç etken maddelerinin araştırılması meme kanserinin tedavisinde potansiyel kanser ilaçlarının oluşumuna yeni yaklaŐımlar sağlayacaktır.

Tez alıŐmamızda, biyolojik etkisini araştırdığımız bileşiklerin yukarıda genel bilgiler olarak bahsettiğimiz reaktif oksijen türlerine ve meme kanserine karşı potansiyel antioksidan ve antitümör aktivitelerini araŐtırmayı planladık.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. *In vivo* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

Araştırmada 12-14 haftalık ortalama 250 g ağırlığında Long Evans cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nden temin edildi ve aynı yerde deneysel uygulama gerçekleştirildi. 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 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 hiçbir nedenle denek ölümü yaşanmadı. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

3.1.2. 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 [155] taramasından sonra 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. Uygun araştırma yerinde 3 günlük aralıklarla 30 gün boyunca belirli dozlarda

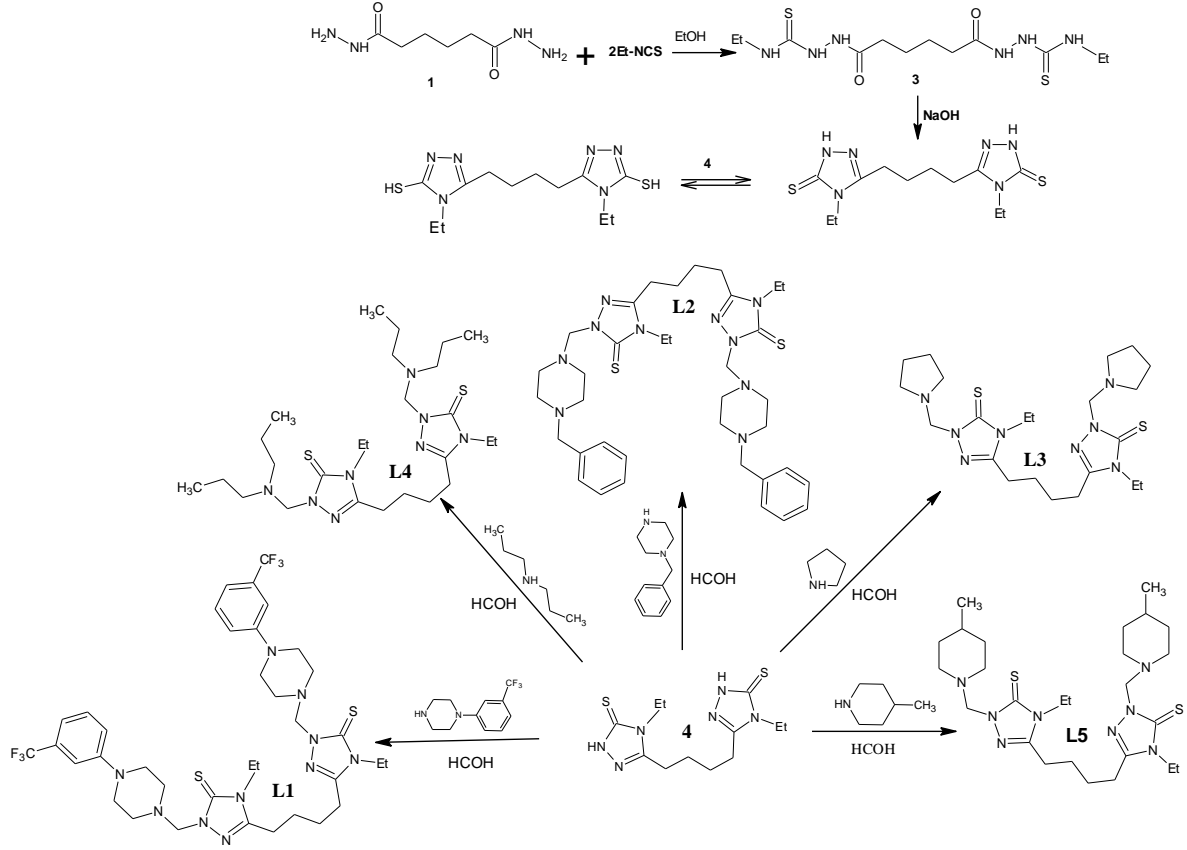
deri altı enjeksiyon yapıldı. Bu sürenin bitiminde ratlar dekapite edilerek karaciğer ve böbrek dokuları ve kan örnekleri alındı. Ratlardan alınan kan örnekleri pıhtılaşma olayını takiben santrifüjlenerek serum ayrıldı. Alınan kan örnekleri santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç 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 [156,157] faydalanılarak kararlaştırıldı ve şartlara uygun olarak 25 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde önce DMSO'te 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 derişimi 25 mg/kg vücut ağırlığı dozunu ihtiva edecek şekilde hazırlanan çözeltiler deri altına enjekte edildi.

3.1.3. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler

Uygulamalarda, bis-1,2,4-triazol içeren Mannich bazları kullanıldı. Ligand teriminden esinlenerek bileşiklere L1-5 şeklinde kodlama yapıldı. Bu ligandlar Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Anabilim dalı araştırmacıları tarafından sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir [158]. Ligandların yapısı aşağıda (şekil 3.1.) gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Ligandların yapısı

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

Çizelge 3.2 Ligandların kodları ve IUPAC adlandırılması

3.2. *In Vivo* Ortamda Yapılan Deney Yöntemleri

Analizler aşağıda belirtilen metotlara göre yapıldı.

3.2.1. Doku örneklerindeki C Vitamini ve MDA Analizi

Yaklaşık 0.3 gr parçalanmış doku örneği üzerine 0.5 M HClO₄'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 [159].

3.2.2. Doku örneklerindeki A ve E Vitamini Analizi

Parçalanmış 0,3 gr doku örneği üzerine % 1'lik H₂SO₄ 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 [160]. Bu çözeltiden 20 µL alınıp HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.3. Kan Örneklerindeki C Vitamini ve MDA Analizi

Serum örneğinden 0,3 ml alınıp üzerine 0,3 ml 0,5 M HClO₄ 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, HPLC 'de analiz edildi. Analizler hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - 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 [161].

3.2.4. Kan Örneklerindeki A ve E Vitamini Analizi

Derin dondurucudan alınan serum örnekleri çözünme işlemi yapıldıktan sonra 0,3 ml serum örneği üzerine %1 'lik H_2SO_4 ihtiva eden etil alkolden 0,3 ml ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Karışım vortekslenildikten sonra 2500 devirde 5 dakika santrifüjlendi. Sonra örnekler üzerine 250 μ l 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 μ l 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 μ l metanolde çözüldü. HPLC'de analiz edildi. Örneklerdeki E vitamini 296 nm ve A vitamini 326 nm dalga boyunda İnertsil 5 μ 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 [162,163].

3.3. *In Vitro* Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.3.1. Kullanılacak Yardımcı Aletler ve Cihazlar

Santrifuj, homojenizatör, HPLC cihazı, UV spektrofotometre, vorteks, otomatik pipetler, derin dondurucu, vida kapaklı deney tüpleri ve santrifüj tüpleri.

3.3.2. *In vitro* Yöntemlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

1. 0.2 M Fosfat Tamponu (pH=6.6): 6,24 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ bir miktar distile suda çözülerek 250 mL'ye yakın bir hacme tamamlandı ve pH metre kullanılarak NaOH çözeltisiyle pH=6.6'ya ayarlandı.
2. % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi: 2,5 g $K_3Fe(CN)_6$ 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 $FeCl_3$ çözeltisi: 83 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ distile suda çözüldü, toplam hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

5. 60 μ M PMS çözeltisi: Önce 18 mg PMS alındı ve toplam hacim 1 litreye fosfat tamponuyla (pH=7.4, 0.1 M) tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 10 mL alındı ve 100 mL'ye aynı tamponla seyreltildi.
6. 468 μ M NADH çözeltisi: 34 mg NADH alındı ve toplam hacim 100 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0.1 M, pH=7.4) tamamlandı.
7. 150 μ M NBT çözeltisi: 6.1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0.1 M, pH=7.4) tamamlandı.
8. 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.
9. 43 mM H_2O_2 çözeltisi: % 30'luk H_2O_2 'den 343 μ L alındı ve 0.1 M'lık fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
10. 2 mM FeCl_2 çözeltisi: 0,02 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ alındı ve hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
11. 5 mM Ferrozin çözeltisi: 0,123 g Ferrozin alındı, bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
12. 200 mM, 5ml Deoksiriboz çözeltisi: 0,135 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
13. 20 mM, 50ml $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,278 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
14. 10 mM, 50ml EDTA Çözeltisi: 0,011 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
15. 1 M, 50 ml H_2O_2 çözeltisi: 5,107 ml alınıp 50 ml'ye tamamlandı.
16. 500 mM, 5ml Askorbik Asit çözeltisi: 0,495 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
17. 50 mM, 50 ml KH_2PO_4 çözeltisi: 0,345 gr alınıp bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.3.3. *İn Vitro* Antioksidant Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.3.3.1. İndirgeme Kuvveti Tayini

Test bileşiklerinin (L1-L5) indirgeme kuvveti Oyaizu [164] metoduyla Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye transformasyonuna göre yapıldı. Farklı konsantrasyondaki DMSO' da çözülmüş örneklerden (50,100, 250 $\mu\text{g/ml}$) 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 ferrosiyaniür ($K_3[Fe(CN)_6]$) 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 $FeCl_3$ 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 α -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.

3.3.3.2. Metal Şelatlama Aktivitesi

Test bileşiklerinin (L1-L5) metal şelatlama aktiviteleri, Dinis ve ark.,'nın belirledikleri yöntem [165] göre yapıldı. Bu işlem için farklı konsantrasyondaki (50,100,250 $\mu\text{g/mL}$) örneklerden 0.4 mL alınarak 2 mM'lık ve 0,05 mL $FeCl_2$ 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 çözülden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak test numuneler dışındaki geriye kalan çözelti kullanıldı. Metal şelatlama aktivitelerini karşılaştırmak için aynı konsantrasyonda standart antioksidan olarak kabul edilen α -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_0 = Kontrol Absorbansı

A_1 = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

3.3.3.3. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

Test bileşiklerinin (L1-L5) hidrojen peroksit giderme aktiviteleri Ruch ve ark.,'nın belirledikleri yöntem [166] göre yapıldı. 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 µg/ml) test örneklerinden alınarak hacimleri 3,4 ml'ye kadar tampon çözelti ile tamamlandı. Bu işlemlerden sonra 0,6 mL'lik 43 mM'lık H₂O₂ 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 test numunelerin dışında geriye kalan çözelti kullanıldı. Hidrojen peroksit giderme aktivitelerini karşılaştırmak için test örnekleriyle 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 H₂O₂ Giderme Aktivitesi olarak değerlendirilir. Yüzde H₂O₂ Giderme Aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır:

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

A₀ = Kontrol Absorbansı

A₁ = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

3.3.3.4. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

Test bileşiklerinin (L1-L5) süperoksit radikali giderme aktivitesi Liu ve ark.,'nın yapmış olduğu yöntem [167] göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi. Buna göre; çalışmada test 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 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 test bileşiğinin eksik olduğu 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_0 = Kontrol Absorbansı

A_1 = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

3.3.3.5. Deoksiriboz Degredasyonu ile Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

Bu yöntemde enzimatik olmayan, deoksiriboz degredasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı. Test bileşiklerin hidroksil radikali (OH[•]) yok etme aktiviteleri Halliwell ve ark. (168) metoduna göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı; Farklı konsantrasyondaki DMSO' da çözülmüş örneklerden (50,100, 250 µg/ml) 50 µL alınıp, 150 µL deoksiriboz (200mM 5ml), 60 µL FeSO₄.7H₂O (20mM 50ml), 30 µL EDTA (10mM 50ml), 150 µL (1 M 50ml) H₂O₂ ve 60 µL (500mM 5ml) askorbik asit çözeltisinden oluşturuldu ve karışıma 2.5 ml KH₂PO₄ 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 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_0 kontrolün absorbansı, A_1 örneklerin absorbansı olarak alınmıştır.

3.3.4. *In vitro* Antioksidan yöntem olarak *Saccharomyces cerevisiae* Örneklerindeki Ölçümler

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri kullanıldı. 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 10^6 hücre/mL alınarak deneysel çalışmalar gerçekleştirildi. Bu hücreler sıklıkla moleküler düzeyde oksidatif strese metabolizmanın cevabı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır [169,170]. 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 μ M ve 100 μ M 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 10^6 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 250 μ L ve 0.5 M HClO₄'den 750 μ L ilave edilerek çalkalandı. Hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi [161].

3.3.5. *In Vitro* Antitümör Özelliklerin Araştırılması

3.3.5.1. 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 CO₂ - %95 O₂ inkübatörüne (Plymouth, MN, ABD) yerleştirildi. Günlük olarak hücrelerin durumu Soif marka (Soif Optical Inc., Çin) bir inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi ve üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC5 çekilerek 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 5×10^6 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 [171,172].

3.3.5.2. 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 süspansiyon haline gelmeleri sağlandı. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı MCF-7 hücre deneyleri için 1×10^6 / ml hücreye ayarlandı. Bu şekilde dozların 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M olmasına karar verildi [173].

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ 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 [174].

3.4.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel 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 \pm SD olarak verildi. Kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıklarda $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ değerleri kullanıldı.

4. DENEYSEL BULGULAR

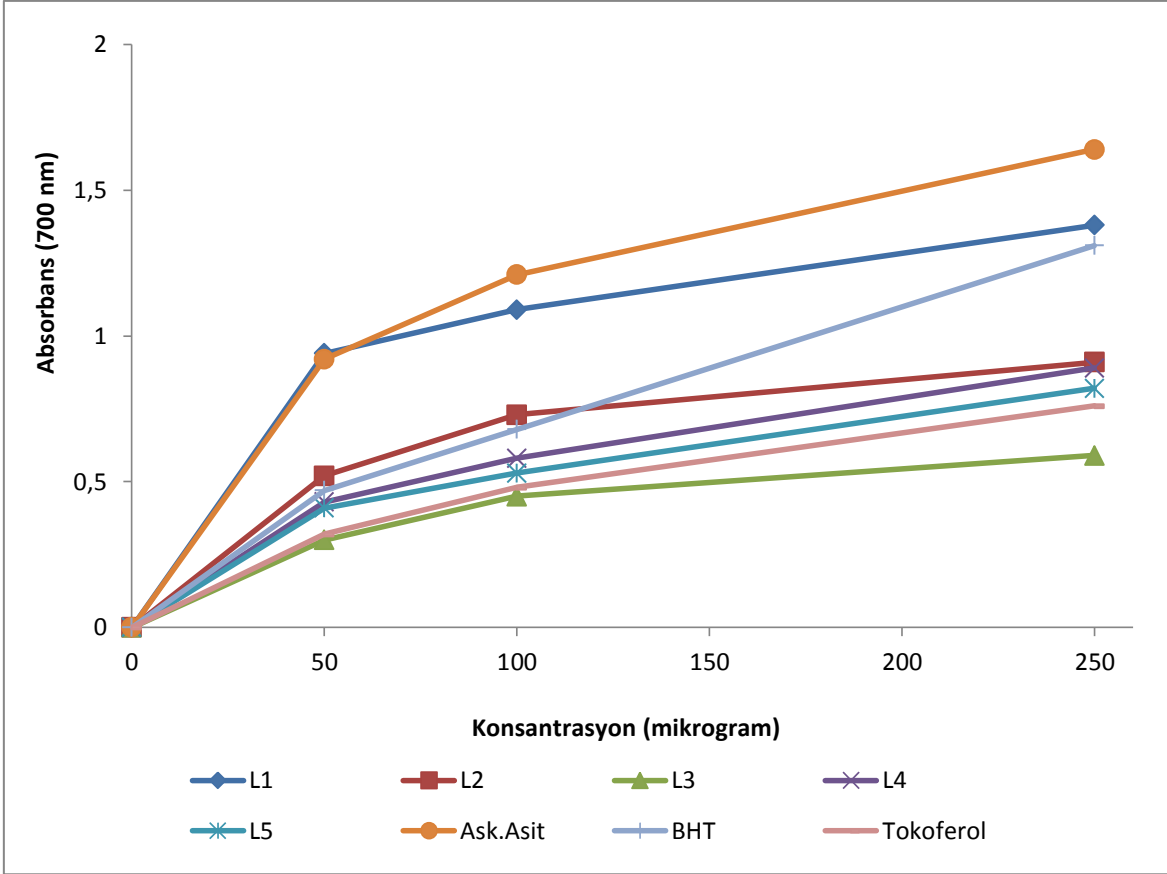
4.1. İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Bulgular

Çalışmada kullanılan bütün test bileşiklerinin indirgeme kuvveti Oyaizu metoduna [164] göre, Fe^{+3} , un Fe^{+2} , ye dönüşümüne göre yapıldı. Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi, o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir indikatoru olarak bilinir [142]. İndirgeme kuvveti her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/ml}$ 'lerinin içinde bulunduğu çözeltilerinin 700 nm'de absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

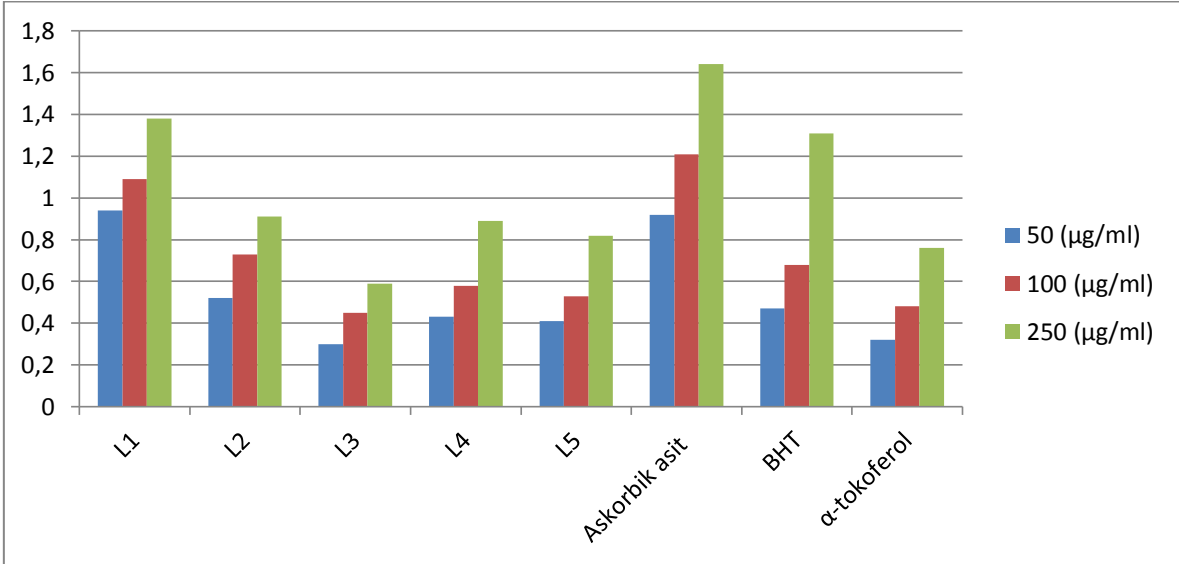
Çizelge 4.1 Test bileşikleri ve standart antioksidanların absorbans sonuçları.

Test Bileşikleri	İndirgeme kuvveti 50 $\mu\text{g/ml}$	İndirgeme kuvveti 100 $\mu\text{g/ml}$	İndirgeme kuvveti 250 $\mu\text{g/ml}$
L1	0,94	1,09	1,38
L2	0,52	0,73	0,91
L3	0,3	0,45	0,59
L4	0,43	0,58	0,89
L5	0,41	0,53	0,82
Askorbik asit	0,92	1,21	1,64
BHT	0,47	0,68	1,31
α -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 de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Test bileşikleri ve standart antioksidanların absorbans grafikleri.



Şekil 4.2 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı absorbans grafikleri.

Yukarıdaki şekillerdeki grafikleri incelediğimizde, 50 µg/ml konsantrasyona göre indirgeme kuvveti kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır; L1>Askorbik asit>L2 >BHT>L4>L5>α –Tokoferol>L3. 100µg/ml konsantrasyona göre ise; Askorbik asit>L1 >L2>BHT>L4>L5>α –Tokoferol>L3. En yüksek konsantrasyona göre (250 µg/ml) indirgeme kuvveti kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır; Askorbik asit>L1>BHT >L2>L4>L5>α –Tokoferol>L3.

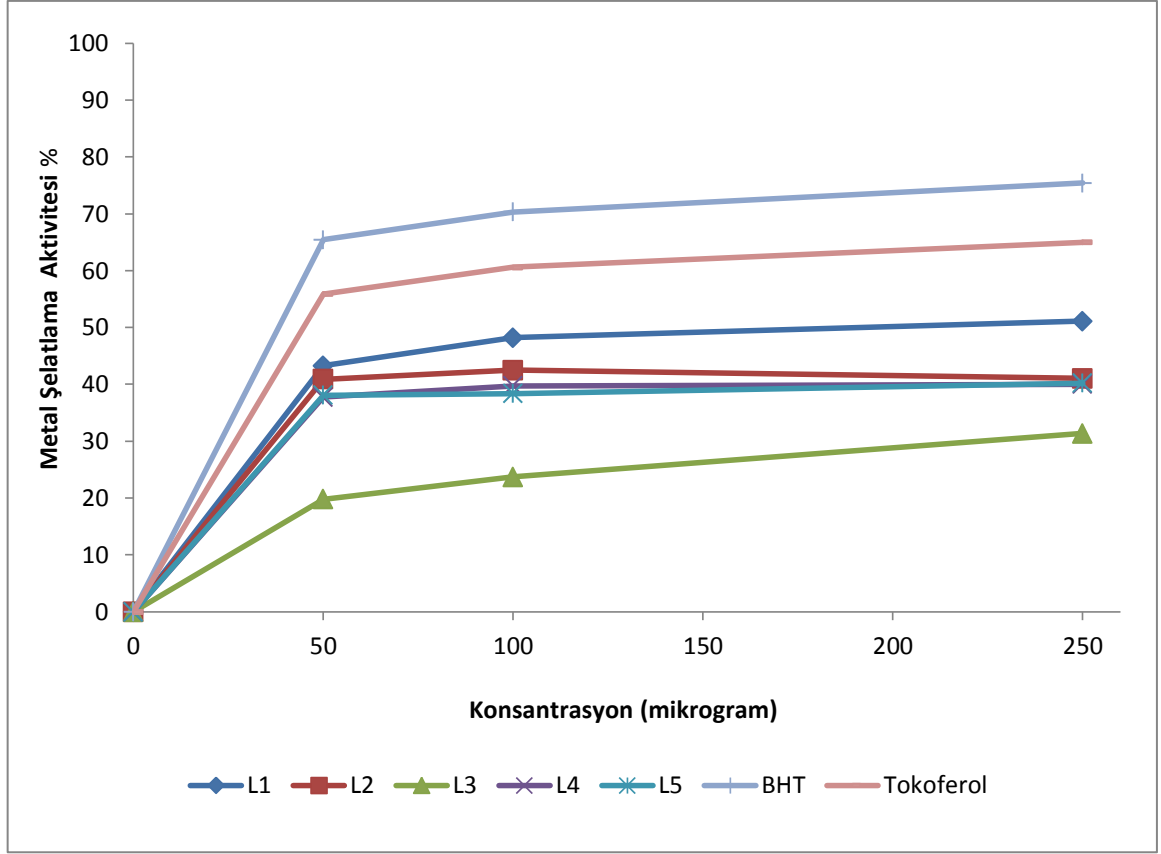
4.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular

Metal şelatlama aktivitesi lipid peroksidasyonuna sebep olan metalleri tutukladığından dolayı önemlidir [146]. Fenton kimyasında da görüldüğü gibi antioksidan kapasite açısından OH[•] radikallerinin oluşmasına sebep olan Fe⁺² ve Cu⁺ gibi metallerin tutklanmasında son derece önemlidir. Test bileşikleri veya standart antioksidantların varlığında ferrozin-Fe⁺² kompleksi, tam meydana gelmez. Bu durum kullanılan bileşiklerin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir. Metal şelatlama aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen α-tokoferol ve BHT örneklerinin 562 nm’de absorbansları alınmış ve tutuklanan metalin yüzdesi hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

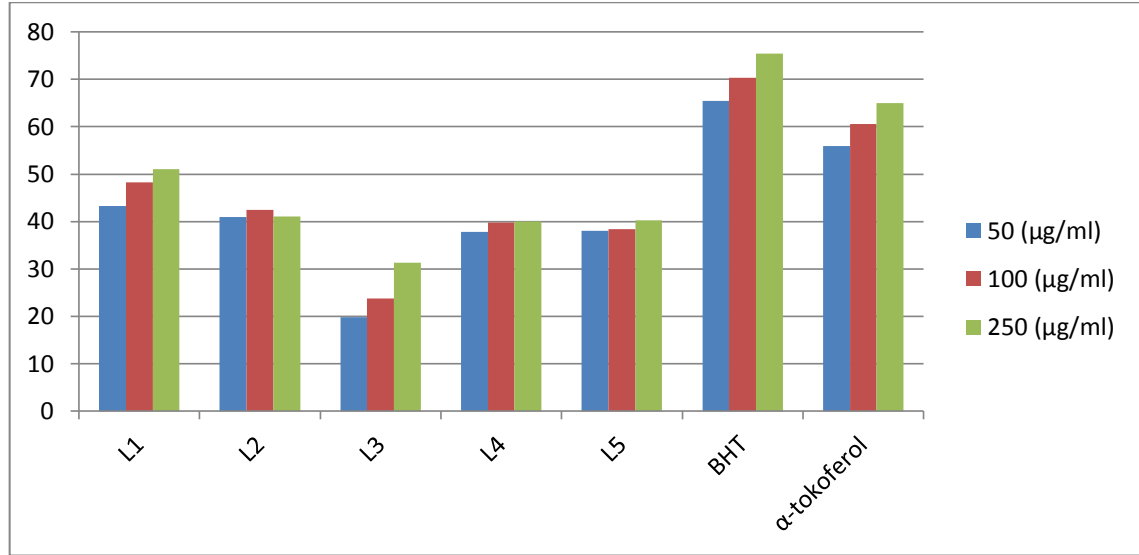
Çizelge 4.2 Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzdeleri.

Test Bileşikleri	Metal Şelatlama Aktivitesi 50 (µg/ml)	Metal Şelatlama Aktivitesi 100 (µg/ml)	Metal Şelatlama Aktivitesi 250 (µg/ml)
L1	43,25	48,22	51,09
L2	40,91	42,5	41,03
L3	19,8	23,71	31,33
L4	37,77	39,74	40,03
L5	38,08	38,37	40,22
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 4.3 Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama yüzde grafikleri.



Şekil 4.4 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri.

Yukarıdaki grafikleri incelediğimizde, 50 µg/ml konsantrasyona göre metal şelatlama aktiviteleri şu şekilde sıralanmıştır; BHT> α –Tokoferol>L1>L2 >L5>L4 >L3. 100µg/ml konsantrasyona göre ise; BHT> α –Tokoferol>L1>L2 >L4>L5>L3. En yüksek konsantrasyona göre (250 µg/ml) metal şelatlama aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; BHT >α –Tokoferol>L1>L2>L5>L4>L3.

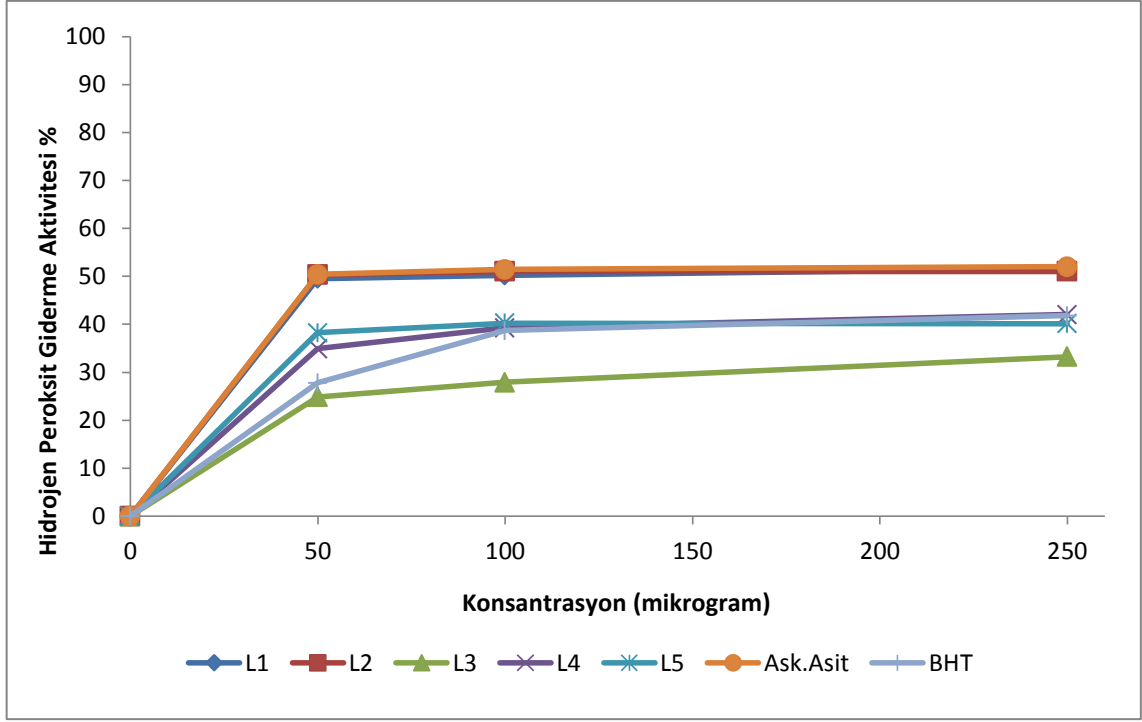
4.3. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular

H₂O₂, kendisi çok reaktif bir ürün olmamasına rağmen zaman zaman hücrelerin toksisitesine sebep olabilmekte ve hücrelerde hidroksil radikallerinin artmasını sağlamaktadır [145]. Özellikle Fe⁺² ve Cu⁺ gibi metal iyonlarının varlığında kolayca OH[•]e dönüşebilmektedir. Bu yüzden hücre ve gıda sistemlerinde H₂O₂'nin giderilmesi çok önemlidir.

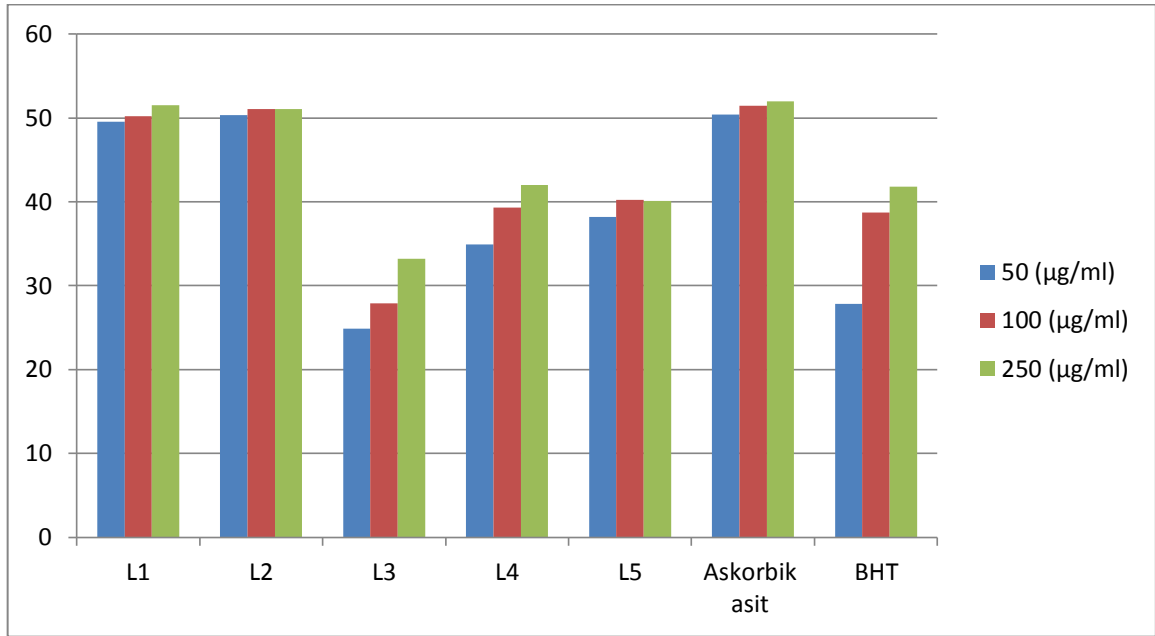
Hidrojen peroksit giderme aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen α-tokoferol, ve BHT örneklerinin 230 nm'deki absorbansları alınmış ve yüzdesi hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde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

Çizelge 4.3 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	49,58	50,23	51,55
L2	50,35	51,05	51,03
L3	24,88	27,91	33,23
L4	34,89	39,31	42,03
L5	38,23	40,25	40,12
Askorbik asit	50,43	51,45	52,01
BHT	27,82	38,71	41,83



Şekil 4.5 Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme yüzde grafiği.



Şekil 4.6 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidrojen peroksit giderme yüzdeleri.

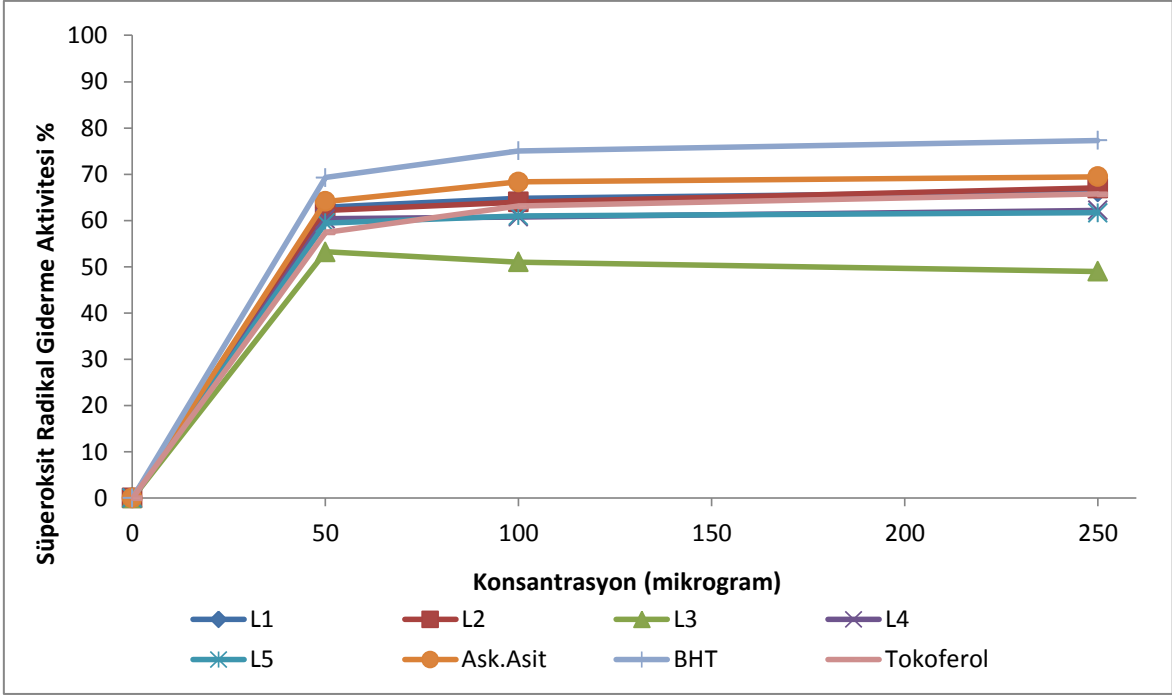
Yukarıdaki çizelge ve grafiklere baktığımızda 50 µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlarına göre hidrojen peroksit giderme aktiviteleri şu şekilde sıralanmıştır; Askorbik asit> L2>L1> L5>L4> BHT>L3. En yüksek konsantrasyona göre (250 µg/ml) H₂O₂ giderme aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; Askorbik asit>L1>L2> L4>BHT>L5>L3.

4.4. Süperoksit radikali Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular

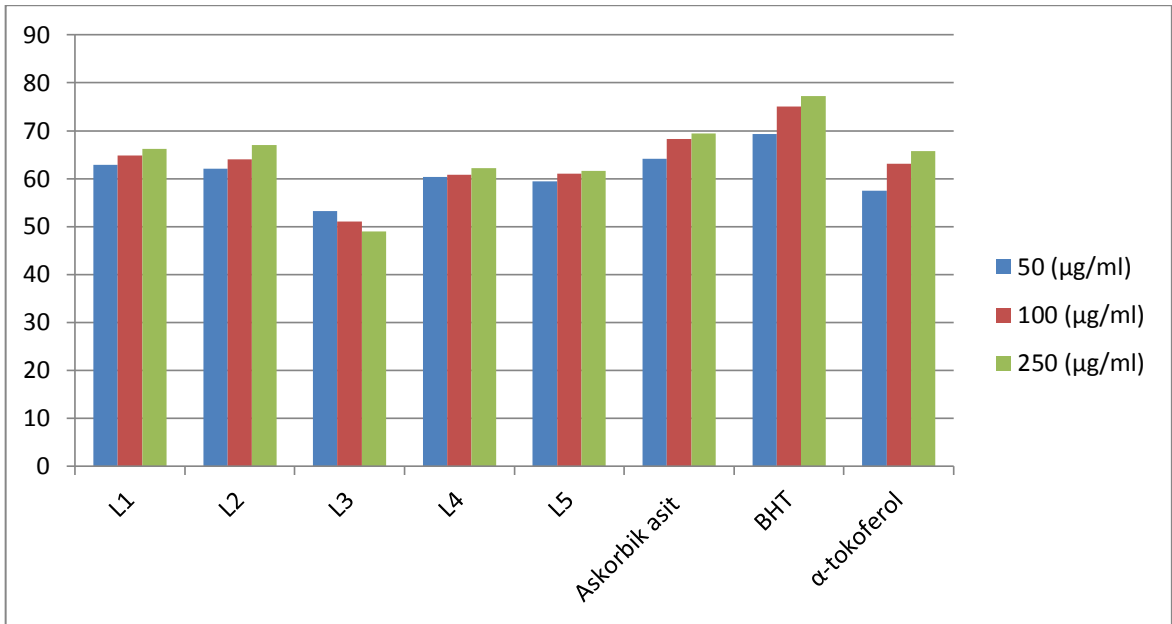
PMS/NADH-NBT sisteminde, PMS/NADH çifti tarafından meydana getirilen süperoksit anyonlarının NBT'yi indirgeme reaksiyonlarına dayanmaktadır. İndirgenmiş NBT urunu ise 560 nm'de maksimum aktivite göstermektedir. Reaksiyon karışımında absorptans azalması, süperoksit anyonlarının giderildiğini ve dolayısıyla antioksidant aktiviteyi göstermektedir Süperoksit radikali giderme aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml 'ların içinde bulunduğu çözeltilerinin 560 nm'de absorptanslarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

Çizelge 4.4 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	62,88	64,84	66,18
L2	62,11	63,98	67,01
L3	53,21	51,01	48,98
L4	60,33	60,77	62,19
L5	59,48	61,01	61,66
Askorbik asit	64,11	68,33	69,45
BHT	69,3	75,05	77,29
α-tokoferol	57,44	63,12	65,73



Şekil 4.7 Test bileşikleri ve standart antioksidanların süperoksit giderme yüzde grafiği.



Şekil 4.8. Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı süperoksit giderme yüzdeleri.

Yukarıdaki grafiklere baktığımızda süperoksit radikali giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. 50 µg/ml konsantrasyona göre süperoksit radikal giderme aktiviteleri şu şekilde sıralanmıştır; Askorbik asit>BHT>L1>L2 >L4>L5>α –

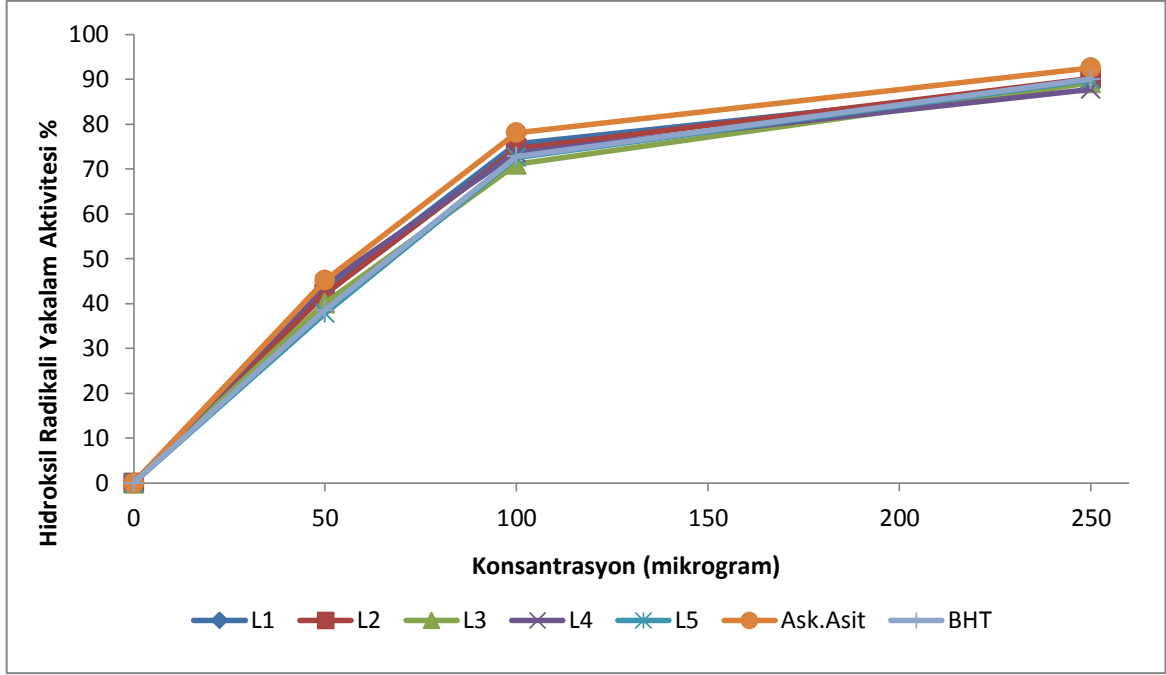
Tokoferol>L3. 100µg/ml konsantrasyona göre ise; BHT> Askorbik asit>L1>L2 >α – Tokoferol>L5>L4>L3. En yüksek konsantrasyona göre (250 µg/ml) süperoksit radikali giderme aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; BHT >Askorbik asit >L2>L1> α – Tokoferol>L4>L5>L3

4.5. Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi Tayini İle İlgili Bulgular

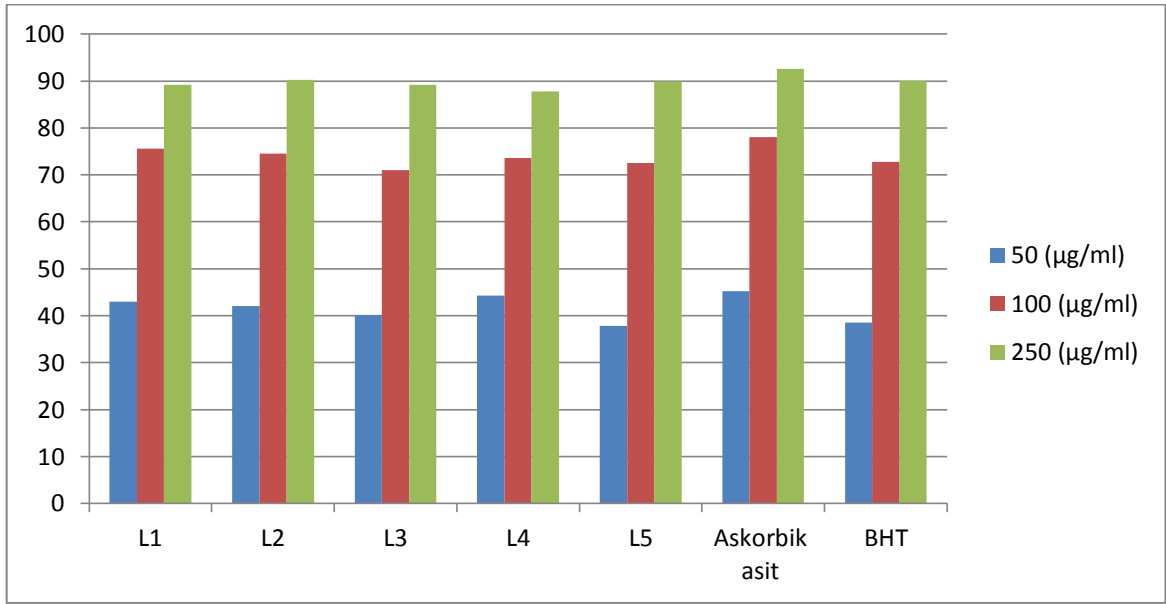
Bu yöntemde enzimatik olmayan, deoksiriboz degradasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı. Hidroksil radikali yakalama aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen α-tokoferol ve BHT örneklerinin 532 nm'deki absorbansları alınmış ve yüzdesi hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur.

Çizelge 4.5 Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil Rad. 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	43,01	75,55	89,23
L2	42,11	74,52	90,25
L3	40,13	71,03	89,21
L4	44,33	73,58	87,77
L5	37,85	72,54	89,84
Askorbik asit	45,21	78,07	92,54
BHT	38,52	72,82	90,02



Şekil 4.9 Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama grafiği.



Şekil 4.10 Test bileşikleri ve standart antioksidanların karşılaştırmalı hidroksil radikali yakalama yüzdeleri.

Yukarıdaki şekillerde grafiklere baktığımızda hidroksil radikali yakalama aktivitesi artan konsantrasyonla arttığı görülmüştür. 50 µg/ml konsantrasyona göre hidroksil radikali yakalama aktiviteleri şu şekilde sıralanmıştır; Askorbik asit >L4>L1 >L2> L3>BHT>L5 100µg/ml konsantrasyona göre ise; Askorbik asit >L1>L2>L4 >BHT>L5>L3>. En yüksek konsantrasyona göre (250µg/ml) hidroksil radikali yakalama aktivitesi şu şekilde sıralanmaktadır; Askorbik asit >L2>BHT >L5>L1>L3>L4.

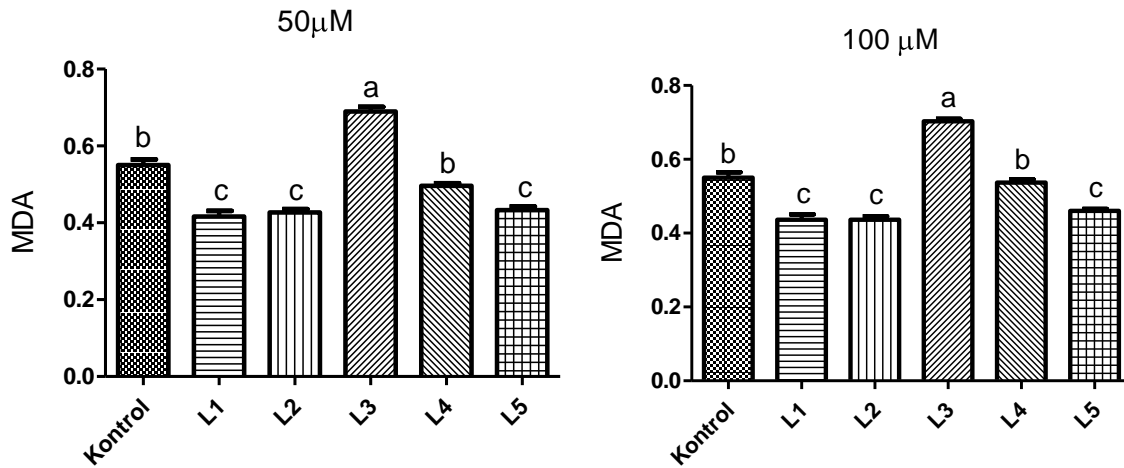
4.6. *In vitro* Antioksidan yöntem olarak *Saccharomyces cerevisiae* örneklerindeki ölçümler

Test maddeleriyle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeylerine ait sonuçlar çizelge ve şekillerde verilmiştir.

Çizelge 4.6 Bileşiklerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA Düzeylerinin Dozlara Göre Ortalama Değerleri

Parametre	Gruplar						--P-- -
	Kontrol	L1	L2	L3	L4	L5	
MDA 50 µM (mg/2.10 ⁶ hücre)	0,55±0,02 ^b	0,42±0,02 ^c	0,43±0,09 ^c	0,69±0,01 ^a	0,50±0,01 ^b	0,43±0,01 ^c	***
MDA 100 µM (mg/2.10 ⁶ hücre)	0,55±0,02 ^b	0,44±0,02 ^c	0,44±0,01 ^c	0,70±0,01 ^a	0,54±0,01 ^b	0,46±0,01 ^c	***

a-c 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 4.11 Bileşiklerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Sonuçlar incelendiğinde, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonda istatistiksel açıdan L1,L2 ve L5 maddeleri MDA değerini kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürürken L4 maddesinde kontrole yakın düzeyde olduğu bulunmuştur. L3 maddesinin ise kontrole göre MDA değerini anlamlı şekilde arttırdığı ve diğer test maddeleriyle de anlamlı farklılık gösterdiği söylenebilir.

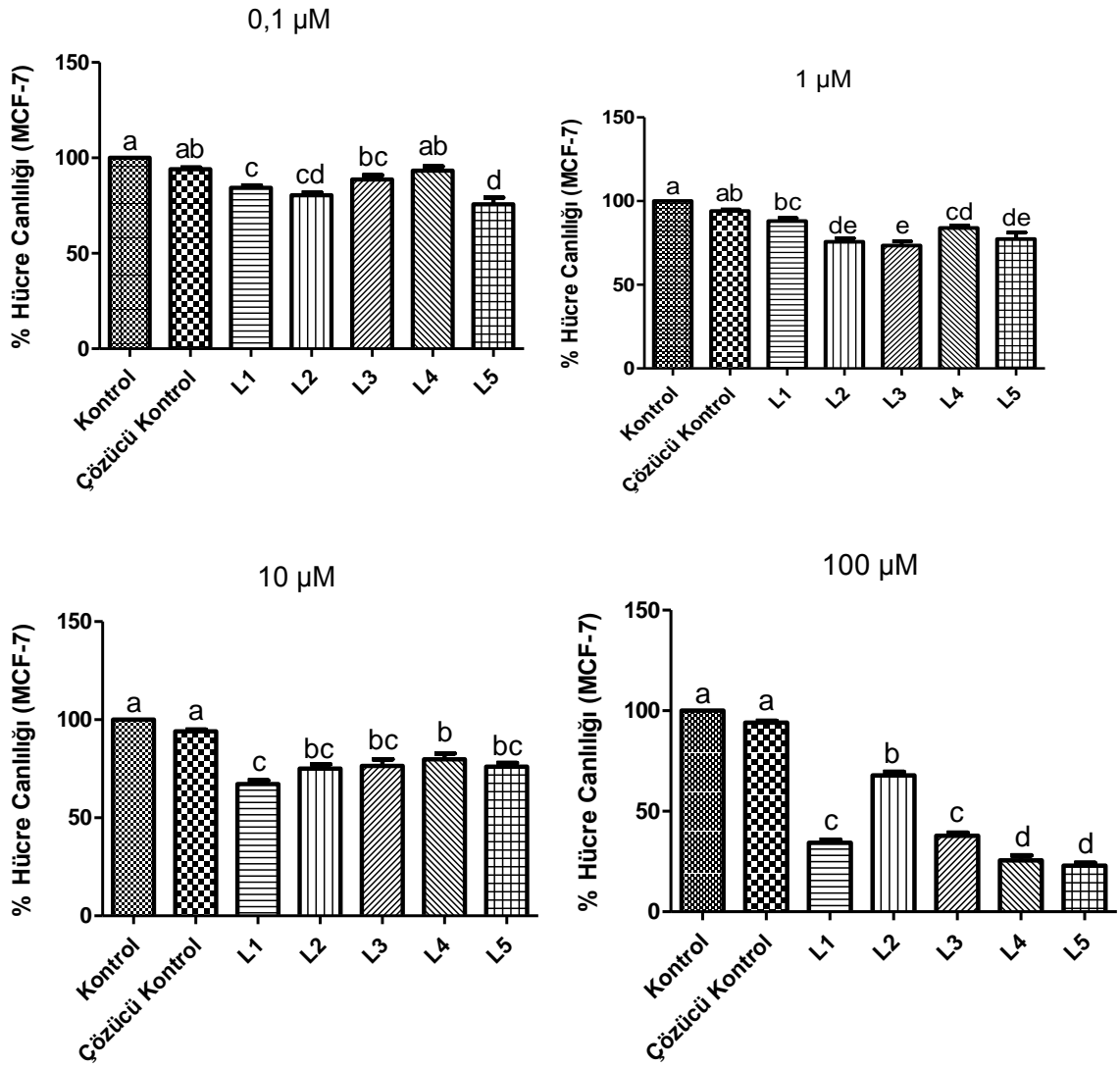
4.7. *In vitro* Antitümör özelliklerin araştırılması MCF-7

Test maddeleriyle muamele edilmiş MCF-7 (insan meme kanseri) hücrelerinin canlılık oranına ait sonuçlar çizelge ve grafik olarak aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.7 Bileşiklerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre % de oranında canlılık durumları

% Hücre Canlılığı (MCF-7)	Gruplar							--P--
	Kontrol	Çözücü Kontrol	L1	L2	L3	L4	L5	
0,1 µM	100±0,00 ^a	94,05±0,83 ^{ab}	84,33±1,21 ^c	80,40±1,37 ^{cd}	88,72±2,17 ^{bc}	93,36±2,21 ^{ab}	75,67±3,56 ^d	***
1 µM	100±0,00 ^a	94,05±0,83 ^{ab}	88,08±1,72 ^{bc}	75,71±2,04 ^{de}	73,49±2,45 ^e	83,90±1,53 ^{cd}	77,34±3,90 ^{de}	***
10 µM	100±0,00 ^a	94,05±0,83 ^a	67,23±1,76 ^c	75,10±2,14 ^{bc}	76,45±3,41 ^{bc}	79,78±3,00 ^b	76,11±1,83 ^{bc}	***
100 µM	100±0,00 ^a	94,05±0,83 ^a	34,25±1,58 ^c	67,81±1,80 ^b	37,77±1,56 ^c	25,54±2,58 ^d	22,87±1,47 ^d	***

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



Grafik 4.8 Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza göre % de oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 0,1 µM konsantrasyonda L5 maddesi, 1 µM konsantrasyonda L3 maddesi, 10 µM konsantrasyonda L1 maddesi, 100 µM konsantrasyonda L5 maddesinin istatistiksel açıdan en anlamlı şekilde ($P < 0.001$) kanserli hücreleri yok ettiğini tespit ettik. Bunun yanında çizelgede de görüldüğü üzere bazı konsantrasyonlarda L2 ve L4 maddelerinin de bileşiklerin kendi içinde ve kontrollerle kıyaslandığında yine anlamlı farklılık gösterdiği de söylenebilir.

4.8. *In vivo* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

4.8.1. Karaciğer Dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri

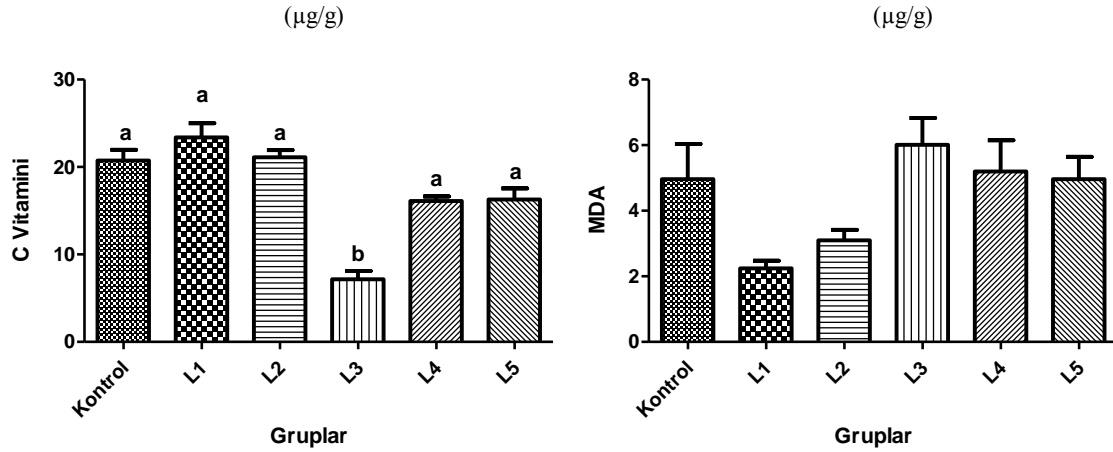
Test bileşiklerinin karaciğer dokusunda A,E ve C vitamini ve MDA üzerine etkilerine dair elde edilen sonuçlar aşağıda çizelge ve şekillerde verilmiştir.

Çizelge 4.9 Bileşiklerle muamele edilmiş karaciğer dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA düzeyleri.

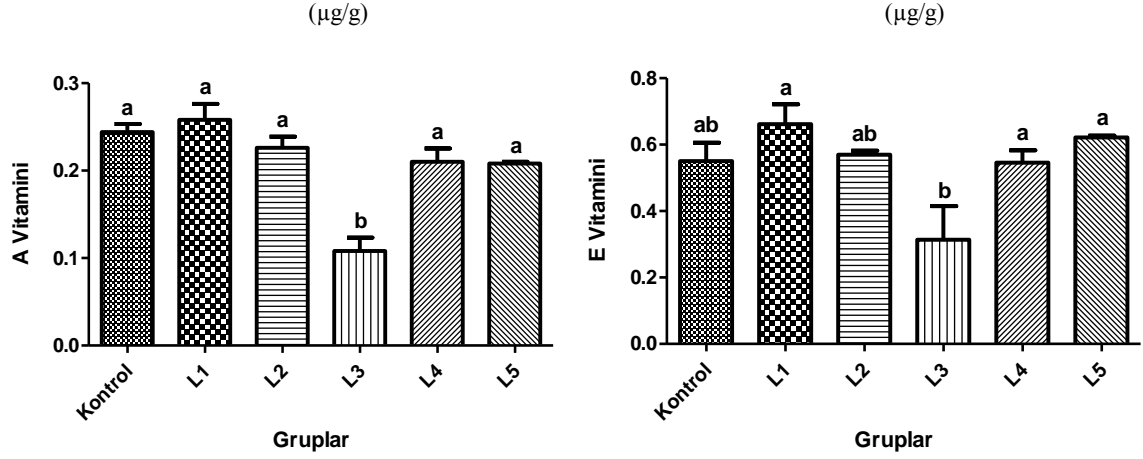
Parametre	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vit.(µg/g)	20,72±1,47 ^a	25,18±1,14 ^a	21,10±0,84 ^a	7,16±0,95 ^b	16,10±0,55 ^a	16,28±1,27 ^a	***
MDA(µg/g)	4,96±1,08	2,24±0,23	3,10±0,31	6,01±1,61	5,20±0,95	4,96±0,68	ÖD
A Vit. (µg/g)	0,24±0,01 ^a	0,26±0,02 ^a	0,23±0,01 ^a	0,11±0,02 ^b	0,21±0,02 ^a	0,21±0,01 ^a	***
E Vit. (µg/g)	0,55±0,06 ^a	0,66±0,06 ^a	0,57±0,01 ^{ab}	0,31±0,10 ^b	0,55±0,04 ^a	0,62±0,01 ^a	**

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

*P<0.05 ; **P<0.01 ; ***P<0.001 ; ÖD:Önemli değil, p>0.05



Şekil 4.12. Bileşiklerle muamele edilmiş karaciğer dokusundaki C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.



Şekil 4.13. Bileşiklerle muamele edilmiş karaciğer dokusundaki A ve E vitamini düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıdaki çizelge ve şekillerde gösterildiği gibi kontrole ve bileşiklerin kendi aralarındaki sonuçlara baktığımızda L3 bileşiğinin diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak daha farklı bir etkisinin olduğunu belirledik. Diğer bileşiklerin A, E ve C vitaminleri ve MDA 'ya etkilerinin birbirlerine ve kontrole göre farklı veya yakın olduğu görülmüştür. Bu sonuçların detaylı değerlendirilmesi tartışma kısmında yapılacaktır.

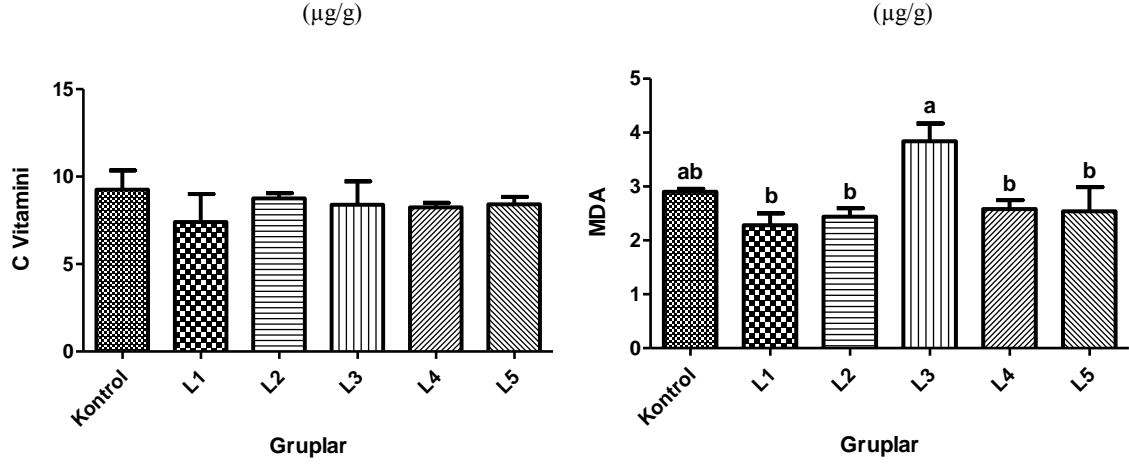
4.8.2. Böbrek Dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri

Test bileşiklerinin Böbrek dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkilerine dair elde edilen sonuçlar aşağıda çizelge ve şekillerde verilmiştir.

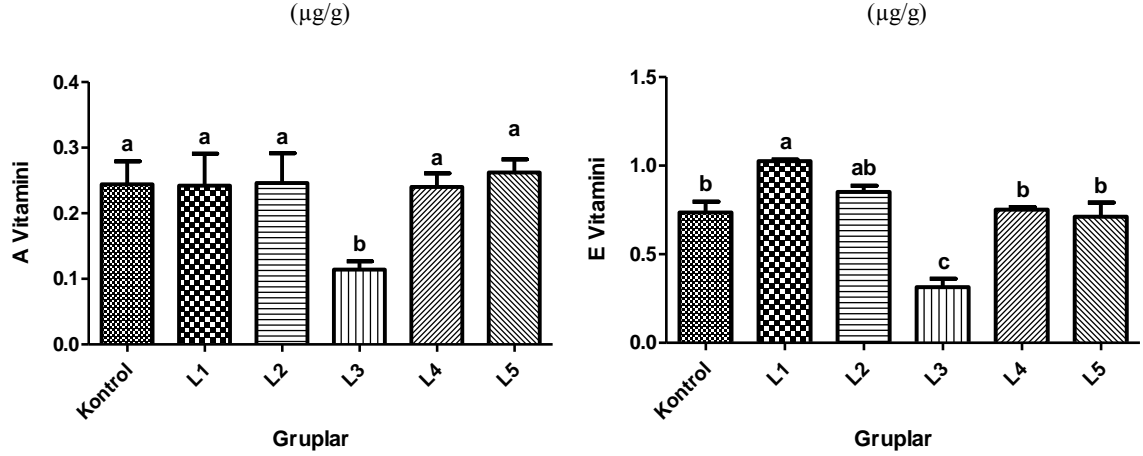
Çizelge 4.10 Bileşiklerle muamele edilmiş böbrek dokusundaki A, E ve C vitamini ve MDA düzeyleri.

Parametre	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vit. (µg/g)	9,26±1,09	7,40±1,60	8,76±0,29	8,40±1,33	8,24±0,27	8,42±0,42	ÖD
MDA(µg/g)	2,90±0,05 ^{ab}	2,28±0,22 ^b	2,44±0,16 ^b	3,84±0,33 ^a	2,58±0,17 ^b	2,54±0,45 ^b	**
A Vit. (µg/g)	0,24±0,02 ^a	0,24±0,01 ^a	0,23±0,05 ^a	0,11±0,01 ^b	0,24±0,02 ^a	0,26±0,02 ^a	**
E Vit (µg/g).	0,74±0,06 ^b	1,03±0,01 ^a	0,85±0,03 ^{ab}	0,31±0,05 ^c	0,75±0,01 ^b	0,71±0,08 ^b	***

a-c 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 4.14 Bileşiklerle muamele edilmiş böbrek dokusundaki C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri



Şekil 4.15 Bileşiklerle muamele edilmiş böbrek dokusundaki A ve E vitamini Düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

Yukarıdaki çizelge ve şekillerdeki grafiklerde gösterildiği gibi kontrole ve bileşiklerin kendi aralarındaki sonuçlara baktığımızda L3 bileşiğinin MDA'yı artırdığını, vitaminleri düşürdüğünü diğer bileşiklerin ise kontrole yakın düzeyde MDA'yı düşürdüğünü, vitaminleri de aynı seviyelerde tuttuğunu bulduk.

4.9. Kan Örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri

Test bileşiklerinin kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkilerine dair elde edilen sonuçlar aşağıda çizelge ve şekillerde verilmiştir.

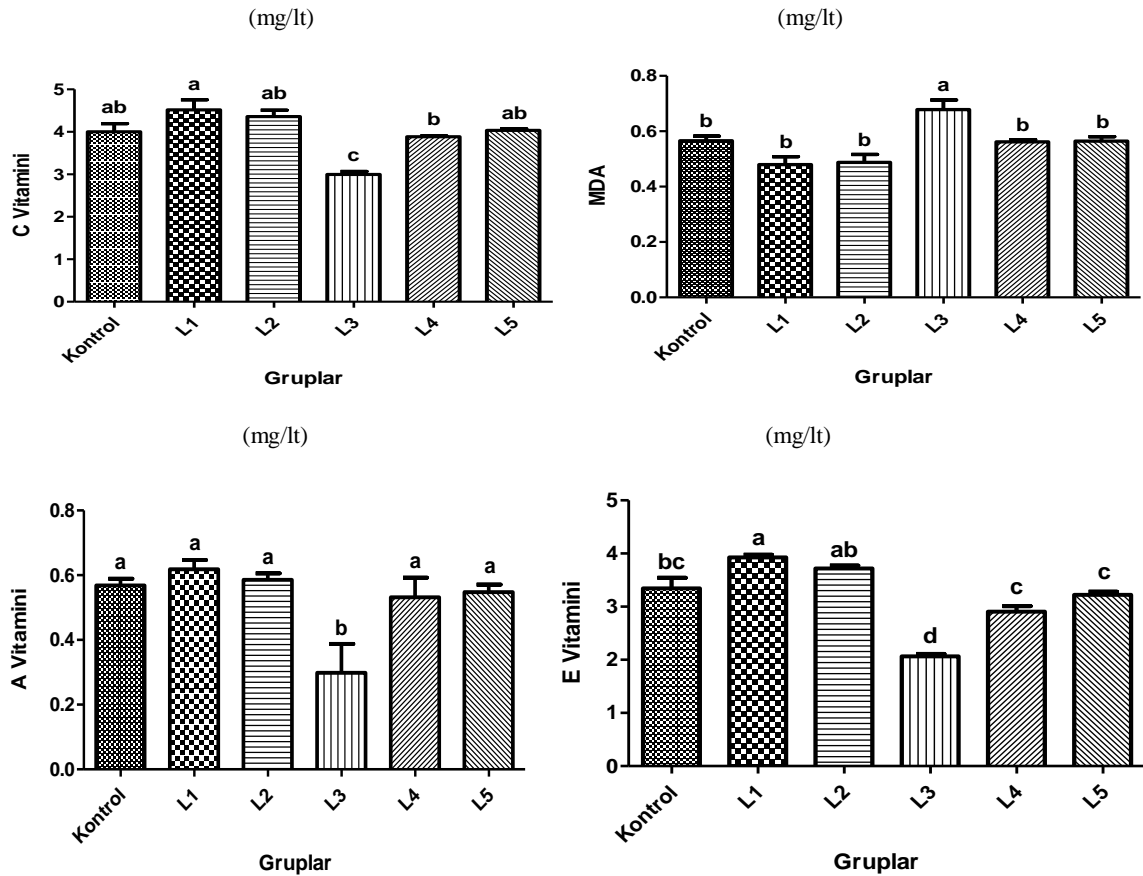
Aşağıdaki çizelge ve şekillerdeki grafiklerde gösterildiği gibi kontrole ve bileşiklerin kendi aralarındaki sonuçlara göre L3 bileşiğinin diğer bileşiklere göre daha farklı bir etkisinin olduğunu belirledik. Diğer bileşiklerin ise MDA'yı ve vitaminleri kontrole yakın düzeyde etkilediğini bulduk.

Çizelge 4.11 Bileşiklerle muamele edilmiş Kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA Düzeyleri

	Gruplar						---P---
	KONTROL	L1	L2	L3	L4	L5	
C Vit. (mg/lt)	4,00±0,19 ^{ab}	4,52±0,24 ^a	4,36±0,15 ^{ab}	3,00±0,71 ^c	3,88±0,23 ^b	4,036±0,36 ^a	***
MDA(mg/lt)	0,57±0,02 ^b	0,48±0,03 ^b	0,49±0,03 ^b	0,68±0,03 ^a	0,56±0,01 ^b	0,56±0,02 ^b	***
A Vit. (mg/lt)	0,57±0,02 ^a	0,62±0,03 ^a	0,59±0,02 ^a	0,30±0,09 ^b	0,53±0,06 ^a	0,55±0,02 ^a	**
E Vit. (mg/lt)	3,34±0,20 ^{bc}	3,93±0,05 ^a	3,72±0,05 ^{ab}	2,07±0,04 ^d	2,91±0,10 ^c	3,20±0,06 ^c	***

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 4.16 Bileşiklerle muamele edilmiş kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.

5. TARTIŞMA

İnsanların doğal metabolizmasında enerji kaynağı olan karbonun oksijen ile yanması sonucunda bazı etmenlerin etkisi ile; süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit gibi aktif oksijen formları olan serbest radikal olarak adlandırılan bir takım bileşikler ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller; vücuttaki hücrelerin membranına, hücre yapısında bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar vererek, kanser, koroner hastalıklar, diyabet, katarakt, karaciğer tahribatı gibi pekçok hastalığa neden olmaktadır. Antioksidan maddeler; serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, singlet oksijenini bağlayarak, metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarında metali bağlayarak ve oksidasyonun teşvik etmiş olduğu hasarları hücresel bakımdan engelleyerek dejeneratif hastalıkların oluşumunu engellerler [175].

Triazol bileşiklerinin son derece önemli antimikrobiyal, antitumor, antioksidan, enzim inhibitörü, antidepresan, antitüberküloz, antiinflamatuvar, antihipertansive gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [176-182].

Yapılan çalışmalar gün geçtikçe serbest radikallerin yeni ve çeşitli hastalıkların oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkilerin ortaya koymaktadır.

Triazol bileşikleri, oldukça geniş farmakolojik özelliklere sahip olmalarından dolayı biyokimya, organik kimya ve farmasötik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında bis 1,2,4- triazol içeren bazı mannich bazlarının farklı *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanarak antioksidan ve antitümör aktiviteleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler ve değerlendirmeler aşağıda sunulmuştur.

İndirgeme kuvveti aktivitesi

Test bileşiklerin yapılan indirgeme gücü testleri sonucunda ele geçen bulgular çizelge 4.14. ve şekil 4.13 ve 4.14.' de verilmiştir. Bu yöntemde, reaksiyon karışımının absorbansındaki artış numunenin yüksek indirgeme gücü olarak değerlendirilir. Çizelge 14. ve şekil 13-14.' de gösterilen bileşiklerden L1 test bileşiğinin tüm konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bileşikler kendi aralarında kıyaslandıklarında en düşük indirgeme aktivitesi gösteren

bileşimin L3, en yüksek aktiviteye sahip bileşimin ise L1 olduğu görülmüştür. L1 bileşimini L2, L4, L5 ve L3 bileşikleri takip etmiştir. Her bir bileşimin kendi içinde artan konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitesinde artış gösterdiği görülmüştür. Test bileşiklerini standart antioksidanlarla kıyasladığımızda ise tüm konsantrasyonda L1 test bileşiminin standart bir antioksidan olan askorbik asitin indirgeme kapasitesine yakın bir indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 µg/ml) L1 bileşiminin diğer standart antioksidanlardan (BHT ve α-tokoferol) çok daha yüksek indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Buna göre, L1 bileşiminin iyi bir indirgeme kuvvetine sahip olduğu söylenebilir. L2 bileşiminin 50 ve 100µg/ml konsantrasyonda standart antioksidanlardan BHT ve α-tokoferol den yüksek değerde, askorbik asitten ise daha düşük bir değerde aktivite gösterdiği görülmüştür. L3 maddesinin hem diğer test bileşiklerinden hem de standart antioksidanlardan, tüm konsantrasyonlarda düşük bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. L4 ve L5 bileşiklerinin aktivitesi tüm konsantrasyonlarda askorbik asit ve BHT den düşük α-tokoferol den ise yüksek değerde çıkmıştır.

Bileşiklerin indirgeme kapasiteleri potansiyel antioksidan aktivitelerinin anlamlı bir belirleyicisi olarak kullanılabilir [81]. Bu çalışmada indirgeyici özellikleri araştırılan bileşiklerden L3 bileşimi dışındaki tüm bileşiklerin absorbanslarının konsantrasyona ve antioksidan çeşidine bağlı olarak değişkenlik gösterse de standart antioksidanların absorbansından yüksek çıkabildiği görülmüştür. Bir bileşimin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Özellikle L1 bileşiminin en iyi aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle bu yöntemle göre bileşikler içerisinde L1 bileşiminin en iyi potansiyel antioksidan olabileceğini düşünebiliriz. Literatürde de elde ettiğimiz sonuçlarla uyum gösteren 1,2,4-triazollerin ve mannich bazlarının indirgeme kuvvetine bağlı olarak antioksidan etkisi olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada [183] 1,2,4-triazol türevlerinin iyi indirgeyici aktivite gösterdikleri gösterilmiştir. Başka bir çalışmada[184] bazı mannich bazlarının standart olarak kullanılan BHT ve Troloxdan çok daha iyi indirgeme gücü göstererek antioksidan etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Diğer bir çalışmada [185] ise 1,2,4-triazol türevlerine bakılmış ve standartlardan düşük olmasına rağmen iyi sayılabilecek düzeyde indirgeme aktivitesine

sahip oldukları belirlenmiştir. Başka bir çalışmada [186] da triazol türevlerinin iyi indirgeyici oldukları gösterilmiştir.

Metal şelatlama aktivitesi

Çizelge 4.15. ve şekil 4.15 ve 4.16.' da test bileşiklerinin ve standartların metal şelatlama aktiviteleri % inhibisyon olarak gösterilmektedir. Test bileşiklerinin tümünün metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları görülmektedir. Ancak test bileşiklerini standart antioksidanlarla kıyasladığımızda tüm konsantrasyonlarda, tüm test bileşiklerinin standart antioksidan olan BHT ve α -tokoferol den daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle test bileşiklerin standart antioksidanlardan daha iyi şelatör olduklarını söyleyemeyiz. Bu bileşikler arasında L1 test bileşiğimizin tüm konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir metal şelatlama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Bileşikler kendi aralarında kıyaslandıklarında en düşük metal şelatlama aktivitesine L3 bileşiğinin, en yüksek aktiviteye ise L1 bileşiğinin sahip olduğu görülmüştür. L1 bileşiğini L2, L4, L5 ve L3 bileşikleri takip etmiştir. Genel olarak bakıldığında bu bileşikler arasında L1 bileşiğinin konsantrasyonu arttıkça standart antioksidanlara yaklaşan değerde şelatörlük gösterdiği için test bileşikleri içerisinde L1 bileşiğinin iyi seviyede metal şelatlama aktivitesine sahip olduğu söylenebilir. Literatürde de triazollerin antioksidan etkilerini ortaya koymak için metal şelatlama aktivitesine bakılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde [187] 1,2,4 triazol türevlerinin iyi bir şelatör olup antioksidan potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada [186] iyi şelatör olarak ortaya çıkan triazol türevleri tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise [188], (1,2,4)-Triazol türevlerinin metal şelatlamalarına bakılarak antioksidan etkileri ortaya konulmuştur. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler de literatürdeki yapılan bu çalışmaları destekler nitelikte olup bis 1,2,4- triazol türevlerinin şelatör aktivitelerini ortaya koymuştur.

Hidrojen peroksit giderme aktivitesi

Test bileşiklerinin yapılan hidrojen peroksit giderme aktivitesi sonucunda elde edilen bulgular çizelge 4.16. ve şekil 4.17. ve 4.18.' de gösterilmektedir. H_2O_2 giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. Bileşikler kendi aralarında kıyaslandıklarında L3 tüm konsantrasyonda en düşük aktiviteyi göstermiş, en yüksek aktiviteye sahip bileşiğin ise L1 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçları incelediğimizde

L1 bileşimini, en yüksek konsantrasyonda (250 µg/ml) en yüksek aktiviteyi gösteren bileşik olmuştur. L4 ve L5 bileşikleri ise birbirlerine yakın düzeyde aktivite göstermiş olup L1 ve L2 bileşiklerinin ardından sıralanmışlardır. Test bileşiklerini standart antioksidanlarla kıyasladığımızda ise tüm konsantrasyonlarda, L3 dışındaki tüm test bileşiklerinin standart antioksidan olan BHT' den daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Buna karşın tüm test bileşiklerinin standart antioksidan olan askorbik asitten daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. L3 bileşiminde ise düşük düzeyde aktivite belirlenmiştir. Diğer bileşiklerden L4 ve L5' te ise aktivite orta düzeydedir. Diğer taraftan özellikle L1 ve L2 bileşiklerinin askorbik asite çok yakın düzeyde bir aktiviteye sahip olduğu da görülmüştür. Bu sonuçlara göre L1 ve L2' nin tüm test bileşiklerin içinde en iyi H₂O₂ giderme aktivitesine sahip bileşikler olduğu ortaya çıkmıştır. Literatürde bizim sonuçlarımızla uyum gösteren, 1,2,4, triazol bileşiklerinin H₂O₂ giderme etkisine sahip bileşikler olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada [189] bazı mannich bazlarının orta düzeyde H₂O₂ giderme aktivitesi ortaya konulmuştur. Ayrıca başka bir çalışmada [190] da antioksidan etkilerini değerlendirmek için hidrojen peroksit aktivitelerine bakılmış ve iyi seviide aktivite gösteren triazoller tespit edilmiştir.

Süperoksit radikali giderme aktivitesi

Test edilen bileşiklerin ölçülen süperoksit radikalini giderme aktiviteleri sonuçlarında elde edilen bulgular çizelge 4-17. ve şekil 4-19. ve 4-20.' de verilmiştir. Süperoksit radikali giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda en yüksek aktiviteyi L1 bileşiği göstermiş olmasına karşın en yüksek konsantrasyonda en iyi aktiviteyi ise L2 bileşiği göstermiştir. Elde edilen bulgulara göre L1 ve L2 bileşiklerinin 50 µg/ml'de yakın düzeyde aktiviteye sahip olduğu görülmüş olup benzer durum L4 ve L5 bileşikleri için de geçerlidir. Test bileşikleri içerisinde en düşük aktivite L3 de görülmüştür. L5 bileşiği için 100 ve 250 µg/ml'lerdeki aktivitesinin benzer olduğu tespit edilmiştir. Aynı durumun L4 bileşiği için 50 ve 100µg/ml' de de olduğu belirlenmiştir. Antioksidan standartlarla kıyaslandığında hiçbir test bileşiğinin askorbik asit ve BHT aktivitelerini geçemediği görülmüştür. Diğer taraftan L1 ve L2'nin tüm konsantrasyonlardaki aktivitelerinin α -tokoferol' den daha iyi olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bileşikler arasında L1 ve L2 bileşiklerinin süperoksit radikali giderme aktivitesinin en iyi olduğu söylenebilir. Diğer bileşiklerden L4 ve L5'in

de artan konsantrasyona bağlı olarak standart antioksidanların aktivitelerine yakın aktivite gösterdikleri için bu bileşiklerin de süperoksit radikali üzerine iyi bir aktivitesi olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde de 1,2,4, triazol yapısındaki bazı türevlerin süperoksit radikalini giderme aktivitelerine bakılmıştır. Örneğin bir çalışmada 1,2,4, triazol türevleri araştırıldığında bakılmış iyi olabilecek düzeyde bazı süperoksit radikal giderme aktivitesine sahip türevler tespit edilmiştir [191].

Hidroksil radikali yakalama aktivitesi

Test bileşiklerin yapılan deoksiriboz degradasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması sonucunda ele geçen bulgular çizelge 4.20. ve şekil 4.19. ve 4.20.'de verilmiştir. 532 nm'de yapılan ölçümlerde test bileşiklerinin absorbanları, 50,100,250 µg/ml konsantrasyonlarda askorbik asit ve BHT standart antioksidanlarla kıyaslanmıştır. Hidroksil radikali yakalama aktivitesinin artan konsantrasyonla arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçları incelediğimizde L4 test bileşiğimizin 50 µg/ml konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir hidroksil radikali yakalama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. L1 bileşiğinin 100µg/ml konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir hidroksil radikali yakalama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. L2 bileşiğinin 250 µg/ml konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir hidroksil radikali yakalama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Diğer taraftan tüm bileşiklerin her konsantrasyonda birbirine yakın değerlerde aktiviteye sahip olduğu da tespit edilmiştir. Test bileşiklerinin tümünün askorbik asite ve BHT' ye yakın bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre bileşiklerimizin hidroksil yakalama aktiviteleri iyi seviyede bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada 1,2,4, triazol içeren ve iyi hidroksil radikali yakalama aktivitesi gösteren türevlerin olduğu bildirilmiştir [186].

Genel değerlendirme

Test bileşiklerimizin antioksidan etki gösterebilme potansiyelini ortaya koyabilmek için bileşiklerimizi indirgeme kuvveti, metal şelatlama, süperoksit ve hidrojen peroksit giderme, hidroksil radikali yakalama gibi in vitro yöntemlerle araştırdık. Literatürde çalışmamızda planladığımız bu yöntemlerin tümünü aynı anda kullanarak ya da bir veya birkaçını kullanarak 1,2,4- triazol türevlerinin ve mannich bazlarının potansiyel antioksidan etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Ayrıca 1,2,4-triazollerin antioksidan özelliklerini tezimizde çalıştığımız yöntemlerden farklı metotlarla ortaya koyan bir çok

çalışmada mevcuttur. [58,183,185,197,198 - 209]. Örneğin triazollerle ilgili yapılan bir çalışmada 1,2,4-triazol-tiol(tion) türevlerinin yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir.1,2,4-triazol halkasındaki azot ve merkaptto grupları nükleofil merkezdir ve elektrofiller ile tepkimeye girebilmektedir. Örneğin S ve N atomunda bazı alkilasyon ve mannich reaksiyonlarının gerçekleştirildiği bildirilmektedir [58]. Çalışmaların birinde 1,2,4-triazol halkasındaki fenilaçil türevinin oksijen ve nitrikoksit serbest radikalleri için antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir [193]. Bir diğer çalışmada 8-klor-[1,2,4]triazol türevlerinin antioksidan özellikleri ortaya konmuştur [194]. Diğer bir çalışmada [195] standart olarak askorbik asit yöntem olarak hidrojen peroksit giderme aktivitesini kullanarak 1,2,4-triazol türevlerinden iyi antioksidan etkiye sahip bileşikler tespit etmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise [196] potansiyel antioksidan 1,2,4-triazol bileşikler bildirilmiştir. Antioksidan etkileri araştıran bir çalışmada tarafından yapılmıştır [197].

Literatürdeki benzer çalışmalardaki antioksidan yöntem farklılıkları ve triazol halkasına bağlı grupların farklılıkları nedenleriyle bu çalışmaların sonuçlarını tezimizdeki bileşiklerin sonuçlarıyla birebir kıyaslayamıyoruz. Ancak literatürde test bileşiklerimize yakın gruplar ihtiva eden ayrıca bizim de kullandığımız yöntemlerden bir veya birkaçını kullanarak 1,2,4 triazol türevlerin antioksidan etkisini gösteren ve sonuçlarımızı destekleyen çalışmalar mevcuttur [203,208]. Bu çalışmaları ve sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde; elde ettiğimiz veriler ışığında genel olarak özellikle piperazin sekonder aminli bis 1,2,4 triazol türevi L1 ve L2 bileşiklerimizin potansiyel antioksidan etkilerinin olabileceği fikrini ileri sürebiliriz.

L4 ve L5 bileşiklerinin ise standart antioksidanlara yakın değerlerde sonuçlar verebilmesini gözönünde tutarak bu bileşiklerin antioksidan etkilerinin iyi sayılabilecek bir düzeyde olduğunu söyleyebiliriz. L3 bileşiğinin ise hidroksil yakalama aktivitesi dışında diğer tüm yöntemlerde standart antioksidanların aktivitelerine göre çok düşük düzeylerde kaldığını belirledik. Bundan ötürü L3 bileşiğinin diğer bileşiklere göre potansiyel antioksidan aktivitesinin düşük olduğunu söyleyebiliriz.

***Saccharomyces cerevisiae* örneklerindeki ölçümler**

S.cerevisiae hücre döngüsünün araştırılmasında çok kullanışlıdır, çünkü hem kültürlenmesi kolaydır, hem de, bir ökaryot olduğundan dolayı hayvan ve bitkilerin karmaşık hücre içi yapılarına sahiptir. Ökaryotlar arasında genomunun dizini ilk

okunmuştur. Maya genom veri tabanı [210] bu çalışmanın üzerine inşa edilmiş, içinde maya genlerinin çeşitli özellikleri gayet ayrıntılı bir şekilde kaydedilmiştir. Bu bilimsel kaynak, ökaryotik hücre genetiği ve fizyolojisinin yapısı ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde çok önemli bir konuma sahiptir. Bir diğer *S. cerevisiae* veri tabanı Munich Information Center for Protein Sequences [211]' dir. Genom yaklaşık 13.000.000 baz çiftinden ve 6275 genden oluşmaktadır, ancak bu genlerin yaklaşık 5.800'ünün işlevsel olduğu sanılmaktadır. Maya ve insan genomunun dizinleri %23 ortaktır. Bundan dolayı çalışmamızda *Saccharomyces cerevisiae* yöntemini de kullanmayı tercih ettik.

Saccharomyces cerevisiae örneklerindeki ölçümlerinden elde ettiğimiz sonuçlar çizelge 4.21. ve şekil 4.23.' de gösterilmiştir. Buna göre, 50 µM ve 100µM konsantrasyonlarda L4 bileşiği dışındaki diğer tüm test bileşiklerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Buna göre, L1, L2 ve L5 bileşikleri MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür. L3 bileşiği ise kontrole göre MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır. L4 bileşiğinde ise istatistiki açıdan anlamlı bulunmamasına rağmen kontrole göre MDA düzeyinde düşüş görülmüştür. Buna göre L3 bileşiği diğer bileşiklere göre MDA düzeyini artırarak pro oksidan bir etki göstermiştir. L3 bileşiğinin diğer antioksidan yöntemlerde de düşük bir aktiviteye sahip olduğunu daha önce belirlemiştik. Buna ilaveten L3 bileşiğinin lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA'yı arttırması da L3 bileşiğinin antioksidan olarak etkisinin olmadığı hatta negatif yönde bir etkisi olduğu fikrini düşündürmüştür. L1, L2 ve L5 bileşikleri diğer antioksidan yöntemlerde iyi aktivite göstermişlerdi. L1, L2 ve L5 bileşiklerinin bu yöntemde de MDA'yı da düşürmesiyle bir bağlantı kurulabilir. Bundan ötürü bu bileşiklerin antioksidan potansiyelinin olduğu fikri daha da güçlenmiştir. Literatürde 1,2,4 triazollerin *Saccharomyces cerevisiae* hücre kültüründe MDA analizine yönelik sınırlı sayıda çalışmalara rastladık. Bu nedenle çalışmamız bu yöndeki eksikliğin giderilmesinde katkı sağlayacaktır. Bu çalışmaların birinde 1,2,4 triazol bileşiklerinin MDA düzeyini azalttığı belirlenmiştir [212]. Triazol dışında bazı Schiff bazları türevlerin de de bu yöntem kullanılarak değerlendirilmeler yapılmış, MDA'yı düşüren sonuçlara rastlanmıştır [213-216]. Bu bulgular bizim de L3 dışında bileşikler için elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte olmuştur.

***In vitro* antitümör aktivitesi**

Test maddeleriyle muamele edilmiş MCF-7 (insan meme kanseri) hücrelerinin antitümör düzeylerine ait elde ettiğimiz sonuçlar çizelge 4.22. ve şekil 4.24.' de verilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm test maddelerimizin kontrol ve çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde farklılıklar gösterdiğini tespit ettik. Ayrıca bileşikler kendi aralarında da istatistiksel olarak farklılaşmışlardır. Sonuçlarımıza göre 0,1 µM konsantrasyonda MCF-7 kanser hücre canlılığını en çok azaltan L5 bileşiği olmuştur. Ayrıca 0,1 µM konsantrasyonda L5 bileşiği kontrole ve diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak çok anlamlı çıkmıştır. Bu konsantrasyonda dikkat çeken ve kontrole göre anlamlı şekilde hücre canlılığını azaltan diğer bileşik ise L1 bileşiği olmuştur. Diğer konsantrasyon olan 1 µM 'da ise MCF-7 kanser hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede en çok azaltan L3 bileşiği olmuştur. L3 bileşiğine L2 ve L5 bileşikleri de yakın değerlerde etki göstermişlerdir. 10 µM konsantrasyonda L1 bileşiği MCF-7 kanser hücre canlılığını istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde en çok azaltan bileşik olmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 100 µM da ise L5 bileşiği en iyi etkiyi göstererek kanserli hücre canlılığını azaltmıştır. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında özellikle L5 maddesinin en etkin antitümör aktivite gösterdiğini tespit ettik. Ayrıca L3, L1 ve L2 maddeleri de etkin aktivite gösterdi. L4 ise özellikle 100 µM' da iyi aktivite gösterdi. Bu nedenle tüm bileşiklerimizin iyi antitümör etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz.

Bu veriler ışığında dikkati çeken en önemli bileşiklerin L3 ve L5 bileşiklerinin olduğunu düşünüyoruz. Çünkü L3 bileşiği antioksidan yöntemlerde etkisiz kalırken *Saccharomyces cerevisiae* hücre kültüründe MDA'yı artırdı. Bu yöntemde de kanserli hücreleri yok etti. Bu sonuçlar birarada değerlendirildiğinde L3 bileşiğinin sitotoksik bir etkisi olabileceği fikrini doğurmuştur. L5 bileşiği en düşük 0,1 µM ve 100 µM konsantrasyonda en iyi antitümör aktivite gösteren bileşik olarak ön plana çıkmıştır. Ayrıca, L5 bileşiği L3 bileşiğinden farklı olarak hem antioksidan olarak iyi bir aktivite göstermiş hem de antitümör olarak etkili aktivite göstermiştir. Bundan dolayı L3 bileşiğine göre, L5 bileşiğinin, antioksidan etki göstererek hem zarar vermeyen hem de antitümör etki gösteren farklı bir mekanizmaya sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde kendi bileşiklerimizin meme (göğüs) kanserine (MCF-7) karşı etkili bir aktivite gösterdiklerini söyleyebiliriz. Literatürde de bu sonuçlarımızı destekleyen 1,2,4 triazol halkalı türevlerin antitümör etkisinin gösterildiği

çalışmalar mevcuttur. Antikanser olarak kullanılan bazı ilaçların yapısında, 1,2,4-triazol türevleri ve onların izosterleri olarak düşünülen tiyazol türevi olduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konulmuştur [217]. 1,2,4-triazol bileşiklerinin mannich baz türevlerinin de antitüberküler, antimalaryal, antikanser ve analjezik ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde en çok ölümlerle sonuçlanan hastalıklardan biri olan kanserin tedavisi için her ne kadar değişik yöntemler geliştirilmiş ve bu bağlamda değişik yapılara sahip bileşikler terapötik amaçlarla kullanılmakta ise de kanser en çok ölümlerle sonuçlanan hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmaların birinde 1,2,4-triazol halkası içeren arilidenhidrazidler meme kanserine karşı etkili bileşikler olarak sentez edilmiştir [218]. 1,2,4-triazol içeren bileşiklerin antitümör amaçlı kullanılmaları için farklı moleküller sentezlenmiştir. 1,2,4-triazol halkalı bileşiklerin baz türevleri sentezlenmiş ve asetik asit hidrazidin baz türevlerinin sadece meme kanserinde, 2-fenil-etilenamino ve 2-fenil-etilamino bileşiklerinin ise küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma ve meme kanserinde etkili bir antitümör ajanı oldukları tespit edilmiştir. 1,2,4-triazol halkaları gibi azol halkaları da içeren terapötik ajanlardan Vorozol, Letrozol ve Anastrozol gibi bazı bileşikler meme kanseri tedavisinde de kullanılmaktadırlar [219]. Antitümör ilacı olarak da kanser tedavilerinde kullanılmak için geliştirilen 1,2,4-triazol türevleri bulunmaktadır. 4-amino-3-fenil-5-okso-4,5-dihidro-[1,2,4]triazol-1-il-asetik asit 2,4-diklorobenzilidenhidrazit meme kanserine karşı antikanser özelliğine sahiptir [220]. Literatürdeki bu çalışmalar yaptığımız çalışmada bulduğumuz antitümör etkiyi destekler nitelikte olup bu alanda katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Test bileşiklerinin *in vivo* etkileri

Karaciğer dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri

Test bileşiklerinin karaciğer dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri çizelge 4.23. ve şekil 4.25. ve 4.26.'da verilmiş olup kontrol ve bileşiklerin kendi aralarındaki sonuçlarına baktığımızda L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak C vitamini konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. L4 ve L5 bileşikleri uygulanan gruplarda ise istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen kontrole göre daha düşük C vitamini konsantrasyonu olduğunu belirledik. L1 ve L2 bileşikleri uygulanan gruplardaki C vitamini konsantrasyonunun ise kontrole yakın seviyelerde olduğu görüldü. MDA üzerine etkilerine bakıldığında ise

kontrole göre tüm test gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmadı. Buna rağmen L3 bileşiğinin kontrole göre MDA düzeyini arttırdığını tespit ettik. L3 bileşiğinin *S.cerevisiae* yönteminde de MDA düzeyini arttırmış olması, bu bileşiğin hem *in vivo* hem *in vitro* da MDA' yı artırıcı bir aktiviteye sahip olduğunu ortaya çıkardı. L1 ve L2 bileşiklerinin ise istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasına rağmen kontrole göre MDA düzeyini düşürdüğünü, L4 ve L5 maddelerinin ise kontrol düzeyine yakın değerlerde bulunduğunu belirledik.

A vitamini düzeyini araştırdığımızda; L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak A vitamini konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. Diğer test bileşiklerinin ise kontrole yakın seviyelerde olduğunu belirledik. E vitamini üzerine etkilerine bakıldığında kontrole göre L3 bileşiğinin istatistiksel olarak E vitamini seviyesini kayda değer bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. E vitamini seviyesinin diğer bileşiklerde kontrol düzeyine yakın değerlerde bulunduğunu belirledik.

Böbrek Dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri

Test Bileşiklerinin Böbrek Dokusunda A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkilerini çizelge 24. ve şekil 27. ve 28.' de sunduk. Bu verileri incelediğimizde tüm test bileşiklerinin hem kontrol hem de kendi aralarında istatistiksel olarak C vitamini düzeyine anlamlı bir etkilerinin olmadığını belirledik.

Tüm test gruplarının birbirlerine ve kontrole sayısal olarak yakın düzeyde C vitamini içeriğine sahip olduğu tespit edildi. MDA üzerine etkilerine bakıldığında L3 bileşiğinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde MDA düzeyini arttırdığını tespit ettik. Bu sonuçlar, L3 bileşiğinin karaciğer dokusunda olduğu gibi böbrek dokusunda da MDA' yı arttırdığını göstermektedir. Diğer test bileşiklerinin değerlerinin birbirleriyle yakın seviyede olup istatistiksel açıdan anlamlı çıkmamasına rağmen kontrole göre MDA düzeyini düşürdüğü gözlenmiştir. A vitamini düzeyini araştırdığımızda L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak A vitaminini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. Diğer test maddelerinin ise kontrole yakın seviyelerde olduğunu belirledik. E vitamini üzerine etkilerine bakıldığında kontrole göre L3 bileşiğinin istatistiksel olarak E vitamini seviyesini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü belirledik. Diğer taraftan L1 bileşiğindeki grupta istatistiksel olarak E vitamini seviyesini anlamlı bir şekilde

yüksek olduğu görüldü. L2, L4 ve L5 bileşiklerinde kontrole aynı düzeylerde bulunduğunu belirledik.

Kan Örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkileri

Test bileşiklerinin kan örneklerindeki A, E ve C vitamini ve MDA üzerine etkilerinin sonuçları çizelge 4.25. ve şekil 4.29.' da sunuldu. Kontrole ve bileşiklerin kendi aralarındaki sonuçlarına baktığımızda L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak C vitamini konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. Diğer test maddelerinin uygulandığı gruplarda ise kontrole yakın C vitamini seviyelerinin olduğunu gözlemledik. MDA üzerine etkilerine bakıldığında kontrole göre L1, L2, L4 ve L5 test grubunda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunamadı. Bu bileşiklerde MDA düzeyi kontrole yakın düzeyde tespit edildi. L3 bileşiğinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MDA düzeyini arttırdığını belirledik.

A vitamini düzeyini araştırdığımızda L3 bileşiğinin hem kontrol hem de diğer bileşiklere göre istatistiksel olarak A vitaminini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü tespit ettik. Diğer test bileşiklerinin uygulandığı gruplarda ise kontrol grubuna yakın seviyelerde A vitamini olduğunu belirledik. E vitamini üzerine etkilerine bakıldığında kontrole göre L3 bileşiğinin istatistiksel olarak E vitamini seviyesini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü belirledik. E vitamini düzeyinin L1 ve L2 bileşiklerinde kontrole göre yakın düzeylerde olduğunu belirledik.

Genel değerlendirme

Tüm doku ve kan örneklerindeki sonuçları değerlendirdiğimizde test bileşiklerimizden L3 bileşiğinin uygulandığı gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MDA düzeyinin arttığı aynı zamanda vitamin düzeylerinin azaldığı görülmektedir. Diğer test gruplarında ise genel olarak kontrole göre MDA düzeyini artırıcı bir aktivite görülürken vitaminler açısından kontrole yakın düzeyler tespit edilmiştir.

Literatürde 1,2,4- triazollerini bizim invivo yöntemlerimizle kıyaslayacak bir çalışmaya rastlamamakla birlikte başka grup ve türevlere ait çalışmalarda sonuçlara göre serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olmaktadır [221-223]. Başka bir çalışmada araştırmacılar [224], antioksidan özellik gösteren maddeleri (naringin ve probukol) diyet ile tavşanlara verdiklerinde bu maddelerin plazma MDA ve A vitamini düzeyini etkilemediğini, E

vitamini düzeyini ise, kullanımını azaltarak yükselttiğini gözlemişlerdir. Buna göre L3 bileşiminin dokuda adeta radikal etkisi göstererek MDA' yı arttırdığını buna bağlı olarak vitaminlerin harcanarak azaldığını düşünebiliriz. Diğer test bileşiklerinin de tam tersi adeta antioksidan etki göstererek MDA'yı azalttığı ve buna bağlı olarak vitaminlerin harcanmamasından ötürü kullanımını azaltarak kontrole yakın veya biraz yüksek değerlerde çıktığı fikrini düşünebiliriz.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, ölçülen invitro ve invivo antioksidan parametrelere ve antitümör etkisine bakıldığında ümit verici sonuçlar gözlemlendi. Özellikle L1, L2, L4 ve L5 maddelerinin iyi antioksidan aktivite ile birlikte sergilemiş oldukları iyi antitümör özellikleri bu bileşiklerin farmakolojik açıdan önemli bir biyoaktivite sergilediklerinin göstergesi olabilir. L3 bileşiğinin antioksidan etkisi düşük olsa da meme kanserine karşı iyi antitümör etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Bu tez çalışması kapsamında test edilen bileşik sınıflarının, araştırılan birçok farmakolojik özelliklerine ilave olarak araştırdığımız bu parametrelerin de literatür bilgisine katkıda bulunacağı kanısındayız. Sonuç olarak, test bileşiklerimizin ileriki çalışmalar için model bileşiklerin seçimi ve tasarımında faydalanılabilecek özellikte olduğunu önerebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Dimmock, JR., Kumar, P., 1997, "Anticancer and cytotoxic properties of Mannich bases", *Curr Med Chem.*, 4: 1-22
2. Mannich, C., Krosche, W., 1912, "Ueber ein kondensations produkt aus formaldehyd, ammoniak und antipyrin", *Archiv der Pharmazie.*, 250: 647-7.
3. Gul, H.I., Gul, M., Erciyas, E., 2002, "Synthesis and stability studies of some Mannich bases of acetophenones and their cytotoxicity against jurkat cells", *Arzneimittelforschung.*, 52: 628-635.
4. Gul, H.I., Gul, M., Vepsalainen, J., Erciyas, E., Hanninen, O., 2003, "Cytotoxicity of some azines of acetophenone derived mono-Mannich bases against Jurkat cells", *Biol Pharm Bull.*, 26: 631-637
5. Gul, M., Mete, E., Atalay, M., Arik, M., Gul, HI., 2009, "Cytotoxicity of 1-aryl-3-buthylamino-1-propanone hydrochlorides against Jurkat and L6 cells," *Arzneimittelforschung.*, 59: 364-369.
6. Gul, M., Gul, H.I., Vepsalainen, J., Erciyas, E., Hanninen, O., 2001, "Effect of acetophenone derived Mannich bases on cellular glutathione level in jurkat cells. A possible mechanism of action," *Arzneimittelforschung.*, 51: 679-682.
7. Gul, M., Gul, H.I., Hänninen, O., 2002, "Effects of Mannich bases on cellular glutathione and related enzymes of Jurkat cells in culture conditions," *Toxicol in Vitro.*, 16: 107-112
8. Dimmock, JR., Nyathi, CB., Smith, PJ., 1978, "Synthesis and evaluation of 1-(hydroxyphenyl)-1-nonen-3-ones and related compounds for antineoplastic and antimicrobial activities", *J Pharm Sci.*, 67: 1543-1546.
9. Hamon, NW., Bassendowski, DL., Wright, DE., Dimmock, JR., Noble, LM., 1978, "Effect of antineoplastic and cytotoxic Mannich bases derived from conjugated styryl ketones on mitochondrial respiration in rat liver cells", *J Pharm Sci.*, 67: 1539-1542.
10. Gul, H.I., Denizci, AA., Erciyas, E., 2002, "Antimicrobial evaluation of some Mannich bases of acetophenones and representative quaternary derivatives", *Arzneimittelforschung.*, 52: 773-777.

11. Gul, H.I., Sahin, F., Gul, M., Ozturk, S., Yerdelen, KO., 2005, "Evaluation of antimicrobial activities of several mannich bases and their derivatives", *Arch Pharm.*, 338: 335-338.
12. Dimmock, JR., Jonnalagadda, SS., Phillips, OA., Erciyas, E., Shyam, K., Semple, HA., 1992 "Anticonvulsant properties of some Mannich bases of conjugated arylidene ketones", *J Pharm Sci.*, 81: 436-440.
13. Gul, HI., Calis, U., 2004, "Vepsalainen J. Synthesis of some mono Mannich bases and corresponding azine derivatives and evaluation of their anticonvulsant activity", *Arzneimittelforschung.*, 54: 359-364.
14. Gul, H.I., Calis, U., 2002, "Vepsalainen J. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of some bis-Mannich bases and corresponding piperidinols", *Arzneimittelforschung.*, 52: 863-869.
15. Gul, H.I., Calls, U., Ozturk, Z., Tutar, E., Calikiran, L., 2007 " Evaluation of anticonvulsant activities of bis(3-aryl-3-oxo-propyl) ethylamine hydrochlorides and 4-aryl-3-arylcarbonyl-1-ethyl-4-piperidinol hydrochlorides", *Arzneimittel forschung.*, 57: 133-136.
16. Suleyman, H., Gul, H.I., Asoglu, M., 2003, "Antiinflammatory activity of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride", *Pharmacol Res.*, 47: 471-475.
17. Suleyman, H., Gul, HI., Gul, M., Alkan, M., Gocer, F., 2007, "Anti-inflammatory activity of bis(3-aryl-3-oxo-propyl)methylamine hydrochloride in rat", *Biol Pharm Bull.*, 30: 63-67.
18. Kotecka, B.M., Barlin, G.B., Edstein, M., Rieckmann, K.H., 1997, "New quinoline di-Mannich base compounds with greater antimalarial activity than chloroquine, amodiaquine or pyronaridine", *Antimicrob Agents Chemother.*, 41: 1369-1374.
19. Varma, R.S., Garg, P.K., Verma, H.N., Awasthi, L.P., 1981, "Potential biologically active agents, XXXII. Synthesis and antiviral activity of some 3-(arylthiosemicarbazono)-2-indolinones", *Arch Pharm.*, 314: 918-922
20. Dimmock, J.R., Shyam, K., Smith, P.J., 1984, "Decomposition of 1-aryl-3-dimethylamino-1-propanone methobromides under weakly acidic conditions", *Pharmazie.*, 39: 467-470
21. Edwards, M.L., Ritter, H.W., Stemerick, D., Stewart, KT., 1983, "Mannich bases of 4-phenyl-3-buten-2-one: a new class of antiherpes agent", *J Med Chem.*, 26: 431-436

22. Lee, K.H., Furukawa, H., 1972, "Antitumor agents. 3. Synthesis and cytotoxic activity of helenalin amine adducts and related derivatives", *J Med Chem.*, 15: 609-611
23. Dimmock, J.R., Shyam, K., Logan, B.M., Smith, P.J., Cross, B.M., 1984, "Syntheses and evaluation of some mannich bases derived from acetophenones against P388 lymphocytic leukemia and toxicological assessment of 3-dimethyl-amino-2-dimethylaminomethyl 1-(4-methoxyphenyl)-1-propanone dihydrochloride in rats", *J Pharm Sci.*, 73: 471-477
24. Ciba, M., 2009, "6-benzoil-2-okso-(3h)-benzotiyazolin'in Mannich bazları ve Aktivite çalışmaları", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,2.
25. Reynolds, D. D., Cossar, B. C., 1973 *J Heteroc. Chem.* 1971, 8, 597, 605 and 611, and 1972, *Def Publ. U.S. Pat. Ofi*, 900,001; *Chem. Abs.*,78,70847.
26. Arend, M., Westermann, B., Risch, N., 1998, "Modern Variants of the Mannich Reaction, *Angew*", *Chem. Int. Ed.*, 37, 1044-1070.
27. Tramontini, M., Angiolini, L., 1994, "Mannich Bases Chemistry and Uses. 5. Londra: CRC,34,254Pir, M., 2011,"Üç Bileşenli Mannich Reaksiyonuyla Hafniyum Klorür Katalizörlüğünde Amino Karbonil Bileşiklerinin Sentezi", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya,6.
28. Almajan, G.L., Barbuceanu, S.F., Almajan, E.R., Draghici, C. ve Saramet, G., 2009, "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some triazol Mannich bases carrying diphenylsulfone moieties", *Eur. J. Med. Chem.*, 44: 3083-3089.
29. Tramontini, M., Angiolini, L., 1990, "Further Advances in The Chemistry of Mannich Bases, *Tetrohedron*" Vol 46, No. 6, pp. 1791-1837.
30. Pir, M., 2011,"Üç Bileşenli Mannich Reaksiyonuyla Hafniyum Klorür Katalizörlüğünde Amino Karbonil Bileşiklerinin Sentezi", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya,6.
31. Gheorghe, R., 2014, "Mannich bases in medicinal chemistry and drug design" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 7;89:743-816.
32. Shawmi, A.S., ve Parhangi, C., 1980., *J. HeterocyclicChem.*, 17833.
33. Bladin, J.A., *Ber.*, 1885,18, 1544.
34. Andreocci, A.,*Ber.*, 1889,22 737.
35. Potts, K.,T., *Chem.Revs.*, 1960, 60, 87.

36. Temple, C., Montgomery, J.A. 1981, "The Chemist of Heterocyclic Compounds, Triazols-1,2,4-" *John Wiley and Sons*, Newyork.
37. Briggs, P.R. Parker, W.L. and Shannon, T.W., 1968, *Chem. Comm.*, 727.
38. Inaba, M., Mizuno, Y., Ozaki, M., Horii, T., 1988, [9091,062] (C.A. 113:97612p).
39. Doub, L., Richardson, L.M., Bambas, L.L., Youmans G.P., Youmans, A.S.J., 1958, *Am.Chem.Soc.*, 80, 2205.
40. Rusinov V.L., Ulomkii, E.N., Chupakhin, O.N.Zubairov, M.M., Kapustin, A.B., Mitin,N.Zhi ravetskii, M.I., Vinograd, I.A., Khim-Farm,Zh., 1990,(C.A.),24,41.
41. Reader, S.C.J., Carroll, B., Robertson, W.R., LambertA., 1987, *Biochem. Pharmacol* 36, 1825.
42. Kathari, P.J., Sigh, S.P., Parmar, S.S. Stenberg, V.I., 1980, *HeterocyclicChem.*, 17,1993.
43. Lewenstein, M,J., 1954, U.S.P.2, 683.106 (C.A.48:13175b).
44. Gall, M. Mitarb., Hester, J.B., Rudzik, A.D., Lahti, R.A., 1976, "Synthesis and Pharmacology of Novel Anxiolytic Agents Derived from 2-[(Dialkylamino)methyl-4Htriazol-4-yl]benzophenones and Related Heterocyclic Benzophenones" *J.Med.Chem.*,19,1057.
45. Tantwy, A., Barghash, A.E.M., Alexandria, 1988, *J.Pharm. Sci.*, 2,50
46. Bonjean, J., Schunanck, W., 1987, *Arch.Pharm.*, 320,554
47. Mori, S., Ttakeuchi, Y. Ve Toyamo, M., 1985, "Amitrole of The Liver Follwing Subchronic Administionto Mice," *Toxicol. Lett.*, 29, 145-142.
48. Prasad, A. R., Ramalingam, T., Rao, A. B., Diwan, P. V., Sattur, P. B., 1989, "Synthesis and Biological Evalvation of 3-Aryloxyal-kyl-6-Aryl-7H-s-triazolo [3,4-b] [1,3,4] thiadiazines," *Eur. J. Med. Chem.* 24, 199.
49. Rusinov, V.L., Petrov, A.Yu., Pilicheva, T.L. Chupakhin, O.N., Kavalev, G.V., Komina,E.R., Khim-Farm.Zh, 1986, 20,178 (C.A.106:32968v).
50. Shah, M.H., Mhasalkar, M.Y., Patki, U.M., Deliwala, C.V., Sheth, U.K., 1969, *J.Pharm.Sci.*, 58,1398.

51. Karyotikis, N.C. , Anaissie, E.J. , Hachem, R. ,Digmani, M.C. ,Samonis , G., 1993, *J.Infect.Dis.*, 168, 131.
52. El-Dawy, M.A, Mohsen, A.,Omar, M.E., Ismail, M.A., Hazza, A.A.B., 1983, *J.Pharm-Sci*-72,45.
53. Greenfield, S.A., SEidel, M.C.,Von Meyer, W.C.,Geroffen. 1.943,915 (1970)(C.A.72:100713q).
54. Dedek, W., Wenzel, K.D., Oberlaender, H., Mothes, B., Maenning, J., Fresenius.1., 1991,*Anal. Chem.*, 339,201.
55. Almajan, G. L., Barbuceanu, S.-F., Bancescu, G., Saramet, I., Saramet, G. ve Draghici, C., 2010, “Synthesis and antimicrobial evaluation of some fused heterocyclic [1,2,4]triazolo [3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 6139-6146.
56. Gates, Stuart, P., 1988, “Preparation of Thiazolo[3,2-b][1,2,4]-triazolo-2-sulfonamides asHerbisides” Eur. Pat. 244, 098 (Cl. CO7D513/04), 4 Nov. 1987, Ref: C.A. 108, 75405t
57. Pandeya, S.N., Sriram, D., Nath G., 2000, “Syn-antibacterial, antifungal and , anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of Isatin and its derivatives”, *Arzneimittelforschung* 50 (1); 55-93.
58. Birinci, E., 2013, “Sentezi, Karakterizasyonu Ve Farmakolojik Yeni Tiyofen İçerikli 1,2,4-Triazol-3(5)-On Türevlerinin Özelliklerinin İncelenmesi,” Y.lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocağ, Trabzon.
59. Gülçin, İ., 2002, “Isırgan Otuğunun (Urtica dioica) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi,Oksidatif Enzimlerin Karakterizasyonu ve Bazı in vivo Etkilerinin incelenmesi” Doktora Tezi, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
60. Burçak, G., Andican, G., 2004, “Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma” *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (4).
61. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997, “Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma” *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3(4): 92-95.
62. Kılınç, K., 1985, “Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları, toksik etkileri,” *Biyokimya Dergisi.*, 10, 60-89.
63. Akkus, İ., 1995, “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri,” MIMOZA yayınları.

64. Mecoci, P., Beal, M.F., Polidori, M.C., Cherubini, A. and Chiosne, F., 1997, "Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain", *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 53-64.
65. Yokuş, A.Ö., 2012, " Bazı Yeni 1,2,4-Triazol Türevlerinin Sentezi Ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi" Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
66. İşbilir, Ş. S., "Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne (2008).
67. Onat, T., Emerk, K., Sözman E. Y., (Ed.), 2002, "İnsan biyokimyası", Palme Yayıncılık, Ankara.
68. Cheeseman, K.H., Slater T.F., 1993, " An Introduction to radical biochemistry. Br. Med. Bull," 49, 481-493.
69. Tokalı, F. S., 2011, "1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sentezi üzerine bir çalışma", Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars
70. Akyıldırım, O., 2011, "Bazı potansiyel biyolojik aktif heterosiklik bileşiklerin sentezi, yapılarının aydınlatılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
71. Özdem, S.S. and Sadan, G., 1994, " Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi", *Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg.*, 11, 63-71.
72. Haskell, T.H., Peterson, F.E., Watson, D., Plessas, N.R. and Culbertson, T., 1970, " Nevraminidose inhibition and viral chemotherapy," *J.Med. Chem.*, 13, 697-704.
73. Öztürk, M., Guzelhan, Y., Sayar, K. ve Tuzun, U., 2001, "Bulletin of Clinical Psychopharmacology," 11, 3.
74. Aruoma, O.I., 1993, "Free radicals and food. Chemistry in Britain" 29, 210-214.
75. Aruoma, O.I., 1996, " Characterisation of drugs as antioxidant prophlactics" *Free Radical Biology and Medicine.* 20, 675-705.
76. Pezzuto, J.M., 1997, " Plant-derived anticancer agents. Biochemical Pharmacology", 53,121-133.
77. <http://www.mustafaaltinisik.org>

78. Demirci, S., 2011, “Beş üyeli heterosiklik bileşikler üzerine bir çalışma”, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
79. Nehir El, S., Karakaya, S., Taş, A. A., 1999, “Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro koşullarda saptanması”, TÜBİTAK Projesi, No:TOGTAG-1698, İzmir.
80. Bagchi, K., Puri, S., 1998, “Free radicals and antioxidants in health and disease,” *Eastern Mediterranean Health Journal.*, 4(2):350-360.
81. Karagözoğlu, Y., 2010, “Hidroksiüre Türevi 1,3,4-Tiyadiazol Bileşiklerinin Antitümör Ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi,” Yüksek Lisan Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mart, Elazığ.
82. Özşahin, A.D., 2010, “Malatya Yöresine Ait Bazı Üzüm Ve Kayısı Çesitlerinin Fitokimyasal İçeriklerine Bağlı Olarak Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması” Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
83. Jeong, J.B., Park, J.H., Lee, H.K., Ju, S.Y., Hong, S.C., Lee, J.R., Chung, G.Y., Lim, J.H. and Jeong, H.J., 2009, “Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect,” *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 525-529.
84. Ajila, C.M. and Prasada Rao, U.J.S., 2008, “ Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Magnifera indica* L. Peel extract”, *Food and Chem. Toxicol.*, 46, 303-309.
85. Yanbeyi, S., 1999, “Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole’ün tavsanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri,” Doktora Tezi, O.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
86. Verma, A.R., Vijayakumar, M., Rao, C.V. and Mathela, C.S., 2010, “In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*,” *Food and Chem. Toxicol.*, 48, 704-709.
87. Çakır, M., 1997, Aspirin ve vitamin E (α -Tokoferol)’nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, O. M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
88. Gülçin, I., Küfrevioğlu Ö.I., Oktay, M. and Büyükkuroğlu, M.E., 2004, “Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.),” *Journal of Ethnopharma.*, 90, 205–215.

89. Klug, D., Rabani, J. and Fridovich, I., 1972, “A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis,” *J. Biol. Chem.*, 247(15), 4839-4842.
90. 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.
91. Halliwell, B., 1994, “Free radicals and antioxidants: A personal view”, *Nutrition Reviews*, 52 (8): 253-265.
92. Aras, A., 2012, “Bazı 4-(3-metoksi-4-asetoksi)-benzilidenamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sentezi ve in-vitro antioksidan özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
93. Bekar, M., 1996, “Bazı 4-arilidenamino-4,5-dihidro-1,2,4-triazol-5-on’ların sentezi ve özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
94. Yüksek, H., İslamoğlu, F., Gürsoy-Kol, Ö., Bahçeci, Ş., Bekar, M., Aksoy, M., 2011, “In-vitro antioxidant activities of some new 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones having thiophene Ring with their acidic properties”, *E-J. of Chem.*, 8 (4): 1734-1746.
95. Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H., 2000, “Hydrogen peroxide in the human body”, *FEBS Letter*, 486: 10-13.
96. Tomruk, Z., 2008, “Bazı yeni heterosiklik schiff bazlarının sentezi, pKa değerlerinin tayini ve DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
97. Keser, S., 2006, “Trans-3,5,4’-Trihidroksistilben’in, Potasyum Bromat Etkisine Maruz Bırakılan Yaslı Disi Sıçanların Bazı Dokularındaki Biyokimyasal Değişimler Üzerine Etkisi” Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
98. Imahori, Y., Takemura, M. and Bai, J., 2008, “Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage” *Postharvest Biol. and Techno.* 49, 54–60.
99. Kawanishi, S., Hiraku, Y. and Oikawa, S., 2001, “Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging”, *Mutation Rese.* 488, 65–76.

100. Arslantaş, A., Yüksek, H., Gürsoy-Kol, Ö., Ocak, Z., Tomruk, Z., Calapoğlu, M., 2012, "Study of antioxidant properties and DNA interaction of some novel 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives", *Asian J. of Chem.*, 24 (8): 3327-3334
101. Albayrak, Ö., 2008, "Bazı yeni 3-alkil(aril)-4-[2-(p-toluensulfoniloksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiklerinin sentezi, yapılarının aydınlatılması ve susuz ortam titrasyonları", Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
102. Bolanos, J.P., Moro, M.A., Lizasoain, I. and Almeida, A., 2009, "Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications" *Avdan. Drug Deliv. Revi.*, 61, 1299–1315.
103. Smirnov, N. and Pallanca, J.E., 1995, "Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress," *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 16.
104. Cotton, F. A., 1988, "Wilkinson, G., "Advanced inorganic chemistry", John Wiley & Sons Inc., 5th Ed., USA,
105. Slater, T.F., 1984, "Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury," *Biochem. J.*, 222, 1–15.
106. Davies, M.J., 2003, "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences," *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 761–70.
107. Özkaya, A., 2007, 'Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin Ve Ellagik Asidin Etkisi', Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
108. Nordberg, J., Arner, E.s.j., 2001, "Reactive oxygen Species, Antioxidant and the Mammalian Thioredoxin System, free Radical, Biology and Medicinal.," 31(11); 1287-1317.
109. Halliwell, B., Gutteridge, W.M.C., 1999, "Free Radicals in Biology and medicine," *Oxford Medicine Pres.*, 246-351.
110. Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U., 2000, "Serbest Radikaller ,Mersin Üniversitesi", Tıp Fakültesi Dergisi., 1;52-58.
111. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. and Symons, M.C.R., 1991, "Techniques in free radicals research," *Elsevier*, Amsterdam, vol 22.
112. 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.

113. Gutteridge, J.M., 1995, "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage," *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
114. Köse, K., Dogan, P., 1992, "Lipit peroksidasyonu, Erciyes Üniversitesi", Tıp Dergisi, Ek1; 340-350.
115. Türkoglu, S., 2011, "Pistacia Terebinthus, Salvia Multicaulis, Morus Alba'nın Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Ve Oksidatif Stres Olusturulmuş Ratlarda Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri" Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Şubat, Elazığ.
116. Basaga, H.S., 1990, "Biochemical aspects of free radicals Biochem", *Cell Biol*, 68, 989-998.
117. Josept, A., Knight, M.D., 1999, "Free radicals their presence in biological system in free radicals, antioxidants, aging and disease", Washington, 21-44.
118. Yıldırım, I., 2009, "Hidroksi Üre Türevi Schiff Bazı Ve Bazı Metal Komplekslerinin Antioksidan Ve Antitümör Özelliklerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
119. Josept, A., Knight, M.D., 1999, "Free radicals oxidative stress and cancer in free radicals antioxidants, aging and disease", *Washington, P.* 304.
120. Odabaşoğlu, F., Çakır, A., Süleyman, H., Aslan, A., Bayır, Y., Halıcı, M., Kazaz, C., 2006a, "Gastro protective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats" *I Ethnopharmacol*, 103(1): 59-65
121. Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., 2001, "Oxidative Stres antioxidants in Epilepsy," *Clinica Chimica Acta.*, 303;19-24.
122. Odabaşoğlu, F., "Antioksidan vitaminler", *Pharma Sark* 1(1): 19-21 (2006b).
123. Jornot L., Petersen H., Junod A. F., 1998, "Hydrogen peroxide induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions", *Biochem J.*, 335: 85-94.
124. Mates J. M., Porez-Gomez C., Nunez de Castro I., 1999, "Antioxidant enzymes and human diseases", *Clin Biochem*, 32(8): 595-603.
125. Ghosh, J., Myers, C. E., 1998, "Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells", *Proc. Natl. Acad Sci.*, 95: 13182-13187.

126. Chopra, S., Wallace, H. M., 1998, "Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species", *Biochem Pharmacol*, 55: 1119–1123
127. Fridovich, I., 1975 "Superoxide dismutases," *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 147-59.
128. Zintzen, H., 1978, "A Summary of The Vitamin E/Selenium Problem in Ruminants," *News and Reviews Roche*. 1-18.
129. Pryor, W.A., 2000, "Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials." *Free Rad. Biol. Med.* 28, 141-164.
130. Kojo, S., 2004, "Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress," *Curr. Med. Chem.*, 11, 1041-1064.
131. Surapaneni, K.M., Venkataramana, G., 2007, "Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients withosteoarthritis," *Indian J. Med. Sci.*, 61:9-14.
132. Aras, K., 1954, "Tıbbi biyokimya ve vitaminler: özellikleri, tesir mekanizmaları, dosage prensipleri ve avitaminosisler.," *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları* ; 33 Ankara.
133. Keha, E. ve Küfrevioğlu Ö.İ., 1997, *Biyokimya Şafak Yayınevi*, 151-157.
134. Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı *Palme Yayıncılık*, 151-187.
135. Özer, N., 1996, "Temel Biyokimya" Editörler (Onat, T. Emerk, K.) *Saray Medikal Yayıncılık*, izmir 785-820.
136. Stratton S.P., Liebler D.C., 1997, "Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effects of beta-carotene and alpha-tocopherol" *Biochemistry*, 36(42):1291-20.
137. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS., Lippincott Williams & Wilkins., 1996, "Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach," Baltimore, Maryland.
138. Harri, E.D., 1992, "Regulation Of Antioxidant Enzymes," *Faseb Jour*, 6:2675.
139. Aras, K., Ersen, G., Karahan, S., 1976, "Tıbbi Biyokimya, Vitaminler," *A.Ü.Dis.Hek. Fak., Yayınları*, Sayı:4. Ankara.

140. Keser, S., 2012, civanperçemi (*achillea millefolium*), alıç (*crataegus monogyna*) ve boğurtlen (*rubus discolor*)’den toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve oksidatif stres oluşturulmuş ratlarda bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi FEN Bilimleri Enstitüsü, Ocak, Elazığ.
141. Thomas, M.J., 1995, “The Role of Free Radicals and Antioxidants. Critical Reviews in Food and Science Nutrition., 35(1-2):21-39.
142. Niki, E., 1991, “Vitamin C as an Antioxidant,” *World Rev.Nutr.Diet.*,64:3- 30.
143. Levine, M.,1997, “New Concepts in Biology and Biochemistry of Ascorbic Acid”, *New Engl. J. Med.*, 314:892-901.
144. Erenel G., Erbas D., Arıcıoğlu A., 1992, “Serbest radikaller ve antioksidan sistemler” *Gazi Tıp Dergisi*, 3: 243-50.
145. Hudson, B.J.F., 1990, “Food antioxidants, Elsevier Applied Science,” London and New York.
146. Kandepu, N.M., 1999, “Mannich bases of chalcones and cyclohexanones as candidate cytotoxic agents,” Ottawa: University of Saskatchewan.
147. Dollinger, M., Rosenbaum, E.H., Tempero, M., Mulvihill S.J., 2002, “Everyone’s Guide to Cancer Therapy,” 4th ed. *Bethesda, Maryland: Andrews McMeel*.
148. Kanserle Savas Dairesi Başkanlığı. 2005 yılı Türkiye kanser istatistikleri; Available from: www.saglik.gov.tr
149. Palaska E. 2004, “Antikanser İlaçlar,” 2nd ed. Ankara: *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*.
150. Sun, J., Liu, R.H., “Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells” *Cancer letters*, 20,1-11 (2005).
151. Lowe, S.W., Lin, A.W. “Apoptosis in cancer,” *Carcinogenesis*, 21(3),485-495 (2000).
152. Patron, M., Dowsett, M., Smith, L. 2001, “Studies of apoptosis in breast cancer” *BMJ.*,322,1528-15325.
153. Yu, Z., Zhang, L., Wu, D., Liu, F., 2005, “Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62,441-446.

154. Dikmen, M., Öztürk, N., Öztürk, Y., 2008, “Nar Meyve Kabuğu Ekstresinin Mcf-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Sitotoksik Ve İnhibitör Etkileri” *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 37 (3) 179 – 190.
155. 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.
156. 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-triazol and 1,3,4-thiadiazole analogs,” *Arzneimittelforschung.*, 50:48-54.
157. 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-triazol-3-thione derivatives bearing imidazo[1,2-a]pyridine moiety,” *Acta Pharm., Turcica*; 44: 23-41.
158. 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.*, 2(3), 701-710.
159. 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.
160. Çetinkaya, N., Özcan, 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.
161. 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.
162. Catignani, G.L., 1983, “Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plazma by Liquid Chromatography” , *Clin. Chem.*, 2914, 708-712.
163. Henning, S.M., Swendseid, M.E., Ivandic, B.T., Liao, F., 1997, “Vitamins C, E and A and Hemre oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets” , *Free Radic. Biol.Med.*, 23(6):936-42.
164. Oyaizu, M., 1986. “Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine.” *Jpn. Nutr.* 44, 307–316

165. T.C.P. Dinis, V.M.C. Madeira, L.M. Almeida, 1994., “Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers” *Arch. Biochem. Biophys.*, 315 161–169.
166. R.J. Ruch, S.J. Cheng, J.F. Klaunig, 1989., *Carcinogenesis* 10, 1003–1008.
167. F. Liu, V.F.C. Ooi, S.T. 1997, Chang, *Life Sci.* 60 763–771.
168. 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.
169. Biçici, M., 1990, Mikrobiyoloji, Çukurova Ü. Ziraat Fak., Adana
170. Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D., 2006. “Eleutherio, Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from Lipid peroxidation during oxidative stres,” *Biochimica et Biophysica Acta* 1760, 340–346
171. Offeing, B.M., Martelli, S., 1997., “Stoichiometry and Antitumour Activity of Platinum Metal Complexes of 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones,” *Transition Metal Chemistry.*, 22; 263-269.
172. 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.
173. Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yashimura, Y., Kawada, J., Kubota, S., 1990., “Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4- Triazol-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.
174. Esefsi, S. A., 2004., “ Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone,” *Toxicology in Vitro* 18 467–474.
175. Velioglu, S., 2006., “The effect of extraction conditions on total polyphenol, antioxidant and antimicrobial activities of black and mate tea.” *Ankara University Scientific Researches Projects*, 2005-0745-004-HPD WEIJL.
176. Ünver, Y., Düğdü, E., Sancak, K., Er, M. ve Ustabaş, R., 2010, “ Synthesis and Characterization of novel triazol compounds containing thiophen ring as potential antifungal agents and Structure of 2-(2-hydroxy-2-p-tolyethyl)-5-(thiophen-2-

- ylmethyl)-4-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one,” *Turk.J.Chem.*, 34 (2010) 551-563.
177. Young M.N., Borge, M., Pagniez, F., Baut, G. ve Pape, P., 2003, “ Synthesis and antifungal activity of new 1-halogenobenzyl-3- imidazolymethylindole derivatives,” *Europa Journal of Medicinal Chemistry.*, 38, 75-87.
 178. Sancak, K., Ünver, Y., Kazak, C., Düğdü, E. ve Arslan, B., 2010, “ Synthesis and Characterizations of Some New 2,4-Dihydro-[1,2,4]-triazol-3-one Derivatives and X-Ray Crystal Structures of 4-(3-Phenylallideneamino)-5- thiophen-2-yl-methyl-2,4-dihydro-[1,2,4]triazol-3-one,” *Turk J Chem.*, 34, 771-780.
 179. Upanhayaya, R. S., Sinha, N., Jain, S., Kishore, N., Chandra, R., ve Arora, S. K.,2004, “ Optically active antifungal azoles: synthesis and antifungal activity of /2R,3S)-2-(2,4- difluorophenyl)-3-(5-{2-[4-aryl - piperazine-1-yl]-ethyl} - tetrazol-2-yl/1-yl 9-1-[1,2,4]-triazol -1-yl-butan-2-ol, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,12 2225-2238.
 180. Ünver, Y., Meydanal, S., Sancak, K., Ünlüer, D., Ustabaş, R. ve Düğdü,E., 2011, “Synthesis, crystal structure, and antioxidant properties of novel 1,2,4-triazol-5- ones containing 3,4- dimethoxyphenyl and 3,4-dihydroxyphenyl moiety,” *Turk J Chem.*, 35, 265-277.
 181. Reitz, D. B., Penick, M. A., Norton, M. B., Reinhard, E. J., Corpus, V. M., Palomo, M. A., McGraw, E. G. ve McMallon, E. G., 1994, “1H-1,2,4-Triazol AngiotensinII Receptor Antagonist C-Linket Analogs og SC-50560,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4, 105-110.
 182. Donnelly, J. P. ve De Pauw, B. E., 2004, “Voriconazole-a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity,” *Clin Microbial Infect*, 1, 107-117.
 183. Alkan, M., Yüksek,H., Kol, Ö.G., ve Çalapoğlu, M., 2008; “Synthesis, Acidity and Antioxidant Properties of Some Novel 3,4-disubstituted-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one Derivatives,” *Molecules*, 13, 107-121.
 184. Ma, L., Xiao, Li., Xie, Li., Wang, M., Zhu, H.-L., Wang, M.-H., Ye, Y.-H., 2013, “ Synthesis and antioxidant activity of novel Mannich base of 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing 1,4- benzodioxan,” *Bioorg. Med. Chem.* 21, 6763–6770.
 185. Kol, O.G., Ayazoglu, E., 2014, “Antioxidant activities and acidic properties of some novel 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxy)-benzylidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives,”*Arabian Journal of Chemistry* .

186. Çiftci, S.Y., Kelekçi, N.G., Gökşen, U.S., Uçar, G., 2011., “Free-Radical Scavenging Activities of 2-Benzoxazolinone Derivatives Containing Thiosemicarbazide, Triazole, Thiadiazole and Hydrazone Units,” *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 31,1, 27-50.
187. Yüksek, H., Akyıldırım, O., and Kol, O. G., 2013, “Synthesis and In Vitro Antioxidant Evaluation of New 1,3,5-Tri-{2-methoxy-4-[(4,5-dihydro-1*HH*-1,2,4-triazol-5-on-4-yl) -azomethine]-phenoxy carbonyl}-Benzene Derivatives,” *Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry*., Article ID 517420, 8.
188. Nagaraja, G. K., Reshma, K., Manjunath, B., Peethambar, S.K., Arulmoli, T., 2014, “Antioxidant and Metal Chelating Activities of some Novel Imidazoquinoline Incorporated [1,2,4]-Triazolo Heterocycles,” *Journal of Pharma Research*., 3(3) 23-25.
189. Malhotra, M., Sharma, R., Sanduja, M., Kumar, R., Jam, J., and Deep, A., 2012, “Synthesis, characterization and evaluation of mannich bases as potent antifungal and hydrogen peroxide Scavenging agents,” *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*., 69, 2,355-361.
190. Kotaiah , Y., Nagaraju , K., Harikrishna , N., Venkata Rao , C., Yamini , L., Vijjulatha, M., 2014., ‘Synthesis, docking and evaluation of antioxidant and antimicrobial,activities of novel 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol-6 yl)selenopheno[2,3-d]pyrimidines,’ *European Journal of Medicinal Chemistry* 75 195-202.
191. Kuş, C., 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-triazol-3(4H)- thione derivatives of benzimidazole class,” *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4294–4303.
192. 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.
193. 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.
194. Suresh, M., Lavanya, P., Sudhakar, D., Vasu, K. and Venkata Rao, C., 2010, “Synthesis and biological activity of 8-chloro-[1,2,4]triazolo [4,3-a]quinoxalines,” *J. Chem. Pharm. Res.*, 2(1): 497-504.
195. Valentina,P., Ilango, K., Deepthi, M., Harusha, P., Pavani, G., Sindhura, K. L., Keerthanam., C. G., 2009, *J. Pharm. Sci. & Res*, 2, 74.

196. Singh, R., Chouhan, A., "Important Methods Of Synthesis And Biological Significance Of 1, 2, 4-Triazol Derivatives *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences.*, 3, 8, 874-906.
197. Diwedi, R., Alexandar, S., Chandrasekar, M. J. N., 2011, *RJPBCS.*, 2, 194.
198. Kuş, C., Ayhan-Kilcigil, G., Can Eke, B., Iscan, M., 2004, "Synthesis and antioxidant properties of some novel benzimidazole derivatives on lipid peroxidation in the rat liver," *Arch. Pharm. Res.* 27, 156-163.
199. Ayhan-Kilcigil, G., Kuş, C., Çoban, T., Can-Eke, B., Ozbey, S., Iscan, M., 2005, "Synthesis, antioxidant and radical scavenging activities of novel benzimidazoles," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20, 503-514.
200. 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-triazol-3(4H)-thione derivatives of benzimidazole class," *Bioorg. Med. Chem.* 16, 4294-4303.
201. Khan, I., Ali, S., Hameed, S., Rama, N.H., Hussain, M.T., Wadood, A., Uddin, R., Ul-Haq, Z., Khan, A., Ali, S., Choudhary, M.I., 2010, "Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazol and 1,3,4-thiadiazole derivatives," *Eur. J. Med. Chem.* 45, 5200-5207.
202. 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-triazol-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.
203. 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-triazol-based Schiff base heterocycles," *Arch. Pharm. (Weinheim.)* 346, 922-930.
204. 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-triazol-3-thiols," *Adv. Microbiol.* 3) 366-375.
205. Koparir M., Orek, C., Parlak, A.E., Soylemez A., 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-triazol-3-thiones," *Eur. J. Med. Chem.* 63, 340-346.

206. Koparır, M., Orek, C., 2013, “Synthesis and biological activities of some novel aminomethyl derivatives of 5,50-butane-1,4-diyl-bis[4-allyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-thiones,” *Chem. Sci. Trans.* 2 181-191.
207. Dügü, E., Unver, Y., Unlüer, D., Sancak, K., 2014, “ Synthesis and biological properties of novel triazol-thiol and thiadiazole derivatives of the 1,2,4-triazol-3(5)-one class,” *Molecules* 19 (2014) 2199-2212.
208. El Sadek, M.M., Abd E-Dayem, N.S., Hassan, S.Y., Mostafa, M.A., Yacout, G.A., 2014, “Antioxidant and antitumor activities of new synthesized aromatic C-nucleoside derivatives,” *Molecules* 19, 5163-5190.
209. Barbuceanu, S.F., Ilies, D.C., Saramet, G., Uivarosi, V., Draghici, C., Radulescu, V., “Synthesis and antioxidant activity evaluation of new compounds from hydrazinecarbothioamide and 1,2,4-triazol class containing diarylsulfone” *Int J Mol Sci.* 17;15(6):10908-25.
210. <http://www.yeastgenome.org/>
211. <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp>
212. Koparır, P., 2012, “Amino Grubu İçeren Beş Üyeli Hetero Halkalı Bazı Bileşiklerin Sentezi Ve Biyolojik Etkilerinin Araştırılması,” *Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aksaray.
213. Selçuk, S., 2010, “Bazı Schiff bazı türevleri ve metal komplekslerinin antioksidan ve antitümör özelliklerinin incelenmesi, Y.lisans Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ocak, Elazığ.
214. Keleştemur, Ü., 2010, “Hidroksiüre Türevi Schiff Bazı Ve Bazı Metal Komplekslerinin Antioksidan Ve Antitümör Özelliklerinin Araştırılması,” Y.lisans tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ağustos, Elazığ.
215. Genç, Z. K., Selçuk, S., Sandal, S., Çolak, N., Keser, S., Şekerci, M., Karatepe M., 2014, “Spectroscopic, antiproliferative and antiradical properties of Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid based Schiff bases,” *Medicinal Chemistry Research* 23, 5,2476-2485
216. Kırbağ, S., Karatepe M., 2008, “Schiff Bazı Türevi Bileşikler ve Metal Kompleksleri İle Muamele Edilmiş Hücrelerin (*Saccharomyces Cerevisiae*) Antioksidan Ve Malondialdehid Düzeyleri” *Kromotografi* 2008, Konya.
217. Tumosienè, I. ve Beresnevičius, Z. J., 2009, “Synthesis of azoles from 3,30-[(4-alkoxyphenyl)imino]bis(propanoic acid hydrazides),” *Monatsh Chem*, 140 1523–1528.

218. Holla, B.S.; Veerendra, B.; Shivananda, M.K.; Poojary, B., 2003, "Synthesis, characterization and anticancer activity studies on some mannich bases derived from 1,2,4-triazols," *Eur. J. Med. Chem.*, , 38, 759-767.
219. Bayrak, H., Demirbaş, A., Karaoğlu, S.A., Demirbaş, N., 2009, "Synthesis of new 1,2,4-triazols, their Mannich and Schiff bass and evaluation of their antimicrobial activities" *Eur. J. Med. Chem*, 44:1057-1066.
220. Singhal, N., Sharma, P. K., Dudhe, R., Kumar, N., "Recent advancement of triazol derivatives and their biological significance", *J. Chem. Pharm. Res.*, 3(2):126-133 (2011).
221. Diplock, A.T., 1991, "Antioxdant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *Am. J. Chim Nutr.*," 53, 1895-1935.
222. Bott, A.B. and Green, M.A., 1991, "Effect of Glutation Depletion on The Biodistribution of Cu (PTSM) in Rats," *Int. J. Rad. Appl. Inst. B.*, 18, 865-868
223. Novelli, E.L., Silva, A.M., Monterio, J.P., Sacomani, L.B. and Novellif, J.L., 1997, "Free Radical Production by Azomethine H: Effectson Pancreatic and Hepatic Tissues, *Free Radic. Res.*, 26, 319-324.
224. Seon-Min, J., Song-Hae., Moon-Kyoo, J., Yeon-Hee, K., Kyung-Tak, N., Tae-Sook, J., Yong Bok, P., Myung-Sook, C., 2002, "Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits," *Clin Chim Acta.*, 317(1-2):181-90. 317, 1-2, 181-190.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : PARLAK, Akif Evren
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 18.10.1978 İstanbul
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (424) 571 23 02
Faks : 0 (424) 571 23 02
e-mail : akifparlak23@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Fırat Üniversitesi	Biyoloji Bölümü 2006
Lisans	Fırat Üniversitesi	Biyoloji Bölümü 2002
Lise	Elazığ Anadolu Lisesi	1996

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-.....	Fırat Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Hobiler

Tenis, Bilgisayar teknolojileri, Yüzme