

T.C.
B NGÖL ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ

BAZIB S (a-AM NOALK L-FOSF N K AS T) TÜREVLER N N
SENTEZ VE B YOLOJ K AKT V TELER N N ARA TIRILMASI

DOKTORA TEZ

TANER DA TAN

K MYA ANAB L M DALI

TEZ DANI MANI

PROF. DR. AHMET ÇET N

B NGÖL - 2017

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BİS(α -AMİNOALKİL-FOSFİNİK ASİT) TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Taner DAŞTAN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 24.04.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Ahmet CANSIZ

Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Ahmet ÇETİN

Üye (Danışman)

Prof. Dr.
Mustafa KARATEPE

Üye

Doç. Dr.
Murat SOYLU
Üye

Yrd. Doç. Dr.
Halil İbrahim GEÇİBESLER
Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalı mam boyunca yardımlarını esirgemeyen, teorik ve uygulamalarda gerekli deste i veren, bu çalı manın seçimi, planlanması, yürütülmesi ve hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilim adamı sıfatı ve ki ili iyle bana örnek olan de erli hocam Prof. Dr. Ahmet ÇET N'e, emeklerini ve bilgisini benden esirgemeyen, tezimin her a masında bulunarak çalı malarım süresince benden her türlü anlayı ve ilgiyi esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve ho görülerinden yararlandı ım, kendisiyle çalı ma fırsatına sahip oldu um için kendimi anslı hissetti im, bilim adamı sıfatı ve ki ili iyle kendime her zaman örnek alaca ım Prof. Dr. Metin KOPARIR hocama ve doktora e itimim süresince desteklerini her zaman yanımda hissetti im kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ahmet CANSIZ ve Prof. Dr. Mustafa KARATEPE' ye te ekkür ederim.

Tez çalı masına desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlü üne, Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Ara tırma Merkezine ve Vetagenom Ltd. ti Firmasına te ekkür ederim. Tez izleme komiteleri esnasında yaptıkları yönlendirmeler ve katkılarından dolayı de erli hocalarım Doç. Dr. Murat SOYLU'ya, ve Yrd. Doç. Dr. Halil brahim GEÇ BESLER'e deneysel çalı malar esnasında yardımlarını gördü üm ba ta de erli e im Yrd. Doç. Dr. Sevgi DURNA DA TAN'a ve uzman arkada ım Cahit ÖREK'e te ekkür ederim.

Üzerimde büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, güzel dualarıyla her daim yanımda olan anne ve babama, tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı e ime ve biricik kızıma özellikle te ekkürü bir borç bilirim.

Taner DA TAN

Bingöl 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Organofosfor kimyası.....	5
2.2. Organik fosfinik asitler.....	8
2.3. a-aminofosfinik asitler.....	10
2.4. Serbest radikaller ve oksidatif stres.....	13
2.5. Antioksidan savunma sistemleri.....	15
2.5.1. C vitaminini antioksidan etkisi.....	16
2.5.2. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT).....	17
2.5.3. Lipid peroksidasyonu ve malondialdehit (MDA).....	17
2.5.4. TAS-TOS-OSİ.....	18
2.5.5. Tiyol grubu.....	18
2.5.6. Paraoksonaz ve aril esteraz.....	18

2.6. Hücre kültürü ve etken madde araştırmaları	19
2.6.1. Apoptotik etkinlik	21
2.7. Kanser	22
2.7.1. Kanser hücrelerinin özgün nitelikleri	23
2.7.2. Kanser tedavisi ve etkili ilaç modelleri	24
2.7.3. Topoizomeraz enzim aktivitesi ve kanser	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan araç ve gereçler	28
3.2. Hücre hatları	29
3.3. Reaktifler	29
3.3.1. Antikanser aktivitelerin saptanmasında kullanılan reaktifler	29
3.3.2. <i>In vitro</i> antioksidan aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler	30
3.4. Araştırmada kullanılan bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşikleri	31
3.4.1. Hedeflenen fosfinik asit bileşiklerinin sentezinde yararlanılan schiff bazlarının (3a-h) genel sentez yöntemi.....	31
3.4.2. Hedeflenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin genel sentez yöntemi	32
3.5. <i>In vitro</i> antioksidan aktivitenin belirlenmesi	35
3.5.1. Metal şelatlama aktivitesi	35
3.5.2. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi	35
3.5.3. Süperoksit radikali giderme aktivitesi	36
3.5.4. Hidroksil radikali yakalama aktivitesi	37
3.5.5. Difenilpikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme aktivitesi	37
3.6. <i>In vitro</i> antitümör özelliklerin araştırılması	38
3.6.1. Hücre çözdürme protokolü	38

3.6.2. Hücrelerin yıkanması	38
3.6.3.Hücrelerin pasajlanması	38
3.6.3.1. Thoma lamı ile hücre sayımı	39
3.6.4. Hücrelerin 96 kuyucuklu platalere ekilmesi	40
3.6.5. Hücrelere etken madde uygulanması ve hücre büyüme performanslarının belirlenmesi	40
3.6.6. Hücrelere XTT uygulanması ve canlılık tespiti	41
3.6.7. Test bileşiklerinin apoptotik etkinliklerinin belirlenmesi	42
3.6.8. Kaspaz aktivitesinin ölçülmesi	42
3.7. Topoizomeraz enzim inhibisyon testleri	43
3.7.1. Süpersarmal DNA relaksasyon ölçümleri	43
3.7.2. Dekatenasyon ölçümleri	43
3.8. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	44
3.8.1. Mikrobiyal suşlar	44
3.8.2. Disk Difüzyon yöntemi	44
3.9. MCF-7 hücre kültürlerinde antioksidan aktivitelerin tespit edilmesi	45
3.9.1. Malondialdehit düzeylerinin analizi	45
3.9.2. Toplam antioksidan düzey analizi	45
3.9.3. Toplam oksidan düzey analizi	46
3.9.4. Oksidatif stres indeksi analizi	46
3.9.5. Toplam tiyol düzeylerinin analizi	46
3.9.6. Aril Esteraz (ArEs) enzimi analizi	47
3.9.7. Paraoksonaz (PON1) enzimi analizi	47
3.10. İstatistiksel analiz	48

4. DENEYSEL BULGULAR	49
4.1. 2,2-dimetilpropan-1,3-diilbis[imino(4-metoksifenil)metandiil]]bisfosfinik Asit'in Karakterizasyonu (4g)	49
4.2. <i>İn vitro</i> antioksidan aktivitelerin değerlendirilmesi	53
4.2.1. Metal şelatlama aktivitesi	53
4.2.2. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi	55
4.2.3. Süperoksit radikali giderme aktivitesi	59
4.2.4. Hidroksil radikali yakalama aktivitesi	62
4.2.5. DPPH süpürme aktivitesi	64
4.3. <i>In vitro</i> antitümör özelliklerin değerlendirilmesi	66
4.3.1. MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde canlılık değerleri	66
4.3.2. Test bileşiklerinin apoptotik etkinlikleri	71
4.4. Topoizomeraz enzimi aktivite değerleri	75
4.4.1. İnterkalasyon analizi	76
4.4.2. Süpersarmal DNA topoizomeraz ı relaksasyon ölçümleri	76
4.4.3. Topoizomeraz II dekatasyon ölçümleri	77
4.5. Antimikrobiyal aktivite sonuçları	78
4.6. MCF-7 hücre kültürlerinde antioksidan aktivite ölçümleri	78
4.6.1. Malondialdehit düzeylerinin değerlendirilmesi	78
4.6.2. Toplam antioksidan düzeyin değerlendirilmesi	80
4.6.3. Toplam oksidan düzeyin değerlendirilmesi	81
4.6.4. Oksidatif stres indeksinin değerlendirilmesi	83
4.6.5. Toplam tiyol düzeylerinin değerlendirilmesi	84
4.6.6. Aril Esteraz (ArEs) enzimi düzeylerinin değerlendirilmesi	85

4.6.7. Paroksonaz (PON1) enzimi düzeylerinin değerlendirilmesi.....	86
4.6.8. MCF-7 hücre kültüründe uygulanan fosfinik asit bileşiminin antioksidan aktivite kapasiteleri bakımından karşılaştırılması.....	88
5. TARTIŞMA.....	97
6. SONUÇ.....	106
KAYNAKLAR LİSTESİ.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	127



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Abs	: Soğurum (Absorbans)
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ADP	: Adenozin difosfat
APAF-1	: Apoptoz aktive edici faktör
ArEs	: Aril esteraz
ATP	: Adenozin trifosfat
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
Ca	: Kalsiyum
CAD	: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
CAT	: Katalaz
CKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
cm ²	: Santimetrekare
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
°C	: Santigrat derece
CuSO ₄	: Bakır sülfat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Dulbecco Fosfat Tamponu)
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH-H	: İndirgenmiş DPPH
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
DTA	: Differansiyel termal analiz
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ESR	: Elektron spin rezonans
FBS	: Fetal Bovine Serum, Fötal sığır serum

FeCl ₂	: Demir (II) klorür
FITC	: Floresanizosiyanat
GC-MS	: Gaz kromatografi-Kütle spektrometresi
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
HClO ₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC ₅₀	: Maksimum yarı inhibitör konsantrasyon
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOOH	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipid peroksidasyon
MCF-7	: Meme Kanseri hücre hattı
MDA	: Malondialdehit
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
OP	: Organofosfor
O ₂ • ⁻	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponu
PMS	: Fenazin meta sülfat
Ac-DEVD-pNA	: Kaspaz-3 substratı

pNA	: Kromofor p-nitroanilit
Ac-DEVDCHO	: Kaspaz-3 inhibitörü
PON	: Paraoksonaz
RO-	: Alkoksil radikali
ROO	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SD	: Standart sapma
SH	: Standart hata
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TAS	: Total antioksidan seviyesi
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
TOS	: Total oksidan seviye
XTT	: 2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid tuzu

- 4a: etan-1,2-diilbis{imino[(2-hidroksifenil)metandiil]}bisfosfinik asit
4b: etan-1,2-diilbis{imino[(4-metoksifenil)metandiil]}bisfosfinik asit
4c: etan-1,2-diilbis[imino(tiyofen-2-ilmetandiil)] bisfosfinik asit
4d: propan-1,3- diilbis{imino[(2-hidroksifenil)metandiil]}bisfosfinik asit
4e: propan-1,3-diilbis{imino[(4-metoksifenil)metandiil]}bisfosfinik asit
4f: propan-1,3-diilbis[imino(tiyofen-2-ilmetandiil)] bisfosfinik asit
4g: 2,2-dimetilpropan-1,3-diilbis[imino(4-metoksifenil)metandiil]bisfosfinik asit
4h: 2,2-dimetil propan-1,3-diil)bis[imino(tiyofen-2-ilmetandiil)] bisfosfinik asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Sentezlenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit bileşiklerinin (4a-h) sentez şeması.....	3
Şekil 2.1. Organofosfor bileşiklerinden bazı örnekler	5
Şekil 2.2. α -aminofosfinik asitlerin oluşumuna ait genel mekanizma.....	10
Şekil 3.1. Thoma lamının şematik hali	39
Şekil 4.1. 4g' nin FT-IR spektrumu	50
Şekil 4.2. 4g' nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	50
Şekil 4.3. 4g' nin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	51
Şekil 4.4. 4g' nin $^{31}\text{P-NMR}$ spektrumu	51
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin metal şelatlama aktiviteleri	57
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri	58
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin süperoksit giderme aktiviteleri.....	60
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin süperoksit giderme aktiviteleri (devamı).....	61
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin hidroksil radikali giderme aktiviteleri.....	63
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin DPPH giderme aktiviteleri	65
Şekil 4.11. Test bileşikleriyle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza ve inkübasyon süresine göre canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri...	68
Şekil 4.12. Test bileşikleriyle muamele edilmiş HUVEC hücrelerinin doza ve inkübasyon süresine göre canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri...	70
Şekil 4.13. a) Farklı konsantrasyonlarda (1-100 μM) bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevleriyle (4a-h) inkübe edilmiş, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin	

mikroskopik büyüme görüntüleri b) Farklı konsantrasyonlarda (1-100 μM) bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevleriyle (4a-h) 24 saat boyunca inkübe edilmiş MCF-7 hücrelerinin büyüme yüzdeleri.....	72
Şekil 4.14. a) AO/EB boyama mikroskop görüntüsü b) 50 μM konsantrasyonlu bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevleriyle 24 saat inkübe edilmiş MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında AO/EB boyama oranları c) 50 μM - 100 μM konsantrasyonlu bis(α -amino alkil)fosfinik asit türevleriyle 36 saat inkübe edilmiş MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında Kaspaz-3 aktivitesi.....	74
Şekil 4.15. İnsan topoizomerez I enzimi aktivite testi.....	75
Şekil 4.16. İnsan topoizomerez II enziminin asgari dekatasyon aktivitesini belirlemeye yönelik aktivite testi.....	76
Şekil 4.17. Bileşiklerin interkalatif özelliklerine belirlemeye yönelik interkalasyon analizi.....	76
Şekil 4.18. Bileşiklerin topoizomerez I' in aktivitesi üzerindeki etkisi.....	77
Şekil 4.19. Bileşiklerin topoizomerez I' in aktivitesi üzerindeki etkisi.....	77
Şekil 4.20. Bileşiklerin topoizomerez II' nin aktivitesi üzerindeki etkisi.....	78
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan hücre kültürlerinde MDA düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi.....	79
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde TAS düzeylerini gösteren grafik.....	81
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde TOS düzeylerini gösteren grafik.....	82
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde OSI düzeylerini gösteren grafik.....	83
Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde toplam tiyol düzeylerini gösteren grafik.....	85
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde aril esteraz enzimi düzeylerini gösteren grafik	86
Şekil 4.27. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde paraoksonaz enzimi düzeylerini gösteren grafik	88

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalı mada kullanılan bis(-aminoalkil-fosinik asit) türevlerinin (4a-d) genel özellikleri	33
Tablo 3.1. (devam). Çalı mada kullanılan bis(-aminoalkil-fosinik asit) türevlerinin (4e-h) genel özellikleri	34
Tablo 4.1. Sentezlenen fosfinik asit bile iklerine (4a-h) ait spektral veriler	52
Tablo 4.2. Çe itli in vitro antioksidan aktivite metodundan elde edilen, test bile ikleri ve standart çözeltilere ait <i>IC50</i> de erleri.....	53
Tablo 4.3. Test bile ikleri ve standart antioksidanların metal elatlama aktiviteleri	54
Tablo 4.4. Test bile ikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme aktiviteleri	56
Tablo 4.5. Test bile ikleri ve standart antioksidanların süperoksit giderme aktiviteleri	59
Tablo 4.6 Test bile ikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama aktiviteleri	62
Tablo 4.7. Test bile ikleri ve standart antioksidanların DPPH süpürme aktiviteleri ..	64
Tablo 4.8. Test bile iklerinin MCF-7 hücre kültürlerinde 24 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık de erlerinin istatistiksel kar ıla tırması	67
Tablo 4.9. Test bile iklerinin MCF-7 hücre kültürlerinde 48 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık de erlerinin istatistiksel kar ıla tırması.....	67
Tablo 4.10.Test bile iklerinin HUVEC hücre kültürlerinde 24 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık de erlerinin istatistiksel kar ıla tırması	69
Tablo 4.11.Test bile iklerinin HUVEC hücre kültürlerinde 48 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık de erlerinin istatistiksel kar ıla tırması	69
Tablo 4.12.Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bile ikleri uygulanmı MCF-7 hücre hatlarında MDA düzeyleri	79
Tablo 4.13.Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bile ikleri uygulanmı MCF-7 hücre hatlarında TAS düzeyleri	80

Tablo 4.14. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında TOS düzeyleri.....	82
Tablo 4.15. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında OSI düzeyleri	83
Tablo 4.16. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında toplam tiyol düzeyleri.....	84
Tablo 4.17. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında Aril esteraz enzimi düzeyleri.....	86
Tablo 4.18. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında Paraoksonaz enzimi düzeyleri.....	87
Tablo 4.19. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4a bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	89
Tablo 4.20. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4e bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	90
Tablo 4.21. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4f bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	91
Tablo 4.22. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4g bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	92
Tablo 4.23. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4h bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	93
Tablo 4.24. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4c bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	94
Tablo 4.25. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4b bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	95
Tablo 4.26. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4d bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi.....	96

BAZI BIS(α -AMİNOALKİL-FOSFİNİK ASİT) TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada; ilk önce diamin bileşikleri ile aldehitlerin reaksiyonundan 8 adet Schiff bazı sentezlenmiş ve sentezlenen bu bileşiklerin hipofosforöz asit ile etkileştirilmesi sonucunda 8 adet bis(α -aminoalkil-fosfinik asit bileşiği elde edilmiştir. Hedeflenen bisfosfinik asitlerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri, beş farklı yöntem kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşikler içerisinde etan-1,2-diilbis[imino(tiyofen-2-ilmethandiil)] bisfosfinik asit (**4c**), propan-1,3-diilbis[imino(tiyofen-2-ilmethandiil)] bisfosfinik asit (**4f**) ve 2,2-dimetil propan-1,3-diilbis[imino(tiyofen-2-ilmethandiil)] bisfosfinik asit (**4h**) bileşiklerinin serbest radikalleri temizleme aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan bileşiklerimizin antikanser aktiviteleri, insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattı ve normal endotelyal (HUVEC) hücre hattı üzerinde değerlendirilmiştir. Bileşiklerin hücre kültürleri üzerindeki etkileri, hücre büyümesi ve gelişmesi bakımından mikroskopik görüntüleme teknikleri kullanılarak, hücredeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri XTT yöntemi kullanılarak, hücre kültürlerindeki etki mekanizmalarının gösterilmesi kaspaz-3 aktivitesine ve apoptotik etkinliklerine bakılarak araştırılmıştır. Tüm fosfinik asit bileşiklerinin MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik olarak etkili olduğu, özellikle **4c**, propan-1,3-diilbis[imino[(4-metoksifenil) methandiil]] bisfosfinik asit (**4e**) ve **4f** bileşiklerinin kuvvetli aktivite gösterdikleri, **4e**, **4h** ve 2,2-dimetilpropan-1,3-diilbis[imino(4-metoksifenil) methandiil]]bisfosfinik asit (**4g**) fosfinik asitlerinin yüksek dozlarda apoptotik etkinliklerinin olduğu, kaspaz-3 aktivitelerini araştırdığımızda, AO/EB boyaması sonuçlarına göre, sadece **4e** bileşiğinin gerçekte apoptoz oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca **4f** ve **4h** fosfinik asit bileşiklerinin topoizomeras I üzerinde hafif bir inhibisyon etkisi olduğu, **4e** ve **4h** fosfinik asit bileşiklerinin topoizomeras II' yi yüzde elliye yakın, etan-1,2-diilbis[imino[(2-hidroksifenil)metandiil]]bisfosfinik asit (**4a**) bileşiğinin ise hafif olarak inhibe ettiği görülmektedir. Böylelikle sentezlenen fosfinik asit bileşiklerinin, ileriki çalışmalar için model moleküllerin seçimi ve tasarımında faydalanılabilecek nitelikte olduğunu, ayrıca biyomalzeme ve biyoyumlu malzeme olarak başka özelliklerinin de araştırılmasıyla birlikte sağlık ve/veya diğer endüstri sektörlerindeki katkılarının da ilerleyen çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: antioksidan, fosfinik asit, HUVEC, hücre kültürü, MCF-7, organofosfor.

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME BIS (α -AMINOALKYL-PHOSPHINIC ACID) DERIVATIVES

ABSTRACT

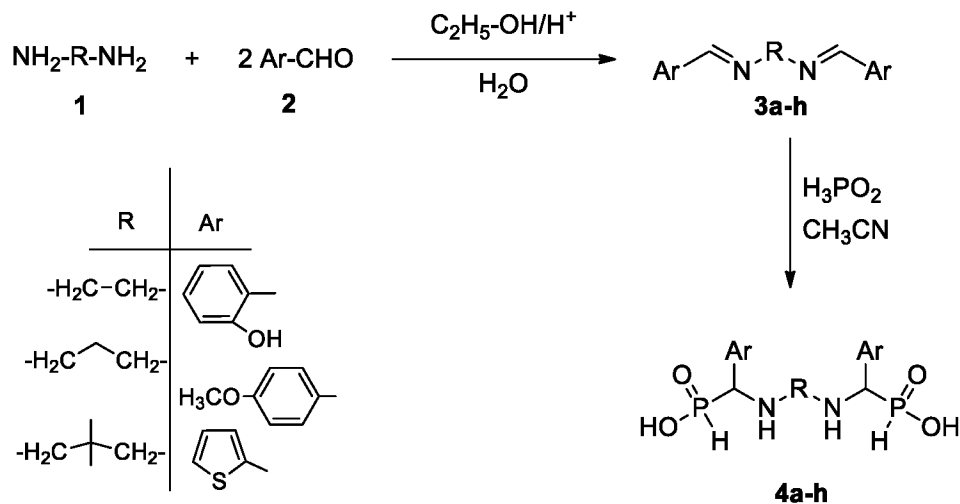
In this study, firstly 8 Schiff base synthesized from the reaction of diamine compounds with aldehydes and then 8 bis (α -aminoalkyl-phosphinic acid) compounds were obtained via the reaction of these Schiff base with the hypophosphorous acid. After being synthesised, these 8 bis (α -aminoalkyl-phosphinic acid) compounds were evaluated comparatively by five different methods for *in vitro* antioxidant activities. Among the synthesised compounds, it was determined that the free-radical scavenging activities of the ethane-1,2-diylbis[imino(thiophen-2-ylmethanediyl)]} bisphosphinic acid (**4c**), propane-1,3-diylbis[imino(thiophen-2-ylmethanediyl)]} bisphosphinic acid (**4f**) and 2,2-dimethyl propane-1,3-diylbis[imino(thiophen-2-ylmethanediyl)]}bisphosphinic acid (**4h**) were high. On the other hand, the anticancer activities of the bis(α -aminoalkyl- phosphinic acid) compounds were evaluated on human breast cancer (MCF-7) cell lines and normal endothelial (HUVEC) cell line. Also, the effects of bis (α -aminoalkyl-phosphinic) compounds on the cell cultures were investigated by using microscopic screening techniques in terms of cell growth and development; cytotoxic and antiproliferative effects in the cell were investigated by using the XTT method; demonstrating the action mechanisms on the cell culture was investigated by observing the kaspaz-3 activity and apoptotic effects. When we investigated the kaspaz-3 activities, that all the phosphinic acid compounds were effective as cytotoxic in MCF-7 and HUVEC cells, that especially **4c**, propane-1,3-diylbis{imino[(4-methoxyphenyl) methanediyl]} bisphosphinic acid (**4e**) and **4f** compounds demonstrate a strong activity, that **4e**, **4h** and 2,2-dimethylpropane-1,3-diylbis[imino(4-ethoxyphenyl)methanediyl]}bisphosphinicacid (**4g**) had apoptotic activities at a high dose, according to the AO/EB staining results, that only **4e** actually compound formed apoptosis were determined. Also, it is observed that **4f** and **4h** phosphinic acid compounds had a slight inhibitory effect on Topoisomerase, **4e** and **4h** phosphinic compounds inhibited the Topoisomerase II at a rate close to fifty percent, and Ethane-1,2-diylbis{imino[(2-hydroxyphenyl)methanediyl]} bisphosphinic acid (**4a**) compound inhibited it slightly. Hereby, we are in the opinion that the synthesised phosphinic acid compounds have the quality to be benefited from in the selection and design of the model molecules for the studies in the future, and it is necessary to evaluate their contributions in health and/or other industrial sectors by investigating their other properties as biomaterial-biocompatible materials in the future studies.

Keywords: antioxidant, cell culture, HUVEC, MCF-7, organophosphorus, phosphinic acid.

1. GİRİŞ

Canlıların yaşam süreçlerinde önemli yapısal ve fizyolojik roller üstlenen, taşıma, savunma, dolaşım, boşaltım, sinir sistemi gibi pek çok sistemin düzenli olarak çalışmasını sağlayan çeşitli proteinlerin temel bileşeninin amino asitler olduğu çok iyi bilinmektedir. 1-aminofosfinik asit molekülleri de doğal amino asitlerin fosfor analoglarıdır ve özellikle metaloproteazlar gibi çeşitli proteolitik enzimlerin de seçici inhibitörleridir (Latajka et al. 2008; Cates and Li 1985; Ye et al. 2008; Sarac et al. 2016). Bu sebeple, son zamanlarda potansiyel antibakteriyal, antitümöral ve antivirütik materyaller olarak geliştirilmek üzere, aminofosfinik asitler sıklıkla araştırılmakta ve biyolojik süreçlerdeki rollerinin anlaşılmasıyla birlikte gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Gittens et al. 2005; Sanders et al. 2003; Collinsova and Jiracek 2000). Aminofosfinik asit ligantları ve onların kompleksleri hakkında, taşıdıkları kendilerine özgü orijinal yapıları ve niteliklerinden dolayı çok fazla fikir ileri sürülmektedir (Kafarski et al. 1995; Luckman et al. 1998; Kato et al. 1996; Kabuodin and As-Habei 2003; Kabuodin et al. 2007; Kabuodin and Jafari 2008). Aminofosfinik asitler, ayrıca doğal ürünlerin bileşenleri olarak da bulunabilmektedirler (Kukhar and Hudson 2000). Farmakolojik olarak aktif olmaları kanıtlanmasına rağmen, geniş bir şekilde araştırılan α -aminofosfonik asitlerin aksine α -diaminofosfinik asitler/aril-alkildiaminofosfinik asitler ile ilgili rapor edilen daha az çalışma vardır. Genellikle yaygın olarak çalışılmış olan 1-aminofosfonik asit türevlerinin (Hyun-Joon and Gong-Shil 1992; Gancarz and Wieczorek 1978; Seyfert et al. 1971; Worms and Schmidt-Dunker 1976) tam aksine, nispeten daha az sayıdaki makalede α -aminofosfinik asit türevlerinin kimyası bildirilmiştir. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil vb gibi reaktif oksijen türleri (ROT), oksijenli solunum yapan tüm hücrelerin metabolik süreçlerinde veya eksojen kaynaklı çeşitli ajanların etkisiyle oluşmaktadır. Düşük ROT seviyeleri, hücre fonksiyonlarının gerçekleşmesi için gerekliyken, reaktif oksijen türlerinin çok fazla yükselmesi kardiovasküler bozukluklar, kanser, nörodejeneratif bozukluklar gibi pek çok hastalığın ve yaşlanmanın sebeplerinden biri olarak gösterilen oksidatif strese sebep olur. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT)

ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri, yaşayan organizmalarda oksidatif hasarlara karşı primer hücrel savunma sistemi olarak hareket etmektedir. Organofosfor bileşikleri ve heterosiklik bileşikler, özellikle, antioksidan ilaçlar olarak kabul edilmektedir (James et al. 2013; Katoh et al. 2007; Sarac et al. 2016). Onların mekanizmaları ve yapı-aktivite ilişkileri (structure activity relationships, SAR) yaygın bir şekilde çalışılmaya devam etmektedir (Abduo et al. 2015). Organofosforlu bileşikler sahip oldukları biyolojik ve fiziksel özelliklerinin yanında sentetik ara ürün olarak da kullanılmasından dolayı endüstriyel, tarımsal ve tıbbi kimya alanlarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Palacios et al. 2004). α -aminofosfonik ve fosfinik asitler, α -aminokarboksilik asitlerin fosfor analoglarıdır ve bu yüzden de önemli biyolojik öneme sahiptirler (Örek, 2012). Birçok doğal ve sentetik aminofosfinik asit bileşikleri, enzim inhibitörü, HIV-proteaz (Atherton et al. 1987), renin (Allen et al. 1989) ve antibiyotik (Kukhar and Hudson 2000) gibi çeşitli biyolojik özellikler göstermektedir. Organofosfor bileşiklerin yapı ve serbest radikal temizleme niteliklerine bağlı olarak, fosfitler ve fosfonatlar hem primer ve hem de sekonder antioksidanlar olarak hareket edebilirler. Genel olarak fosfitler, hidroperoksit parçalayıcı moleküller (sekonder antioksidan) olarak düşünülürler, fakat belirli aril fosfitlerinde peroksil radikalleri yakalama yoluyla aroksil radikalleri üretmek şeklinde radikal zinciri sonlandırıcı (primer antioksidan) olarak hareket etme kapasitesi taşıdıkları düşünülmektedir. Son zamanlardaki bazı çalışmalar bir takım organofosfor bileşiklerinin reaksiyon modları ve yapısı, reaksiyon mekanizması ve antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişkiyi aydınlatmıştır (Katoh et al. 2007; Abdou et al. 2015). Çalışma grubumuz tarafından siklobütan ve 1,3-tiyadizol içeren yeni aminofosfinik asitlerin sentezi ve *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri rapor edilmiştir (Koparir et al. 2011, 2012). Bu tez çalışması kapsamında önceki çalışmaları geliştirerek, bir dizi bis (α -aminofosfinik asit) türevleri hazırlanmıştır (Şekil 1.1). Fosfinik asit türevlerinin önemi açısından, bu tez çalışmasının amacı, yeni biyolojik olarak aktif, ilaç olma potansiyeli taşıyan molekülleri çeşitli *in vitro* antioksidan aktiviteleri, antitümöral özellikleri, apoptotik ve kaspaz aktiviteleri, yine çeşitli antioksidan enzimlerle verdikleri etkileşimleri ve de bunları tamamlayıcı bir yöntem olarak topoizomeraz aktiviteleri açısından araştırarak değerlendirmektir.



Şekil 1.1. Sentezlenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin (**4a-h**) sentez şeması

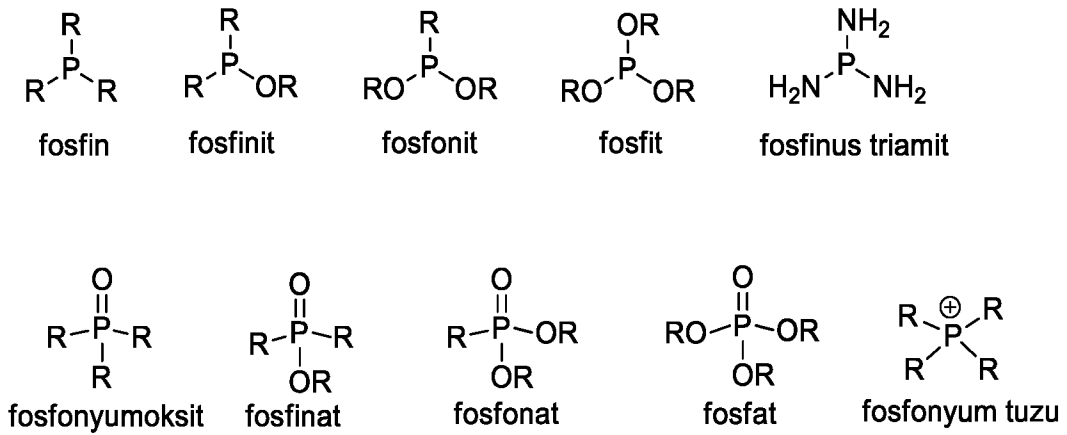
Burada bis (1-aminofosfinik asitler) ve bunların antioksidan, antimikrobiyal, antitümöral aktiviteleri ile yine bu konularla bağlantılı olacak şekilde topoizomeraz aktivitelerinin değerlendirildiği bir ön biyolojik çalışma ve organik kimya alanında ilaç sentezlemeye ve yeni ilaç modellerinin oluşturulabilmesine yönelik güncel bir araştırma sunulmuştur. Nitekim günümüzde; organik sentezlerde geniş antimikrobiyal, antitümöral ve biyolojik aktiviteye sahip polifonksiyonel bileşiklerin sentezi önemli bir alan oluşturmaktadır. Bu açıdan bakıldığında sentezlenen bu maddelerin, tıp, eczacılık, ilaçbilim ve toksikoloji vb gibi farklı disiplinlerde yeni araştırma konuları oluşturacağı ve farklı çalışma alanları ortaya çıkarabileceği kanaatindeyiz. Diğer taraftan tıp ve farmakoloji çalışmalarının büyük bir kısmı, günümüzde oldukça yaygın görülen ve ne yazık ki çözümü henüz bulunamamış olan kanser üzerinedir. Bilimsel literatürün önemli bir kısmını bu hastalığın gelişiminin altında yatan nedenler ve olası tedavi yöntemlerinin araştırılması oluşturmaktadır. Ancak, yoğun çalışmalara rağmen kanser de dahil pek çok hastalık için radikal tedavilere henüz ulaşamamıştır (Bülbül 2011). Kanser hala günümüzde milyonlarca kişiyi etkileyen ve yüz binlerce insanın hayatını kaybetmesine neden olan çok önemli bir sağlık sorunudur. Elde edilen veriler bu durumun gelecek zaman dilimi içerisinde de artarak devam edeceğini göstermektedir. Hastalığın etkin tedavisi için yeni ve etkin bileşiklerin keşfi ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Vakit kaybedilmeden yeni bilimsel keşiflerin kanser tedavisinde kullanılması adına yeni yaklaşımlara dönüştürülmesinin önü açılmalı ve kanserle savaşta etkin tedbirlerin belirlenmesi gerekmektedir. Genel olarak çeşitli hastalıkların veya çeşitli kanserlerin

gelişiminde hücre içi birtakım yolların etkili olduğu bilinmektedir. Çeşitli farmakolojik çalışmalar bu yolları inhibe ederek etkileyebilecek çeşitli etkili bileşiklerin varlığını ortaya koymuştur. Bazı bilinen inhibitör bileşikler ise çeşitli yolları anında etkileyip, buldukları alanda ters etki oluşmasına da sebep olabilmektedir. Nitekim hücre kültürü araştırmaları, çeşitli hücrelerin *in vitro* kültürlerini yaparak araştırmacıların kanser, kök hücre, hücre mekaniği çalışmaları gibi konularda hücre içi ve hücreler arası biyokimyasal olayların moleküler düzeyde inceleyebilmelerini ve bu incelemelerini devamlı olarak hücre üretimleriyle sürekli halde yapabilmelerini sağlamaktadır. Hücrelere istenilen deneysel uygulanmaların kontrollü bir şekilde ve kolaylıkla yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu şekilde *in vitro* toksikoloji çalışmaları, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik düzeydeki çalışmalar kolaylıkla planlanabilmekte ve takibi yapılabilmektedir. Aşı üretimi, kök hücre tedavileri gibi pek çok araştırmayı kolaylaştırmakta ve neticelendirmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle tarafımızdan sentezlenen amino fosfinik asit türevlerinin hücre kültürüne uygulanarak çeşitli analizlerle kapsamlı olarak incelenmesi, antimikrobiyal, antitümöral özelliklerinin, *in vitro* antioksidan aktivitelerinin ve topoizomeraz aktivitelerinin kapsamlı olarak araştırıldığı bu tez çalışmasının orijinal ve özgün bir organik kimya araştırması olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullanılan bis (α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin daha ileri araştırmalarla ilaç sektöründe önem arz edebileceğine inanmaktayız. Ayrıca temel araştırma düzeyinde bile olsa bu konunun literatüre kazandırılması da önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ (GENEL BİLGİLER)

1.1. Organofosfor Kimyası

Fosfor atomu pek çok elementle bağ yapabilir, farklı değerlikler alabilir ve boş d-orbitali nedeniyle çok iyi bir elektron alıcısı olarak bileşiklerin yapısına katılabilir. Organofosfor bileşikleri, karbon fosfor bağları içeren kimyasal moleküllerdir. Organofosfor kimyası, organofosfor bileşiklerinin reaktivliğini ve özelliklerini keşfetmeye çalışan bilimsel bir alan olup aşağıda bazı organofosfor bileşiklerinden örnekler verilmiştir (Şekil 2. 1).



Şekil 2.1. Organofosfor bileşiklerinden bazı örnekler (Mazzacurati et al. 2007)

Organofosfor kimyası, inorganik fosforlu asitlerin organik türevleri veya fosforkarbon bağı içeren çok sayıda kararlı fonksiyonel grupların varlığına dayanır. Geniş ve bir hayli dinamik olan bu alanı, akademik ve endüstriyel kimyacılar cazip bulmaktadırlar. Organofosfor bileşiklerinin çok sayıda ticari uygulama alanının olması ve bu bileşiklerin fosforsuz organik bileşiklerin sentezinde reaktif olarak kullanılmaları, organofosfor kimyasını heyecan verici kılmaktadır. Organik kimyanın çoğunda olduğu gibi organofosfor kimyasındaki çalışmalar da ondokuzuncu yüzyılda başlamıştır. Fosfor kimyası ile ilgili çalışmalar uluslararası düzeydedir ve bu konuda öne çıkan iki ülke ise

Almanya ve Rusya'dır. II. Dünya savaşı sonraki dönemde bazı fosforik ve fosfonik asit esterlerinin güçlü insektisidal etkilerinin keşfi bu alandaki önemli gelişmelerin başlangıcı olmuş ve 1970'lere kadar yaklaşık 100.000 organofosfor bileşiği bulunmuştur. Diğer taraftan pek çok organofosfor ve fenoksi bileşikleri sahip oldukları biyolojik aktif molekül özellikleriyle bilinmektedir ve genellikle herbisit olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Bonarska et al. 2002). En çok bilinen herbisit özellikli organofosfor bileşikleri olarak 2,4-diklorofenoksiasetik asit ve onun türevleri (Suwalsky et al. 1996; Medyantseva et al. 1997; Oruç ve Üner 1999), glifozat (N-fosfonometilglisin; gliserol fosforik asit) (Cole 1985), Trakephon (dietil-1-butilamino-1-sikloheksanfosfonat) (Perkov 1988) ve fluorene'in aminofosfonik asit türevleri tanınmaktadır (Lejczak et al. 1988; Gancarz and Dudek 1996). Organofosfor maddelerin pestisit olma niteliklerinin, lipofilik özellikleriyle yakından ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Nitekim esas olarak organofosfor bileşiğin hücre membranından içeri girişini lipofilik özellikleri belirlemektedir. Ayrıca organofosfor bazı bileşiklerin, eritrosit membranından içeri girmesiyle birlikte, eritrosit hücrelerini UV hasarından kaynaklanan oksidasyona karşı korudukları da gözlenmiştir (Kleszczyńska et al. 1998, 2000; Kleszczyńska and Sarapuk 2001). Bu yüzden organofosfor ve fenoksi pestisitlerin antioksidatif ajanlar olarak hareket ettiği de bilinmektedir, belkide bu sebepten ötürü tillaipia balıklarının karaciğerinde uygulanan oksidatif stres çalışmalarında, organofosfor bileşikleri uygulandığı zaman bazı antioksidan enzimlerin azaldığı gözlenmiştir (Oruç ve Üner 2000). Diğer taraftan asetilkolinesteraz üzerinden gerçekleşen organofosfor zehirlenmelerinde oksidatif stresin hastalık patolojisinde ko-letal faktör olarak tanımlandığı bilinmektedir (Dandapani et al. 2003; Vidyasagar et al. 2004; Ranjbar et al. 2005; Possamai et al. 2007; Shadnia et al. 2007; Nurulain et al. 2013). Ayrıca pek çok makalede organofosfor zehirlenmelerinde oksidatif stresin arttığı bildirilmekte, zehirlenme prognozunda klinik kanıt olarak oksidatif stres indeksinin rolü vurgulanmaktadır (Kovacic 2003; Abdollahi et al. 2004; Pena-Llopis 2005; Soltaninejad and Abdollahi 2009; Lukaszewicz-Hussain 2010; Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011). Bu yüzden tedavide organofosfor antidotları olarak antioksidan madde kullanımının yararlı olabileceği önerilmektedir (Çankayalı et al. 2005; Nurulain et al. 2013). Bundan başka organofosfor bileşikler özellikle fosfonatlar, farmasotik ilaçlar için mihenk taşı niteliğindedir. Pek çok fosfonat grubu madde antifungal, antibakteriyal, antikanser ve analjezik/antiinflammatuvar etkilere sahiptir. Fosfitler ve fosfonatlar hem primer hemde sekonder antioksidan moleküller

olarak hareket edebilirler ve pek çok fosfonat molekülünün rat beyin homojenatlarında eritrositlerdeki lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kamel 2015). Zaman içerisinde organofosfor bileşiklerinin aktiviteleri üzerine olan çalışmalar hızla devam etmektedir ve bunun sonucunda da çok sayıda kullanım alanı keşfedilmiştir (Örek 2012). Bu kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Zirai kimyasallar olarak: Bitki büyüme düzenleyicileri, herbisit ve insektisit şeklinde,
- Tıbbi bileşikler olarak: Kemik hastalıkları tedavisi için kullanılan reaktifler ve antikanser, antibakteriyel ve antiviral reaktifler şeklinde,
- Birçok endüstriyel işlemden (oksohidroformilasyon, olefin hidrojenasyonu, Reppe olefin polimerizasyonu, asimetrik sentez vb) kullanılan katalizörlerin hazırlanmasında ve de optikçe aktif fosfin ligandlarını içeren metal katalizörleri biçiminde asimetrik sentez sürecinde,
- Yanmayı geciktirici olarak, kumaş ve plastiklerde,
- Plastik endüstrisinde plastikleştirme ve kararlılaştırma reaktifi olarak,
- Maden cevherlerinden metal tuzlarının özellikle uranyumun seçici ekstraktanı olarak,
- Petrol ürünlerinde katkı maddesi olarak,
- Korozyon önleyicisi olarak organofosfor bileşikler kullanılmaktadır.

Fosfinler ve kalkojenitleri fosfora bağlı grupların alfabetik sırayla ifade edilmesiyle başka bir yorum gerektirmeden kolaylıkla adlandırılmaktadır. R_2P- için dialkilfosfino, $R_2P(O)-$ için dialkilfosfinil, $R_2P(S)-$ için dialkiltiyofosfinil öneki vb kullanılabilir. Fosfonyum tuzları da sübstitüentlerin alfabetik sırayla söylenmesiyle basit bir şekilde adlandırılır ve “trialkilfosfino” öneki kullanılmaktadır. Fosfonyum tuzları, heteroatomları ile aynı şekilde adlandırılmaktadır. Fosfor kimyasındaki ana asitlerin adlandırılması, bağlı olan karbon sayısına (bir C-P bağı -on, iki C-P bağı -in takısı ile belirtilir) ve oksidasyon basamağına (yüksek oksidasyon basamağında -ik, düşük oksidasyon basamağında -öz takısı) bağlı olarak ifade edilmektedir. Asitlerin birçok türevi sübstitüentlerin bir karışımı ile bilinmektedir. Bu nedenle gerekli olan yerlere alfabetik sırayla son ekler getirilmektedir. Yaygın olarak bilinen son eklere amit veya amido-, hidrazid(o), flor(o), klor(o), brom(o), siyano, tiyo, seleno gibi örnek verilebilir. Bunlar oksidasyon basamağı takısının tam öncesinde ismin içinde yer almaktadır (Hartley 1990). Beş koordinasyonlu

PH₅ ve türevleri olan yapılar fosforan diye adlandırılırken, süstitüentleri alfabetik sırayla verilmektedir (Quin 2000; Örek 2012).

2.2. Organik Fosfinik Asitler

Bisfosfonatlar (BP) ve amino-fosfonatlar, ilginç farmasotik niteliklere sahip bisfosfonik ve bisfosfinik asitlerin önemli bir başlangıç maddesidir. Fosfonatlar ve fosfonik asitler, C-PO(OH)₂ veya C-PO(OR)₂ grupları (R grubu, alkil veya aril olabilir) taşıyan organofosfor bileşiklerdir ve prokaryotlardan, ökaryotlara, mantarlara, yumuşakçalara, böcekler kadar çok farklı organizma gruplarında oldukça yaygındırlar (Mader and Bartlett 1997; Örek ve Koparı 2012; Gilard et al. 1999). Bisfosfonatlar (difosfonat olarak da bilinmektedir)'in keşfi 19. yüzyılda olmuştur ve ilk olarak 1960 yılında çalışılmıştır. Bis veya polifosfonatların doğal olarak meydana geldiği tespit edilmemiştir. Bisfosfonatlar, P-C-P bağıyla karakterize olan sentetik organik bileşiklerdir. İki adet fosfonat (PO₃) grubu taşıdıkları için bisfosfonatlar olarak adlandırılmaktadırlar. P-C-P bağ yapısı, karbon atomu üzerindeki iki lateral zincirin değiştirilmesiyle birlikte çok sayıda molekül varyasyonunun oluşmasına imkan tanımaktadır. Bisfosfonatların yapısındaki küçük değişiklikler, fizikokimyasal, biyolojik, terapötik ve toksikolojik karakteristiklerinde oldukça önemli değişiklikler meydana getirmektedir. Bisfosfonat bileşikleri yeni nesil antioksidan ve antidiyabetik etken maddeler olarak da parlamaktadırlar. (Kamel 2015). Bunlara ilaveten bisfosfonat bileşiklerinin osteoklastik olarak meydana gelen fokal kemik hasarlarının oluştuğu romatoid artrit ve osteoporoz gibi bazı hastalıkların tedavisinde etkili olduğu belirtilmektedir (Breuil and Euler-Ziegler 2006). Günümüzde bazı metabolik kemik hastalıkları, osteoporöz, multiple myeloma, ankilozan spondilit, paget hastalığı, malignansiye bağlı olarak gelişen hiperkalseminin tedavisi ile meme-akciğer- prostat kanserleri gibi çeşitli tümörlere ait kemik metastazlarının bulunduğu olgularda genel olarak bisfosfonat grubu ilaçlardan yararlanılmaktadır (Migliorati et al. 2006; Sezer ve Şen 2011). Burada kemik kayıpları sürecinde bisfosfonat bileşiklerinin ana hedefi fokal kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücre tipi olan osteoklast hücreleridir ve bisfosfonat bileşikler bu hücrelerde potansiyel olarak antirezorptif ajan olarak etki etmektedir. Her ne kadar bisfosfonat bileşiklerinin insanlar üzerinde yapılan çalışmaları çok az sayıda olsa da, aminobisfosfonat gibi yeni nesil bisfosfonat bileşikleriyle hayvanlar üzerinde yapılmış çalışmalar ümit vericidir.

Bisfosfonat bileşikler temel olarak amino-bisfosfonatlar (alendronate, ibandronate, risedronate, pamidronate, zoledronate, ve icandronate gibi) ve non-amino-bisfosfonatlar (etidronate, tiludronate ve clodronate gibi) olmak üzere iki kategoride incelenmektedir. Bisfosfonatlar kemik rezorpsiyonunu inhibe eden endojen pirofosfatazların analogudur ve tıp alanlarında kullanımları yaklaşık 30 yıllık bir geçmişe dayanmaktadır. Kimyasal yapısında karbon atomuna bağlı iki fosfor atomu bulunmakta ve spesifik olarak kemik dokusuna olan çekim güçleri negatif yüklü fosfat gruplarından kaynaklanmaktadır. Her ne kadar moleküler mekanizmaları farklı olsa da, her iki kategorideki etken maddelerde osteoklastik apoptoz olayıyla gerçekleşen kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir (Sezer ve Şen 2011). Diğer taraftan bisfosfonat grubu ilaçların yüksek dozda intra venöz olarak kullanıldığı hastalarda tedavi sırasında ve sonrasında özellikle çene kemiklerinde osteonekroz gibi istenmeyen yan etkiler gelişebilmektedir (Ergün vd 2008; Sezer ve Şen 2011). Kemik rezorpsiyonunu engellenmesi dışında bisfosfonat bileşikler, insan meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunun engellenmesi ve apoptozun uyarılması şeklinde antitümoral etkilerde sergilemektedirler.

Doğal olarak meydana gelen fosfonatlardan 2-aminoetilfosfonik asit (amino-bis-fosfonat grubu) ilk olarak 1959 yılında bitkilerde ve pek çok hayvansal organizmanın zar yapılarında lokalize olarak tespit edilmiştir. Amino asitlerle yapısal benzerliklerinden dolayı, özellikle ziraat ve sağlık kimyası konularında aminofosfonatlar son yıllarda ilgi çekmektedir (Prasad and Rao 2013; Moonen et al. 2004; Kafarski and Lejczak 2001; Abdel-Monem 2010; Schug and Lindner 2005; Wroblewski et al. 2008). Aminofosfonik asit türevleri hapten olarak katalitik enzim-antikor yapılarında, geçiş fazı analogları yapılarında bulunarak, peptid hidrolizi gibi olayları gerçekleştirebilmektedir (Gouverneur and Lalloz 1996). Bu özellikleriyle de yeni enzim inhibitör maddelerinin geliştirilmesinde çok önemli moleküller olarak düşünülmektedirler (Meyer et al. 2004; Smith and Bartlett 1998). Son zamanlardakapsamlı araştırmalarla α - ve β -aminofosfonik asitlerin sentezi tıptan ziraate kadar pek çok alanda ticari olarak kullanılabilir yeni bir takım ilaç sınıflarının oluşmasına sebep olmuştur (Kafarski and Lejczak 2001; Kukhar and Hudson 2000; He et al. 2012).

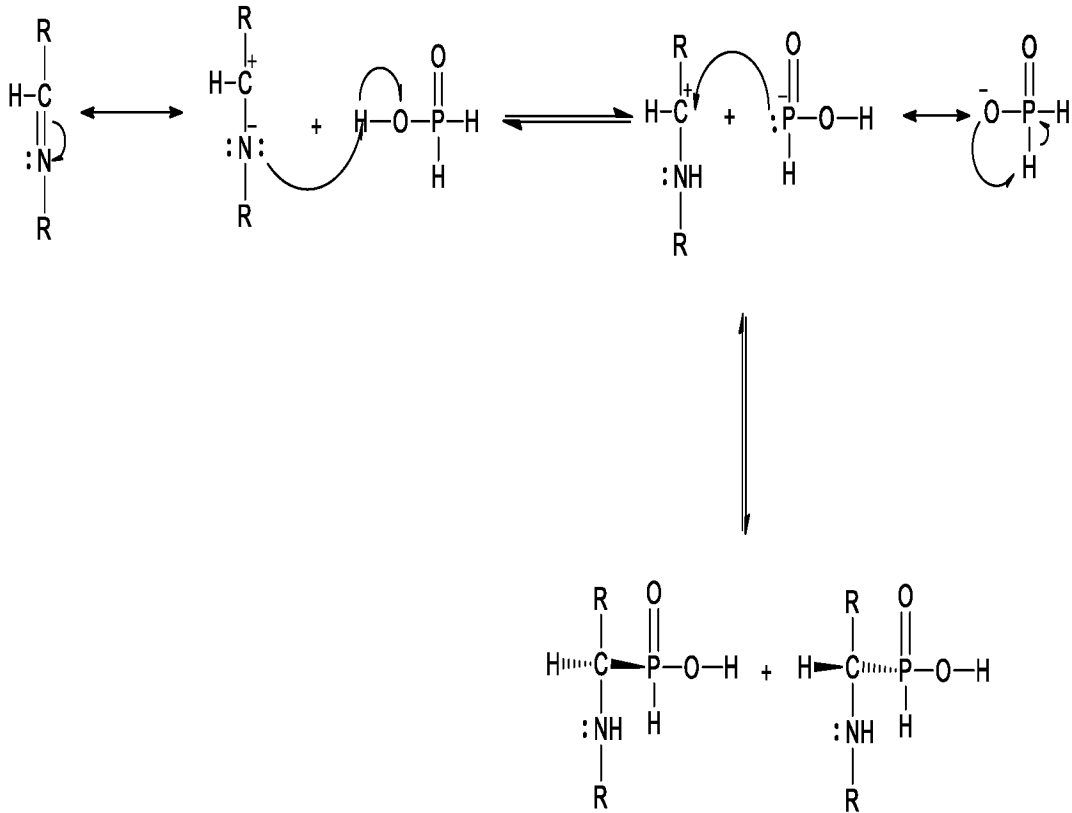
Diğer taraftan fosfinik asitler ise, biyolojik süreçlerdeki rollerinin anlaşılması ile birlikte gittikçe artan bir öneme sahip olmuşlardır (Moonen et al. 2004). Son yıllarda α -süstitüte

fosforil türevlerinin sentezi, (fosfonik ve fosfinik asitler) enzim inhibitörü, antimetabolit ve antibiyotik (Collinsova and Jiracek 2000) gibi, geniş biyolojik uygulama alanına sahip olmalarından dolayı oldukça dikkat çekmişlerdir.

2.3. α -aminofosfinik Asitler

Aminoalkilfosfinik asitler, 1-amino karboksilik asitlerin fosfinik asit analoglarıdır ve sergiledikleri ilginç ve yararlı özelliklerinden dolayı önemli bileşiklerdir. α -aminofosfinik asitlerin farmakolojik olarak aktif olmaları kanıtlanmasına rağmen geniş bir şekilde araştırılmış olan 1-aminoalkilfosfonik asit türevlerine nazaran daha az çalışması vardır.

Şekil 2.2' de 1-aminoalkilfosfinik asitlere ait genel oluşum mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Aminofosfinik asitlerin oluşumuna ait genel mekanizma

Fosfinik asitler arasında α -aminoalkilfosfinik asit türevleri, antibakteriyel (Collinsova and Jiracek 2000), herbisit (Kafarski et al. 1995) ve antimantar (Kolodiaznyi 2005) gibi özelliklerinden dolayı bir biyolojik potansiyel taşımaktadırlar. (Dingwall et al. 1979; Ishiguri et al. 1985; Kafarski et al. 1995). Bununla beraber fosfinik fonksiyonel grubun, peptit hidrolizinin geçiş halini taklit etmesi ve fosfinik asit türevlerinin simetrik doğasından dolayı, C_2 eksenli simetriye sahip olan HIV-proteaz homodimeri için, bağlayıcı olarak yararlı olması beklenmektedir (Ishiguri et al. 1982). Proteolitik enzimler, peptit substratlarından bir amid bağının koparılmasından sorumludur ve bu nedenle de ilaç tasarımında ve geliştirmesinde en dikkat çekici hedeflerin başında yer almaktadırlar (Babine and Bender 1997; Leung et al. 2000). Yüksek derecede seçici ve güçlü proteaz inhibitörlerinin keşfi sürekli bir sorun olmuştur. Fosfinik kısmın ($-PO_2-CH_2-$), peptit bağının hidrolizindeki yüksek enerjili tetrahedral geçiş halini taklit etmesi, fosfinat yalancı peptitlerinin proteolitik enzimlerin güçlü bir inaktivatörü olarak önemli derecede ilgi çekmesini sağlamıştır (Collinsova and Jiracek 2000; Kafarski et al. 2000; Yiotakis et al. 2004).

Çalışmamızdaki organik fosfinik asitlerin sentezlenmesi için birinci basamakta schiff bazlarının sentezi gerçekleştirilmiştir. Schiff bazları, azometin ($-CH=N-$) grubu içeren bileşiklerdir. Schiff bazları ilk defa 1860'da Alman kimyager Hüge Schiff tarafından sentezlenmiştir (Örek ve Koparı 2012). Schiff bazları genellikle, karbonil bileşikleri ile primer aminlerin kondenzasyonu ile oluşmaktadır. Schiff bazlarının oluşumunda reaksiyon şartlarının etkisi kadar kullanılan aldehit miktarının da önemli olduğu bulunmuştur. Schiff bazı oluşumunda en fazla kullanılan karbonil bileşikleri, salisilaldehit, p-metaksibenzaldehit, tiyofen-2-karbaldehit, fenoller, pridoksal, o-hidroksi naftaldehit, piridin-2-aldehit, diasetil pridin, ve pürüvik asittir. Kullanılan amin bileşikleri ise diaminler, alkil aminler, aminoasitlerdir (Örek ve Koparı 2012). Aromatik aldehitlerden oluşan schiff bazları daha stabil ve hidrolize karşı dirençli iken, alifatik aldehitlerden oluşan schiff bazları hızlı bir şekilde polimerleşebilir ve kararsızdır (Örek ve Koparı 2012). Bu yüzden schiff bazlarının kolayca hidroliz olabildikleri göz önünde bulundurularak, sentezleri sırasında susuz ortamda çalışılmalıdır. Diğer taraftan tepkime esnasında meydana gelen su ise azeotrop bir karışım oluşturabileceği bir çözücü ile uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca aromatik aldehitlerin düşük sıcaklıklarda bile uygun bir çözücü ortamında aminlerle kolaylıkla reaksiyona girebilecekleri bilinmektedir. Aromatik

aldehitlerin aromatik aminlerle kondenzasyon reaksiyonlarında aldehitte *para* pozisyonunda elektron çekici bir süstitüentin bulunması reaksiyon hızını arttırırken, amin gibi elektron verici süstitüenlerin bulunması reaksiyon hızını azalttığı anlaşılmıştır. Aldehitlerin de çok kolay bir şekilde primer aminlerle reaksiyon verip, schiff bazlarını oluşturduğu bilinmektedir. Ketonlardan schiff bazları elde etmek için de yüksek sıcaklık, uygun pH aralığı, uzun reaksiyon süresi, katalizör seçimi vb. gibi koşulların iyi ayarlanması gerekmektedir. Aminofosfinik asitlerin eldesi sırasında katalizör olarak asidik katalizör kullanılır. Nitekim aldolize olmayan aldehit ve ketonlar ancak asidik ortamda aminlerle kondenzasyon yapabilirler. Bunun dışında ultraviyole (UV) ışınlarının da aldehitlerden schiff bazı eldesinde katalizör görevi yaptığı bildirilmiştir. Ultraviyole ışığının eser miktardaki aldehiti karboksilli asite yükseltgediği bulunmuştur (Orek ve Koparır 2012). Orek ve Koparır (2012) tez çalışmasında belirtildiği gibi bazı schiff bazlarının, ateş düşürücü, antitümör, antibakteriyel ve antifungal gibi biyolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Schiff bazı oluşumları, bazı biyolojik yararlı bileşiklerin, cefaloporfin, penisilin ya da azotlu bileşiklerin, poliazosikliklerin ve fosfinik asitlerin sentezinde önemlidir ve birinci basamak olarak tanımlanmaktadır. Nitekim schiff bazlarının bir amino ya da karbonil grup substratı ile bir enzimin etkileşimini içeren enzimatik reaksiyonlarda önemli ara ürünler olarak oluştuğu bildirilmiştir. Aynı zamanda schiff bazları triptofan, transaminaz, transketolaz gibi birçok enzimde de gözlenmiştir (Bukhari 2002; Orek ve Koparır 2012).

Aminoalkilfosfinik asitlerin ve bunların sentezlenmesinde birinci basamak olarak sentezlediğimiz schiff bazlarının ilginç fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olması, onların proton transfer denge ve molekül içi hidrojen bağı göstermelerine bağlıdır. Molekül içi hidrojen bağının çok spesifik sistemlerde kullanılmasının en önemli özelliklerinden birisi ise termodinamik kararlılıklarıdır. Hidrojen bağı çeşitleri molekülün stereokimyasına ve imino (N) atomundaki süstitüente bağlı değildir, kullanılan aldehitin türüne bağlıdır. Aromatik halkadaki süstitüentler, konformasyon ve hidrojen bağ enerjisini etkilemektedir.

Çalışmamızda sentezlediğimiz organik fosfinik asitlerin sentezi, Michaelis-Arbuzov reaksiyonu üzerinden, P-H grubunun C=N bağına katılması üzerinden ve hipofosforöz asit ve fosfonöz asitin mannich tipi reaksiyonu üzerinden gerçekleştirilmektedir.

Michaelis-Arbuzov reaksiyonunda, temel olarak bir fosfor(III) esteri ile haloalkilaminin etkileşmesinden bir fosfinik asit analogu oluşur. P-H grubunun C=N bağına katılması reaksiyonunda ise, aminoalkil fosfonik ve fosfinik asit sentezi için genel olarak iminlerdeki C=N bağına bir hidrojenfosfonat veya hidrojenfosfinat esteri katılmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda N-süstitüte α -aminoalkilfosfinik asitler oluşur. Diğer taraftan hipofosforöz asit ve fosfonöz asitin mannich tipi reaksiyonunda ise hipofosforöz asitin formaldehit ve sekonder aminlerle olan reaksiyonu, ortam koşullarına bağlı olarak fosfonöz veya fosfinik asitleri vermektedir (Örek ve Koparı 2012).

P=O fonksiyonel grubu ihtiva eden oksitler yapılarındaki oksijen atomlarının sayısına göre; fosforik asit $[P(O)(OH)_3]$, fosfonik asit $[HP(O)(OH)_2]$ ve fosfinik asit $[H_2P(O)(OH)]$ şeklinde isimlendirilmektedirler. Fosfonik asit, fosfinik asit ve bunların izomerleri fosforöz asit ve fosfinöz asit ile tautomerik dengede bulunabilir. Bu dengeler P=O grubu içeren yapılar lehine olup, okso asitlerde, fosforun, ortaklaşmamış elektron çifti taşımadığı bilinmektedir. Ancak OH grupları yerine OR grupları geçince, fosforöz ve fosfinöz asit iskeletleri kararlı olabilmektedir. Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi aminoalkil fosfinik asit bileşiklerindeki fonksiyonel grupların tanınmasında en çok kullanılan metotlardan birisidir. NMR spektrumları spin-spin eşleşmesi dışında kimyasal kayma verileri de molekülün yapısının teşhisinde önemli faydalar sağlamaktadır. Alınan 1H -NMR spektrumlarında reaktif olarak kullanılan schiff bazlarının ve bunların sentezinden sonra elde edilen fosfinik asit bileşiklerinin karakteristik hidrojen pikleri gösterilebilmektedir. Ayrıca ^{13}C -NMR ve ^{31}P -NMR spektrumları incelendiğinde kiral karbonların farklı yerlerde rezonans oldukları ve simetrik olan fosforların kimyasal kaymaları da gözlenebilmektedir. Bu şekilde NMR ve FT-IR verileri kullanılarak aminoalkil fosfinik asit bileşiklerinin kayma değerleri, saflık dereceleri ve yapıları hakkında aydınlatıcı bilgi edinilebilmektedir (Aydın ve Yılmaz 2007).

2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller orbitallerinde paylaşılmamış elektron taşıyan diğer moleküllerle kolayca birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını eşleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışan, kararsız yapılı oksidan moleküllerdir (Kılınç 1985; Akkuş 1995). Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde

bulunan en önemli serbest radikallerdir ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak da adlandırılmaktadır. ROT' lar aerobik organizmaların, oksijenli solunum elektron taşıma zinciri ve fagositoz (yeme) gibi metabolik yollarında devamlı olarak oluşmaktadır (Lichtenthaler et al. 2003; Albayrak et al. 2010, Uzunhan ve Çelik 2014). Hücre içerisinde oluşan bu radikal moleküller, kararlı hale gelebilmek için hücrelerdeki lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi fonksiyonel moleküllere saldırarak zarar verir ve doku hasarı oluşturabilirler (Çavdar vd 1997; Burçak ve Andican 2004; Thirumalai et al. 2011). 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 (Yokuş 2012). 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 (İşbilir 2008; Yokuş 2012). Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler “oksidan” veya “prooksidan” olarak tanımlanmaktadır (Mecoci et al. 1997). Hidroksil radikali (OH^\bullet), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen ya da süperoksit anyon ($^1\text{O}^{-2}$), peroksil radikal (ROO^\bullet), alkoksil radikal (RO^\bullet) ve peroksinitrit (ONOO^\bullet) önemli reaktif oksijen türleri (ROT)' dir (Aruoma 1998; Schoneich, 1999; Odabaşoğlu vd 2006; Albayrak vd 2010). Bunlardan başka, Hidroperoksit (ROOOH), Hidroperoksil radikali (ROOH^\bullet), Hipoklorik asit (HOCl) gibi oksijen taşıyan önemli serbest radikaller bulunmaktadır. Hücrede elektron taşıma sistemi yolağında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşan O_2^- , hidrojen peroksit'e yıkılır ve bu da geçiş metalleri varlığında daha çok hasar verici radikallere dönüşerek hücrelere zarar vermektedir (Scheibmeir et al. 2005). Moleküler oksijenin, etrafındaki gruplardan $2 e^-$ alması ya da süperoksitin bir elektron alıp 2 H atomuyla birleşmesi sonucu oluşan hidrojen peroksit; serbest radikal değildir, fakat hücresel zarlardan kolaylıkla geçerek zararlı bazı etkiler yaratabilmektedir (Akkuş 1995; Deaton and Marlin 2003; Song 2004). Metal şelatlama, süperoksit radikali süpürme aktivitesi, hidrojen peroksit temizleme aktivitesi, hidroksil radikali temizleme aktivitesi, difenilpicrilhidrazil (Diphenylpicrylhydrazyl; DPPH)

radikali süpürme aktivitesi *in vitro* koşullarda reaktif oksijen türlerinin giderilmesi için antioksidan kapasitelerin ölçülmesinde kullanılan yöntemlerdendir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen kararlı organik azot radikalidir. Görünür alanda (VIS) 517 nm’de maksimum absorbansa sahiptir (Huang et al. 2005; Albayrak et al. 2010; Uzunhan ve Çelik 2014). Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form oluşur (MacDonald-Wicks et al. 2006; Scalzo 2008; Albayrak vd 2010). Peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir (Prior et al. 2005; Huang et al. 2005; Magalhaes et al. 2008; Albayrak vd 2010).

Canlı sistemlerde serbest radikal oluşumunun artması, yüksek doz ve/veya ROT’ un elimine edilmesindeki yetersizlik sonucunda oksidan-antioksidan dengenin dengenin oksidan lehine değişmesi ile oksidatif stres oluşmaktadır. Toksin ya da patojenlere maruz kalmak, zayıf antioksidan savunma sistemi, düzensiz yaşam şekli, aşırı yoğun egzersiz ve günlük metabolik ürünler, oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres bir hastalık olarak düşünülemez, ancak hastalığa yol açabilecek ya da hızlandıracak bir etkidir. Genellikle koruyucu tıp önlemleri için önemli bir uyarandır. Bu durum tespit edilmez ve düzeltilmezse kanser, iskemi, endokrin fonksiyonlardaki yetersizlikler, moleküler hasarlar gibi çeşitli metabolik fonksiyon bozukluklarına, ciddi sağlık sorunlarına ve hastalıklara neden olabilir (Chopra and Wallace 1998). 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. Bu şekilde hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktif hale getirerek savunmaya çalışırlar (Sun and Hu 2005).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijen, aerobik hayatın vazgeçilmez bir yakıtıdır. Normal metabolik reaksiyonlar sırasında, serbest radikallerin hücre içinde ortaya çıkmaları nedeniyle, tüm aerobik organizmalarda, ROT’ un oluşumunu kontrol edecek ve giderecek birçok mekanizma bulunmaktadır. Canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme “Antioksidan Savunma

Sistemi” veya kısaca “Antioksidanlar” denilmektedir. (Josept and Knight 1999; McLean et al. 2005; Odabaşoğlu vd 2006). Vücutta serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif stresden korumak için antioksidan sistem devreye girer. Birincil antioksidan sistem elemanları, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin sentezi ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlardan oluşur. İkincil antioksidan savunma sistemi elemanları, vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincirleme reaksiyonların yayılımını önlemesi oluşturmaktadır. Üçüncü olarak da hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışan lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve tranferazlar gibi onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimlerdir (Fridovich 1975; Nadithea and Baea 2010). Melatonin, glutatyon ve albumin gibi endojen moleküller enzim olmayan antioksidanlar sınıfında yer almaktadırlar. Hücrenin hemen hemen tüm organellerine ve birçok dokuya rahatça girerek geniş bir aktivite gösterebilen melatonin, HO⁻ radikalini temizleyen çok güçlü bir antioksidandır (Halliwell and Gutteridge, 2000; Cnubben et al. 2001). Vitaminler gıda ile alınan ekzojen antioksidanlar olup, E vitamini (α -tokoferol) yağda çözünebilir temel antioksidanlardandır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan α -tokoferol membran lipitlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar. A vitamini (β -karoten)’nin antioksidan etkisi tekil oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı koruması şeklindedir. Suda çözünebilir C vitamini (askorbik asit) ise özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında meydana gelen serbest radikalleri etkisiz hale getirmektedir (Carr et al. 2000).

2.5.1. C Vitamininin Antioksidan Etkisi

Vitamin C, kapalı formül C₆H₈O₆ olan bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidrosilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır (Thomas 1995; Keser 2012). Suda çözünebilir vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil taze sebze, patates, domates, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. C vitamini fazlası idrar ve terle dışarı atılır. Böylece alınan fazla miktar depo edilmez (Tüzün 1997). C vitamininin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir (Kılınç 1985). Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak, hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı

askorbik asit, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir aktifleştiricisi veya bir prooksidan olarak değerlendirilir (Levine 1997).

2.5.2. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen en çok kullanılan antioksidanlardandır. 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 (Hudson 1990).

2.5.3. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu, hücrelerin membranlarındaki çeşitli formlarda yer alan doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile etkileşerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli peroksidasyon ürünlerini oluşturmasıdır. Lipit peroksidasyon sonucu oluşan ürünler doğrudan membran yapısına katılarak bir taraftan hasar oluştururken, diğer taraftan da, reaktif aldehitler üreterek DNA, RNA, enzimler gibi hücre bileşenlerine veya hücrenin tüm bölümlerine zarar vermektedirler (Rikans and Hornbrook 1997; Wang and Quinn 1999). Lipit peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonun indirekt bir işaretidir. Hücresel bozulmanın en önemli belirteçlerinden olan MDA (Malondialdehit); iyon alışverişine etki ederek membranda iyon geçirgenliği ve enzim aktivitelerinde değişimlere sebep olmaktadır. Aşırı lipit peroksidasyonu ile artan MDA konsantrasyonu dokulara hasar vermektedir (Murray et al. 1996; Kalender et al. 2002). MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, 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. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insandaki hem de doğadaki lipit peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır (Köse ve Doğan 1992).

2.5.4. TAS – TOS – OSİ

Organizmada, dokularda veya hücre gibi daha alt düzeydeki organizasyon birimlerinde metabolik ve fizyolojik aktiviteler sonucunda oluşan veya eksojen kaynaklı olarak alınabilen oksidan moleküllerin toplam yükü Total Oksidan Düzeyini (TOS), oluşan veya dışardan alınan oksidan veya prooksidan moleküllere karşı vücudun savunma mekanizmaları olarak ortaya çıkan veya hazır olarak gıdalarla alınan toplam antioksidan moleküllerin varlığı ise Total Antioksidan Düzeyi (TAS) belirlemektedir. Her iki parametrenin birbiriyle oranlanarak, istatistiksel dönüşümler yapılmasıyla birlikte de organizmanın, dokunun ya da araştırılan hücrelerin genel olarak Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) ortaya konulmaktadır (Robbins et al. 1992; Halliwell and Gutteridge 1996; Harma 2005). Hem antioksidan moleküller hem de oksidan moleküller endojen olarak organizmada üretilebildiği gibi, dış çevreden de alınmaktadır (Nobi 2005). Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, transferin ve seruloplazmin, E vitamini, C vitamini ve proteinler gibi antioksidanlarda bulunmaktadır (Dani et al. 2003).

2.5.5. Tiyol Grubu

Kükürt içeren tiyol grupları (-SH grubu), antioksidan sistemin önemli bir üyesidir ve oksidatif strese karşı koruyucu özelliğe sahiptir (Fang et al. 2002; Yardım vd 2003). Tiyol grupları enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla ROT ve diğer serbest radikalleri yok ederek proteinlere bağlı radikal peroksit süpürme etkinliğini arttırmalar (Köse et al. 2010). Plazma tiyolları arasında en çok bulunan sistein aminoasidi olup bunu takip eden homosistein ve glutatyondur.

2.5.6. Paraoksonaz ve Aril Esteraz

Paraoksonaz (PON; E.C.3.1.8.1), hem aril esteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; organofosfat hidrolaz; paraokson hidrolaz) aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. PON'un fizyolojik substratları henüz tanımlanmamış olmakla birlikte, organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlediğinden; toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, plazmada yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) yapısında bulunduğu belirlenmiştir. Günümüzde PON'un kardiyovasküler fizyolojideki

önemi, lipid ve lipoprotein metabolizmasıyla ilişkisi, potansiyel antiaterojenik etkisi ve peroksidatif hasara karşı antioksidan özellikleri, sıklıkla araştırılmaktadır (Başkol ve Köse 2004). Paraoksonaz reaksiyonunda organofosfat bileşiklerinden paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat) substratı, aktivite tayininde kullanılmaktadır (Echerson et al. 1983, Başkol ve Köse 2003). PON1'in hidroliz aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden, PON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir (Gan et al. 1991).

Aril esteraz reaksiyonunda ise; aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, aril esteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, PON1'in gliserofosfolipid peroksitleri, kolesteril ester hidroperoksitleri ve hatta H₂O₂'yi redükleyebileceği bildirilmektedir. PON1, LDL yapısındaki fosfolipidlerin yapısında bulunan ve oksidasyona uğramış poliansatüre yağ asitlerini hidroliz edebilmektedir. Maksimum PON1 aktivitesi için kalsiyum gereklidir (Aviram et al. 1998; Başkol ve Köse 2003). Oksidatif stres altında lipid peroksidasyonu sadece LDL'de değil; HDL'deki lipidlerde de meydana gelmektedir (Hahn and Subbiah 1994; Başkol ve Köse 2003). PON1'in hem LDL'yi hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir (Aviram et al. 1998; Başkol ve Köse 2003). HDL-PON1, uzun zincirli okside fosfolipidleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir (Watson et al. 1995; Başkol ve Köse 2003).

2.6. Hücre Kültürü ve Etkin Madde Araştırmaları

Hücre kültürü, canlılığını kaybetmemiş doku veya organdan alınan bir parçanın belirli bir besi ortamında *in vitro* olarak büyütülmesinin sağlanması işlemidir. Basit olarak çekirdeğe sahip olan her hücre çoğalma kabiliyetine sahiptir. Hücreler çoğalma özellikleri dikkate alınarak üç grupta incelenebilirler. Bunlardan birincisi daima çoğalan hücrelerdir. Bu hücrelere örnek olarak kök hücreler, kemik iliği hücreleri ve gastro-intestinal sisteme ait olan epitel hücreleri verilebilir. İkincisi ise uyarıldığı zaman çoğalan hücreler grubudur. Bunlar; karaciğer, periferik lenfosit ve makrofajlardır. Son grup ise yaşam boyu sadece bir kez çoğalan hücrelerdir. Sinir sistemi ve gözün bazı hücreleri bu grupta yer alır. Bu üç gruptan başka bir de normal olmayan hücreler olarak tümör hücreleri vardır. Bunların doğal olarak apoptoza uğramadıkları, ölümsüz oldukları ve sürekli olarak çoğalmaları bilinen en tipik özellikleridir. Hücre kültürü hazırlamak için alınan küçük doku veya organ parçasına eksplant adı verilmektedir. Hücre kültürleri primer doku

eksplantları veya hücre süspansiyonlarından meydana gelmektedir ve genel olarak monolayer kültür ve süspansiyon kültür olmak üzere ikiye ayrılırlar. Monolayer kültürler; kültür kabına yapışma ihtiyacı bulunan fibroblastlar ve amniyon hücreleri gibi hücrelerden elde edilirler. Süspansiyon kültürler ise kültür kabına yapışmayan kan, kemik iliği gibi hücrelerden hazırlanırlar (Ovalı ve Uçar 2003). Eksplantın doku veya organdan alınarak ekiminin yapıldığı ilk kültüre primer kültür, burada meydana gelen yeni hücrelerin başka besi yerine aktarılması oluşan kültüre pasaj veya subkültür adı verilmektedir. Primer hücre kültürlerinin belirli ömürleri vardır. Süregen adını alan hücre serileri anormal ve ölümsüz hücre tipidir (Alberts et al. 2002). Hücreler çoğalmak için içerisinde karbondioksit oranı % 5 ile % 15 arasında değişen ortama ihtiyaç duyarlar. Bunun nedeni olarak karbondioksit içeriğinin sodyum bikarbonat (NaHCO_3)/karbonik asit (H_2CO_3) dengesini sağlaması gösterilebilir. Çoğalması için inkübatöre konan hücre kültür kaplarının ağzları açık bırakılmamalı ya da çok sıkılmamalıdır. Inkübatör içerisinde nemi ortamda bulunan su ile sağlanmaktadır. Genellikle 37 °C tercih edilmektedir. Hücre kültüründe tercih edilen ve ticari olarak temin edilen besiyerleri, hücrelerin canlı vücudu dışındaki bir ortamda yaşamlarını devam ettirmeleri ve çoğaltılması işlemlerini gerçekleştirmek için gerekli olan besin maddelerini ve vitaminleri içeren, hücrelerin gelişimlerini sağlayacağı uygun ozmolariteye ve pH'ya sahip olan özel solüsyonlardır. Genellikle hücre kültürünün vazgeçilmezi olarak kullanılan temel aminoasit karışımı olarak hücre kültürlerinde Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyeri tercih edilmektedir. İlk kez 1955 yılında Eagler adında bir araştırmacı bulmuş olup daha sonra Dulbecco tarafından modifiye edilerek günümüze kadar gelmiştir. Hücreler için gereken glukoza, uygun ozmolariteye, aminoasitlere ve vitamine sahiptir. Ayrıca Fetal Bovine Serum solüsyonu da içeriği tam olarak tanımlanamayan zengin bir protein çözeltilisidir. Hücrelerin çoğalması ve ortama yapışmasını sağlar. İçerisinde hormonlar, enzimler ve büyüme faktörleri vardır. Hücre kültüründe genellikle %10 oranında tercih edilir. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) solüsyonu intrasellüler ve ekstrasellüler ozmolariteyi sağlayan bir tuz solüsyonudur. İçerisinde su ve inorganik tuzlar bulunmaktadır. Tripsin, hücre pasajlamada tercih edilen enzim grubudur. Tripsin serin proteaz tipi enzim olup lizin ve arjinin aminoasitlerinin peptidlerini yıkar. Hücrelerin beslenebilmesi için serum L-glutamin ve antibiyotik içeren besi ortamının hazırlanması gerekmektedir. Ortama sıklıkla eklenen antibiyotikler ise penisilin ve streptomisindir.

Gelişen teknolojiyle birlikte yeni nesil tıbbi uğraşlar ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Hücre kültürleri dünyada uygulanan yeni nesil tedavi niteliği taşıyan önemli tıbbi yöntemlerden biridir. Nitekim dünyada kesin tedavisi olmayan kanser hastalıklarında, hücre kültürleri yapılarak patolojiyi açıklamaya çalışan çeşitli analiz yöntemleriyle önemli sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca canlılarda oluşan hastalıkların nedenlerini bulmak amaçlı yapılan hücre kültürleri sayesinde, hastalıkların işlevleri hakkında bilgiler elde edilmektedir. Günümüzde hücre kültürleri tek boyutlu, iki boyutlu (2D) ve 3 boyutlu (3D) kültürler olarak hazırlanabilmekte ve bu şekilde bir araya getirilen hücrelerden doku ve organ üretimini hedefleyen çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli hastalıkların ve hastalık etkenlerinin detaylı olarak incelenmesi dışında, hücre kültürleri virüslere uygun aşılarda geliştirilmesi, doku, gen tedavilerinin geliştirilmesi ve kişiye yönelik tedavi yöntemlerinin, kişiye yönelik ilaç doz uygulamalarının ayrıntılı olarak gözlenmesi bakımından da çok önemlidir. Sağladığı bütün bu avantajlarıyla hücre kültürleri sağlık bilimlerinde oldukça olumlu etkiler meydana getirerek günümüz tıbbının daha da gelişmesini sağlamak ve gelecekte pek çok hastalığın tedavisinde faydalı olacağına inanılmaktadır.

2.6.1. Apoptotik Etkinlik

Hücre kültürü çalışmalarında ilaç etken maddelerinin araştırılması konusunda ya da etken maddelerin antioksidan, antitümöral özelliklerinin değerlendirilmesi konusunda en çok başvurulan analizlerden birisi de apoptotik etkinliğin belirlenmesidir. Apoptoz hücrelerin buldukları dokuya zarar vermeden kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Gelişme sürecinde nasıl mitoz bölünme organizmanın normal büyümesi-gelişimi için gerekli ise apoptozda, organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücreleri uzaklaştırmak için gerekli bir mekanizmadır (Yuan et al. 1993). Apoptozun başladığı hücreler bulunduğu ortamdan uzaklaşmakta, komşu hücrelerle bağlantısını koparmakta ve büzüşmekte, kromatin yoğunlaşarak piknotik bir görünüm almaktadır (Janicke 2012). Apoptoz sırasında hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korumakta ancak hücre zarının iç kısmında lokalize olmuş fosfolipidlerin serin moleküllü apoptotik uyarılar sonrasında hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Çekirdek küçülüp, parçalara ayrılmaktadır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik

cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, bu sayede hücrenin ölümü inflamasyona sebep olmamaktadır (Kerr et al. 1972). Kaspazlar apoptozda görev alan önemli proteinlerdendir. Sistein proteaz olan kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Normal durumlarda hücrede inaktif halde bulunurlar, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10: başlatıcı kaspazlar, kaspaz 3, 6 ve 7: efektör kaspazlar, kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 ise inflamatuvar kaspazlar olmak üzere 3 kaspaz sınıfı bulunmaktadır. Bunlar aynı zamanda DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olmaktadır (Li and Yuan 2008). Kaspazlardaki bozukluklar otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna sebebiyet vermektedir (Reed 2000).

2.7. Kanser

Moleküler hücre biyolojisine göre kanser normal olmayan hücre çoğalmasına verilen isimdir ve bir genlerin olağandışı ifadenmesi hastalığıdır (Kandebu 1999). Canlıların genotipi, organizmanın büyümesini, fonksiyonlarını ve davranışlarını nasıl yapacağını anlatan milyonlarca mesajı içerir. Genotip içerisindeki en küçük anlamlı birimler olan genler düzgün çalışır ve fenotipin ortaya çıkmasını sağlar. Kromozomların kendilerini çoğaltması hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hücre bölünmesi sırasındaki oluşan hataların büyük bir kısmı dış kaynaklı faktörlerin neden olduğu hatalardır ve hücrelerde DNA onarım mekanizmaları bulunsada bazen tamir gerçekleşmez ve bir ya da daha fazla gen mutasyona uğrar. Sonuçta hücredeki genetik ve fizyolojik süreçlerde meydana gelen değişimlerden dolayı kanser ortaya çıkar. Değişen gen hatalı ya da farklı mesaj gönderir ve o hücre hızla büyür ve tekrar bölünür. Bu durum kanserleşme olarak adlandırılır. Diğer taraftan kanserlerde organizmadaki hücrelerin glikokalikslerindeki yüzey antijenleri farklılaşır ve hücrelerin birbirlerini tanımaması nedeniyle, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde hücre artması meydana gelmektedir. Normal olarak hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde gerçekleşir. Bunun sonucunda vücuttaki doku ve organlar görevlerini eksiksiz ve doğru bir şekilde yerine getirir. Ancak bu hücrelerin anormal hızla büyümesi hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olacağından vücutta tümör olarak adlandırılan kitle oluşumlarına yol açacaktır. Küçük bir tümörün oluşması için sayıları yüz binleri

bulan kanserli hücrelerin bir araya gelmesi gerektiğinden, erken aşamalarda tespit edilmesi oldukça zor olan bir hastalıktır. Sağlıklı bir hücrenin kanserli hücreye dönüşme işleminden önce sahip olduğu genetik bilgisinde birçok önemli değişikliğin olması gerekmektedir. Meydana gelecek her genetik değişiklik hücreyi biraz daha kanserli hücre olma yolunda ilerletecektir. Bütün hücreler farklı genetik özelliklere sahip olduklarından her hücrenin kanserleşme süreleri de birbirlerinden farklı olacaktır.

2.7.1. Kanser Hücrelerinin Özgün Nitelikleri

1. Kanserler genellikle tek bir normal hücrenin farklılaşması sonucunda meydana gelirler. Buna klonsal orijinlenme denmektedir.

2. Normal hücrelerin en belirgin yanı, belirli dönem ya da belirli bir yaşa kadar olan sınırlı sayıda bölünme yetenekleridir. Kanser hücreleri ise sınırsız ve aşırı derecede hızlı bölünme özellikleriyle göze çarpmaktadır. Buna immortalite özelliği denilmektedir. İmmortalitenin en önemli unsuru kromozomum uç yapılarını oluşturan telomer adını alan yapılardır. Hücreler çoğalırken, normal hücrelerde telomerler kısalır ancak kanser özelliğine ulaşmış hücrelerde telomer yapısı yenilenebilir niteliktedir. Yapılan çalışmalarda bunu da telomeraz adlı enzimin yaptığı bulunmuştur. Böyle bir durumda da telomerlerin boyu normal hücredeki gibi kısalmayarak sabit kalmaktadır.

3. DNA tamirindeki sorunlardan kaynaklı olarak, kanser hücrelerinin homojen bir yapı taşımamaktadır. Bu olaya kanser hücrelerinde genetik instabilite adı verilir.

4. Bir dokuyu oluşturan hücreler arasında belirli noktalardan azalan belirli yerlerde genişleyen bir hücreler arası boşluk bulunmaktadır. Hücre zarları birbirine belirli mesafede durmaktadır. Bu durum hücre yüzey antijenlerini oluşturan ve çoğunlukla karbohidrat moleküllerden oluşan glikokaliks yapılardan kaynaklanmaktadır. Komşu iki hücrenin glikokaliksleri birbirine temas ettiği zaman hücrelerin ilerlemesi ve birbirine karşı hareketlilikleri tamamlanmış olur. Bu olaya kontakt inhibisyon denir ve kanser hücrelerinde kontakt inhibisyon ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybolduğu görülmektedir.

5. Kanser hücrelerinde proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı görülmektedir. Bu durum kültür ortamında büyümeye bırakılan kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri besin yetersizliğinde bile büyümeye çalışma özelliklerinden dolayı bir bakıma kendi sonlarını hazırlamaktadırlar.

6. Normal hücrelerde karşılaşılmayan bir durum olarak kanser hücrelerinde metastaz olgusu bulunmaktadır. Metastaz, hücre içi matrikse yapışmaktan sorumlu olan proteinlerin kaybı sonucu veya hücreler arasında gerçekleşen bozukluklar sonucunda oluşur (Lowitz and Cassiato 2000).

2.7.2. Kanser Tedavisi ve Etkili İlaç Modelleri

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 kanser tipi olup, tüm kanserlerin %18' ini oluşturmaktadır. 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 (Love and Lin 2000; Patron et al. 2001; Yu et al. 2005; Sun and Liu 2005). Kolorektal kanserler de, hem erkeklerde hem de kadınlarda üst sıralarda bulunmaktadır. Genel olarak ülkemizde en yaygın görülen kanserlerin erken teşhisle önlenebilir nitelikteki kanserler olduğunu ortaya koymaktadır (Parlak ve Çelik 2015). Kanser tedavilerinde cerrahi, radyoterapi (ışın) ve kemoterapi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Kemoterapi, genellikle çok sayıda ilaçla gerçekleştirilen, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla uygulanan tedavidir. Hastalığın ilerlediği vakalarda kemoterapi ve radyoterapi ya da farklı kemoterapötik ajanlar kombine kullanılmaktadır. İdeal ilacın normal hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerini öldürmesi beklenir, ancak bu özellik 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 da hasar verir. Nitekim her bir yöntemin büyük ve farklı yan etkileri bulunmaktadır. Yan etkiler temel olarak tedavinin tip ve kapsamına bağlıdır ve herkeste aynı şekilde seyretmez, hatta aynı kişide bir seanstan diğerine değişebilir. Kemoterapi yapılan kişilerin çoğunun saçları dökülürken, diğer yan etkiler ilaç tipine göre değişiklik gösterir. Bu sebeple tedavide kullanılan

kemoterapötik ajanlardan daha düşük yan etkilere sahip yeni kemoterapötiklerin araştırmaları kanser çalışmalarının birincil konusudur (Poggi et al. 2001).

Antimetabolit kanser ilaçlar, toplu halde hücrelerin ölmesini sağlayan önemli kimyasallardır. Bu sınıftaki maddelerden en çok bilinen ve sık şekilde günümüzde kullanılan metil grubunun transferini gerçekleştiren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörü olarak görev yapan metotreksattır. Bunun dışında taksol, vinkristin gibitubulin iskeletinin kurulmasını engelleyen **mitotik inhibitör** madde niteliğindeki antikanser ilaçlar kullanılmaktadır. Hücreler mitoz safhasına ortamda bulunan DNA miktarını iki katına çıkardıktan sonra girmektedirler. Burada tubulin proteinin görevi kromozomları belirli bir düzene koyarak onları sınıflandırma işlemine tabii tutmaktır. Ayrıca doksorubisin gibi **topoizomeraz inhibitörleri** olarak DNA'nın çözülmesini engelleyen kanser ilaçları da tedavide kullanılmaktadır. Topoizomeraz inhibitörleri DNA'nın sahip olduğu çift zincirli yapının replikasyon sırasında açılmasında görevli topoizomeraz enzimleri üzerinde inhibitör etki yaparak kansere dönüşmüş ya da kansere dönüşmek üzere olan hücre gruplarını öldürmektedir (Kerry et al. 1986). Fizyolojik süreçte hücrelerin doğal bir ölüm şekli olan, programlı hücre ölümü olarak da bilinen **apoptozu uyaran anti-kanser ajanların** kullanılması, yeni kemoterapötik ilaç geliştirilmesi çalışmalarında etkili bir yöntemdir. Bu sayede kanserli hücreler ölürken buldukları dokuya zarar vermemekte, ilacın yan etkileri azalmaktadır (Ellis et al. 1997; şen 2015).

2.7.3. Topoizomeraz Enzim Aktivitesi ve Kanser

Anti-kanser ajan ve antibiyotik olarak da kullanılabilen topoizomeraz inhibitörleri, kanserle mücadelede geniş bir yer edinmektedir. Hücre bölünmesi esnasında DNA sarmalının düz iplikçikler halinde açılmasını sağlayan topoizomerazların inhibisyonu, bölünmeyi durdurarak hücrenin çoğalmasını engellemektedir (Potmesil and Pinedo 1995). Topoizomerazlar tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, yüksek derecedekorunan bir enzim ailesidir. İnsan genomu 7 adet topoizomeraz geni taşımaktadır. Bu genler nükleer topoizomeraz I, mitokondriyel topoizomeraz I, topoizomeraz II α ve II β , topoizomeraz III α ve III β ve üreme hücreleriyle sınırlı Spo11'i kodlamaktadır. Topoizomerazlar DNA'nın tek ya da çift iplikçiği üzerindeki kesme ve bağlama işlemlerine göre iki ana gruba ayrılmaktadır (Hande 2008). Birinci grup topoizomeraz I,

mitokondriyel topoizomeraz I ve topoizomeraz III α/β yer alırken, ikinci grup topoizomeraz II α/β ve Spo11'dan oluşmaktadır. Mitokondriyel topoizomeraz I, DNA'nın 3' ucu ile kovalent bağ kurarken, diğer tüm topoizomerazlar tirozin aminoasidi aracılığı ile DNA'nın 5' ucunda 5'-fosfotirozil kovalent bağını kurmaktadır. Topoizomeraz II, DNA çift iplikçığının ikisini de kopararak disülfit bağıyla tamir için köprüler kurmaktadır. Bu sayede ATP harcayarak replikasyon ve transkripsiyon esnasında oluşan DNA bükülmelerini düzeltmektedir (Elsea et al. 1997). ATP'ye ihtiyaç duymadan süpersarmal DNA'yı gevşemiş forma çeviren topoizomeraz I ise başlangıçta omega proteini olarak adlandırılmıştır. İnsan topoizomerazı I geni 20. kromozom üzerinde, 20q11.2–13.1 lokusunda yer almaktadır ve 100 kDa'lık bir protein sentezlemektedir (Burt et al. 1991). Protein, ATP'ye ihtiyaç duymadan DNA'nın tek iplikçığı üzerinde endonükleaz aktivitesi göstermektedir. Topoizomeraz I'in hücre canlılığı için en önemli görevlerinden biri DNA tamiri esnasında süper sarmalı gevşetmesidir. Ökaryot DNA'sının kromatin şeklinde dağınık olarak bükülmesi, bazı durumlarda süper sarmal yapının açılmasını gerektirmektedir. Topoizomeraz I'in katalitik kısmında yer alan tirozil kalıntısı kovalent bağ ile DNA'nın 3' ucuna bağ kurarak kırılmaktadır. Enzim aktivasyonun geri dönüşümlü olması inhibitörlerin etkili olabilmelerini sağlamaktadır. DNA'nın kesilerek serbestleştirilmesinin ardından topoizomeraz I iplikçığın geri bağlanmasını sağlamaktadır. Geri bağlanma hızı iplikçığın koparılma hızından çok daha hızlıdır (Tao et al. 2003). Topoizomerazların ekspresyonu doğrudan tümörler ile bağlantılı olmamasına rağmen, topoizomeraz gen ifadenmesi kanserli dokularda normal dokulara göre daha yüksektir. Aynı zamanda yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde topoizomeraz I ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Korwek et al. 2012). En iyi bilinen topoizomeraz I inhibitörü olan kamptotesin, DNA tek iplikçığını 3' ucundan koparmasından sonra geri bağlama aşamasında topoizomeraz I enzimini inhibe etmektedir (Hsiang et al. 1985; Şen 2015). Kamptotesinin topoizomeraz I ile oluşturduğu kompleks, DNA'nın transkripsiyonu yapılacak olan iplikçığı üzerinde olduğu zaman RNA polimerazın aktivasyonu sebebiyle DNA üzerinde geri dönüşümsüz kırıklar oluşmaktadır. Kamptotesin-topoizomeraz I kompleksi transkripsiyon esnasında transkripsiyonda kullanılmayacak olan DNA iplikçığı üzerinde yer alıyorsa RNA polimeraz ile etkileşime girmemektedir. Topoizomerazın inhibisyonu ile dolaylı yoldan oluşan DNA kırıkları transkripsiyonun durmasına sebep olmaktadır (Wu and Liu 1997; Şen 2015).

Sonuç olarak günümüzde kanserin herhangi bir şeklini tamamen tedavi edecek kimyasal bir bileşik henüz bulunamamıştır (Palaska 2004). Kanser tedavisinde amaç, hem seçici toksisitesi artırılarak çok daha etkili bir tedaviye olanak veren hem de tedavi süreci ve sonrası ortaya çıkan birçok istenmeyen yan etkisi azaltılmış yeni bileşiklerin geliştirilmesidir. Bu nedenle, yeni ilaç etken maddelerinin araştırılması, kanserlerin tedavisinde potansiyel kanser ilaçlarının oluşumuna yeni yaklaşımlar sağlayacaktır. Son yıllarda potansiyel antibakteriyal, antitümöral ve antivirütik materyaller olarak geliştirilmek üzere, aminofosfinik asitler sıklıkla araştırılmakta ve yeni sentezler üretilmektedir. Aminofosfinik asit ligantları ve onların komplekslerinin aminoasitlere benzerlikleri ile birlikte kendilerine özgü orijinal yapıları ve niteliklerinden dolayı hücresel yolaklarda ve pek çok fizyolojik süreçte oldukça etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Bu yüzden tez çalışmamız kapsamında, yeni sentezlenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin, reaktif oksijen türlerine ve meme kanserine karşı potansiyel antioksidan ve antitümör aktivitelerinin, ayrıca topoizomerez ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, ilaç olma potansiyellerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu tez kapsamında düzenli bir organik kimya laboratuvarında, hücre kültür laboratuvarı ve moleküler biyoloji laboratuvarında olması gereken cihazlar ve donanımlardan yararlanılmıştır.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Cam malzeme olarak; çeşitli ebatlarda balonlar, soğutucular, damlatma hunileri, ayırma hunileri, huniler, erlenmayerler, beherler, büretler ve kılcal borular,
- Tartım için; Hassas Terazı (Precisa XB 3200 C)
- UV-Vis Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrofotometre
- Bruker 400 MHz NMR spektrometre (^1H , ^{13}C , ^{31}P)
- pH metre (Hanna HI 221)
- Vorteks (IKA MS3 basic)
- Saf Su Cihazı (GFL D-30938 Burgvedel)
- Ultra Saf Su Cihazı (New Human Power 1)
- Manyetik ve mekanik karıştırıcılar,
- Soğutucu olarak; tuz-buz banyoları, Kriyostat
- Termostat
- 100 ve 360 °C'lik termometreler
- Desikatör
- Etüv (Memmert)
- Homojenizatör (IKA, T10 basic)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger D-79112 Freiburg)
- Çalkalamalı Su Banyosu (Memmert)
- Isıtma için; su banyoları, ısıtıcı mantolar, termostat, yağ banyosu, manyetik ısıtıcı ve karıştırıcılar

- CO₂ inkübatör (Nuair)
- Laminar-flow kabin (Biohazard)
- Buzdolapları (Bosch)
- Santrifüj (MSE Mistral 1000)
- Otomatik pipetler
- Derin dondurucular
- Vida kapaklı deney tüpleri
- Elisa-reader (Thermo Scientific–Multiskan FC ve Biotec, USA) kullanılmıştır.

3.2. Hücre Hatları

Deneylerimizde Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7) ve sağlıklı normal insan endotelial hücre hattı (HUVECs) kullanıldı. Bu hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) firmasından temin edildi. Hücre kültürü ve diğer deneysel çalışmalar için “Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” izni alınarak (Karar no: 2015.01/10) deneylere başlandı.

3.3. Reaktifler

3.3.1. Sentez ve Antikanser Aktivitelerin Saptanmasında Kullanılan Reaktifler

Deneylerde kullanılmak üzere DMEM-Low-Glucose (Sigma–Aldrich), FBS (Sigma–Aldrich), Tripsin (Applichem), L-Glutamin Streptomisin (Sigma–Aldrich), RPMI 1640 (Sigma–Aldrich) XTT Solüsyonu (Applichem A-1080), asetonitril (Me-CN), Mutlak Etil alkol (Sigma), Tris-Borik Asit-EDTA (TBE, 10x), Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE, 5x), o-salisilaldehit, p-metoksibenzaldehit, tiyofen-2-karbaldehit, etan-1,2-diamin, propan-1,3-diamin, 2,2-dimetilpropan-1,3-diamin, aseton, dioksan, metanol, kloroform ve NMR spektrumları için DMSO-d₆, CDCl₃, NaOD, D₂O, Potasyum klorür (KCl), Sodyum hidroksit (NaOH), fosforik asit (H₃PO₄), sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat (NaH₂PO₄), etil alkol (C₂H₅OH), tiyobarbitürik asit (TBA) temin edildi.

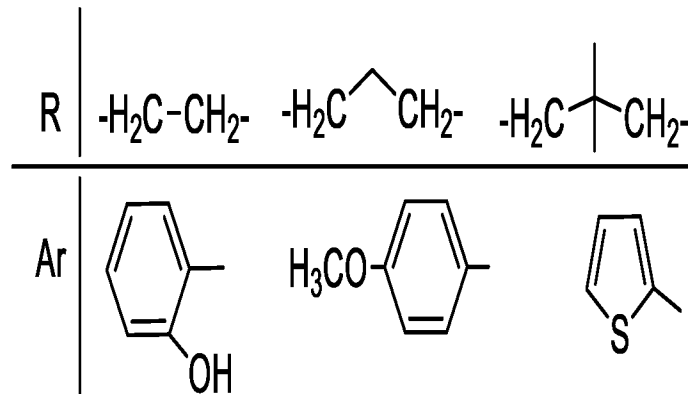
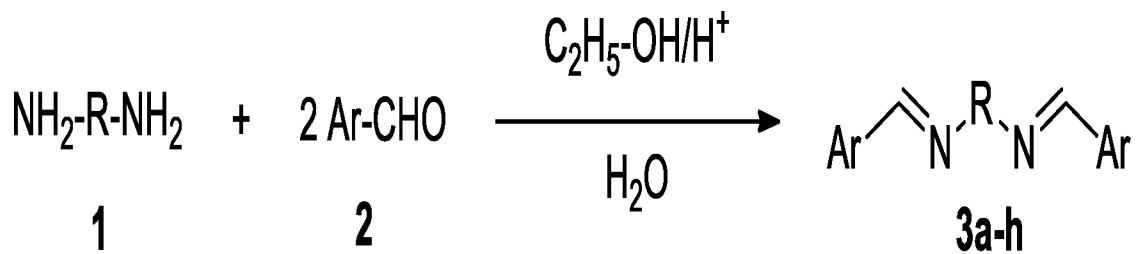
3.3.2. *In vitro* Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. 0.2 M Fosfat Tamponu (pH=6.6): 6,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözüldü. pH metre kullanılarak NaOH çözeltisiyle pH=6.6'ya ayarlandı. Son hacim olarak 250 mL'ye tamamlandı.
2. % 1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi: 2,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ alınarak, 250 mL'ye tamamlandı.
3. % 10'luk TCA çözeltisi: 25 g TCA alınarak, son hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
4. % 0.1'lik FeCl_3 çözeltisi: 83 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alınarak, son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
5. 60 μM PMS çözeltisi: Önce 18 mg PMS alındı ve toplam hacim 1 litreye fosfat tamponuyla (pH=7.4, 0.1 M) tamamlandı. Daha sonra bu çözeltden 10 mL alındı ve 100 mL'ye aynı tamponla seyreltildi.
6. 468 μM NADH çözeltisi: 34 mg NADH alınarak, son hacim 100 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0.1 M, pH=7.4) tamamlandı.
7. 150 μM NBT çözeltisi: 6.1 mg NBT alınarak, son 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 μl alındı ve 0.1 M'lik 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 son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
11. 5 mM Ferrozin çözeltisi: 0,123 g Ferrozin alındı, bir miktar suda çözüldü ve toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.
12. 20 mM, 50mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,278 gr alınarak, son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
13. 10 mM, 50mL EDTA Çözeltisi: 0,011 gr alınarak, son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
14. 1 M, 50 mL H_2O_2 çözeltisi: 5,107 mL stok H_2O_2 çözeltisi alınıp 50 ml'ye tamamlandı.
15. 500 mM, 5mL Askorbik Asit çözeltisi: 0,495 gr stok askorbik asit alınarak, son hacim 5 mL'ye tamamlandı.
16. 50 mM, 50 mL KH_2PO_4 çözeltisi: 0,345 gr stok madde alınarak, son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.4. Araştırmada Kullanılan bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) Bileşikleri

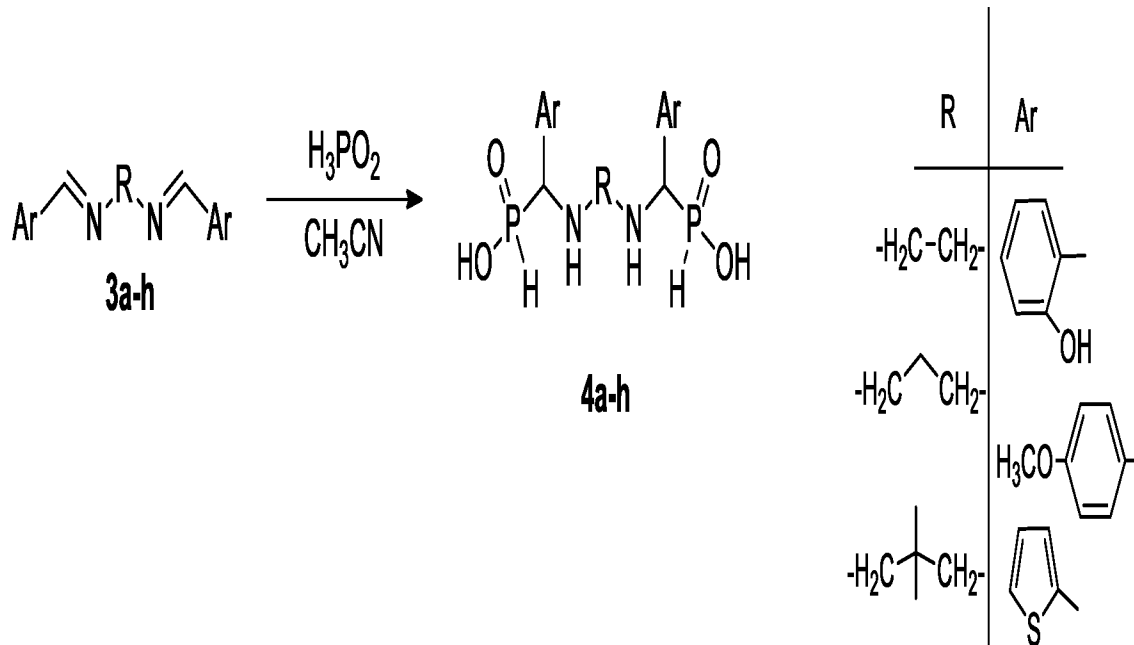
Literatüre uygun yöntemler kullanılarak 16 bileşiğin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup hedeflenen 8 bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) molekülün anti oksidan ve anti kanser özellikleri araştırılmıştır (Örek 2012; Sarac et al. 2016; Daştan et al. 2016). Sentezlenen ve çeşitli aktiviteleri bakımından araştırılan bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin yapısı aşağıda ayrıntılı olarak Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

3.4.1. Hedeflenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) Bileşiklerinin Sentezinde Yararlanılan Schiff Bazlarının (3a-h) Genel Sentez Yöntemi



0,2 mol aldehit bileşiği reaksiyon balonuna alınarak 3-4 damla H₂SO₄ beraberinde 50 mL mutlak etil alkol içerisinde çözüldü. Ortama etanolde çözülmüş 0.1 mol diamin bileşiği reaksiyon ortamına damıtılarak 4 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Oluşan ürün buz banyosunda soğutulup süzülde, soğuk su ile yıkandıktan sonra kurutuldu ve ürünler alkol-su karışımında kristallendirildi.

3.4.2. Hedeflenen bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) Türevlerinin (4a-h) Genel Sentez Yöntemi

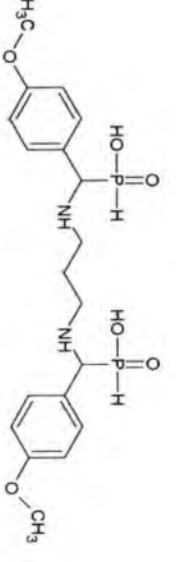
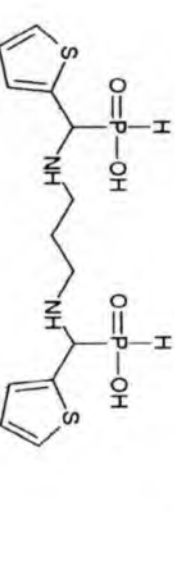
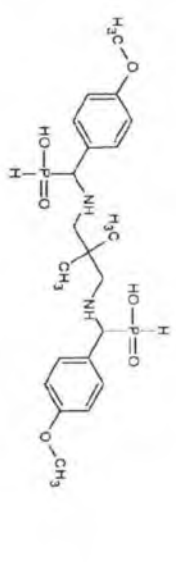
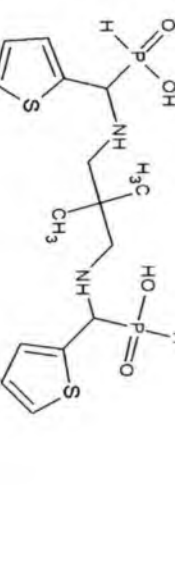


50 mmol **3a-h** schiff bazı reaksiyon balonuna alınarak 50 mL asetonitril içerisinde çözüldü. Ortama asetonitril içerisinde çözülmüş 100 mmol hipofosforöz asit çözeltisi damla damla reaksiyon ortamına ilave edilerek 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Oluşan ürün buz banyosunda soğutulup süzüldü, alkol ve eter ile yıkandıktan sonra kurutuldu ve etanolde kristallendirildi.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan bis(α -aminoalkil)-fosfinik asit) türevlerinin (4a-4d) genel özellikleri

Bileşğin kodu	Bileşğin formülü	Kapalı formül	Bileşik ismi	Mp (°C)	Yield (%)	Moleküler ağırlık (g/mol)
4a		$C_{16}H_{22}N_2O_6P_2$	<i>Ethane-1,2-diyibis(fimino[(2-hydroxyphenyl)methanediyl])bis phosphinic acid</i>	250-252 °C	60	400,30320
4b		$C_{18}H_{26}N_2O_6P_2$	<i>Ethane-1,2-diyibis(fimino[(4-methoxyphenyl)methanediyl])bis phosphinic acid</i>	200-203 °C	55	428,35636
4c		$C_{12}H_{18}N_2O_4P_2S_2$	<i>Ethane-1,2-diyibis(fimino(thiophen-2-ylmethanediyl))bis phosphinic acid</i>	220-222 °C	43	380,35984
4d		$C_{17}H_{24}N_2O_6P_2$	<i>Propame-1,3-diyibis(fimino[(2-hydroxyphenyl)methanediyl])bis phosphinic acid</i>	217-218 °C	47	414,32978

Tablo 3.1.(devam): Çalışmada kullanılan bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin (4e-4h) genel özellikleri

Bileşimin kodu	Bileşimin formülü	Kapalı formül	Bileşik ismi	Mp (°C)	Yield (%)	Moleküler ağırlık (g/mol)
4e		$C_{19}H_{28}N_2O_6P_2$	<i>Propane-1,3-diybisfiminol[4-methoxyphenyl]methanediyol]]bis phosphinic acid</i>	256-258 °C	45	442,38294
4f		$C_{13}H_{20}N_2O_6P_2S_2$	<i>Propane-1,3-diybisfiminol[thiophen-2-ylmethanediyol]]bis phosphinic acid</i>	243-245 °C	45	394,38642
4g		$C_{21}H_{32}N_2O_6P_2$	<i>2,2-dimethylpropane-1,3-diybisfiminol[4-methoxyphenyl]methanediyol]]bis phosphinic acid</i>	244-246 °C	55	470,43610
4h		$C_{15}H_{24}N_2O_6P_2S_2$	<i>2,2-dimethylpropane-1,3-diybisfiminol[2-thiophenyl]methanediyol]]bis phosphinic acid</i>	218-219 °C	49	422,43958

3.5. *In Vitro* Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.5.1. Metal Şelatlama Aktivitesi

Test bileşiklerinin (**4a-h**) metal şelatlama aktiviteleri, Dinis ve ark. (1994)'nın belirledikleri yönteme (Dinis et al. 1994; Parlak 2015) göre yapıldı. Bu işlem için 0.1 M NaOH eklenerek, etil alkol içinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) örneklerden 0.4 mL alınarak 2 mM'lık ve 0,05 mL FeCl₂ çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon 0,2 mL ve 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı. Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm' de absorbansı ferrozin hariç geriye kalan çözeltiden oluşan kontrol çözeltisine (köre) karşı kaydedildi. Metal şelatlama aktivitelerini karşılaştırmak için aynı konsantrasyonda standart antioksidan olarak kabul edilen α-tokoferol ve BHT kullanıldı.

Her bir ölçüm 3 tekrarlı olarak yapılarak ortalamaları hesaplandı. *IC*₅₀ değerleri (bileşiğin % 50 inhibitör konsantrasyonu), bileşiklerin konsantrasyonuna karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek oluşturulan grafiklere göre belirlendi. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek metal şelatlama aktivitesi olarak değerlendirilmektedir. 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

3.5.2. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

Test bileşiklerinin (**4a-h**) hidrojen peroksit giderme aktiviteleri Ruch ve ark. (1989)'nın belirledikleri yönteme (Ruch et al. 1989; Parlak 2015) göre yapıldı. Bunun için pH = 7.4 olan 0.1 M fosfat tamponunda 43 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 0.1 M NaOH eklenerek, etil alkol içinde hazırlanmış farklı konsantrasyondaki (50-500 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 numuneye 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 tekrarlı yapılarak ortalamaları hesaplandı. IC_{50} değerleri (bileşiğin % 50 inhibitör konsantrasyonu), bileşiklerin konsantrasyonuna karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek oluşturulan grafiklere göre belirlendi. Bu metotta, düşük absorbans değeri yüksek H_2O_2 giderme aktivitesi olarak değerlendirilmektedir. Yüzde H_2O_2 Giderme Aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır:

$$\% H_2O_2 \text{ Giderme Aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 = Kontrol Absorbansı

A_1 = Numunelerin ve/veya standartların absorbansı

3.5.3. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

Test bileşiklerinin (**4a-h**) süperoksit radikali giderme aktivitesi, Liu ve ark. (1997)'nin yapmış olduğu yöntem (Liu et al. 1997; Parlak 2015) göre bazı optimizasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Titrasyon yöntemiyle 0.1 M NaOH eklenerek etanol çözeltisi içinde hazırlanmış test bileşiklerinin 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ olmak üzere farklı derişimdeki çözeltileri, 1 mL nitroblue tetrazolium (600 μM NBT, 100 mM fosfat tamponunda, pH 7.4) ve 1 mL NADH (468 μM , 100 mM fosfat tamponunda, pH 7,4) reaktifleri ile karıştırıldı. Başlangıç reaksiyonu, bu karışıma 100 μL fenazin meta sülfat (PMS) (100 mM fosfat tamponu içinde 60 μM PMS, pH 7,4) eklenmesiyle oluşturuldu. Ortaya çıkan reaksiyon karışımı 25 $^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dk bekletildi. Absorbanslar 560 nm'de okundu. Ölçümler 3 tekrarlı yapılarak ortalamaları hesaplandı. Süperoksit radikali giderme aktivitesini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olarak, aynı konsantrasyonlardaki α -tokoferol, askorbik asit ve BHT kullanıldı. IC_{50} değerleri yukarıdaki diğer yöntemlerde olduğu gibi hesaplandı. Azalan absorbansın, artan süperoksit radikali giderme aktivitesini gösterdiği kabul edildi. Yüzde süperoksit radikali Giderme Aktivitesi için şu formül kullanıldı:

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

A_0 = Kontrol Absorbansı

A_1 = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

3.5.4. Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

Bu yöntemde enzimatik olmayan, 2-deoxy-D-riboz'un oksidatif degradasyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı. Test bileşiklerin hidroksil radikali (OH•) yok etme aktiviteleri (Halliwell et al. 1987) metoduna göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi. Reaksiyon, 0.1 M NaOH eklenerek etil alkol içerisinde hazırlanmış 50-500 µg/mL arasındaki farklı konsantrasyondaki test bileşiklerinden 50 µl alınıp, 150 µl deoksiriboz (200 mM), 60 µL FeSO₄.7.H₂O (20 mM), 30 µL EDTA (10 mM), 150 µl (1 M) H₂O₂ ve 60 µl (500 mM) askorbik asit çözeltilerinin karıştırılıp vortekslenmesiyle başlatıldı. Karışıma 2.5 mL KH₂PO₄ tamponu (pH: 7,4) eklenerek son hacim 3 mL'ye tamamlanıp yeniden vorteksle iyice karıştırıldı. 37 °C' deki etüvde 1 saat bekletilen tüplerin üzerine 1 mL % 10 Trikloro asetik asit (TCA) ve 1 mL % 2 Tiyobarbitürik asit (TBA) eklenerek vortekslendi. Sıcak su banyosunda 100 °C' de 30 dk bekletildi ve reaksiyon karışımı daha sonra 5 dk buz içerisinde dinlendirildi. Daha sonra oda ısısına gelen örneklerin tampona karşı 532 nm dalga boyunda absorbanları kaydedildi. IC₅₀ değerleri yukarıdaki yöntemlerde belirtildiği gibi hesaplandı. Hidroksil yakalama aktivitesini karşılaştırmak için numune yerine standart antioksidanlar olarak aynı konsantrasyonlardaki α-tokoferol, askorbik asit ve BHT çözeltileri kullanıldı.

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

A₀ : kontrolün absorbanı,

A₁ : örneklerin veya standartların absorbanı olarak alınmıştır.

3.5.5. Difenilpikrilhidrazil (Diphenylpicrylhydrazyl; DPPH) Radikali Süpürme Aktivitesi

Kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH) molekülünün elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından temizlenmesi ile karakteristik mor rengin değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi (Cuendet et al. 1997). Sentezlenen organik bileşikler, damla damla 0.1 M Sodyum hidroksit ilavesiyle etil alkol içerisinde farklı derişimlerde hazırlanarak DPPH'nin seyreltik metanol çözeltisiyle (% 0.004) karıştırılarak 30 dk inkübe edildi ve 517 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT, askorbik asit kullanıldı ve herbir maddenin IC₅₀ değeri hesaplandı. 2,2-

difenilpikrilhidrazil (DPPH) Radikali yakalama aktivitesini karşılaştırmak için, aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A_0 : kontrolün absorbansı,

A_1 : örneklerin veya standartların absorbansı olarak alınmıştır.

3.6. *In Vitro* Antitümör Özelliklerin Araştırılması

3.6.1. Hücre Çözdürme Protokolü

Donmuş halde cryo tüpte bulunan hücreler su banyosunda çözüldü. Hücreler falkonlara aktarılarak üzerlerine 20 mL DMEM konularak, falkonlar 5 dakika 800 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı kısım atıldı. Falkonda kalan hücrelerin üzerine 15 mL DMEM eklenerek ortam 75'lik flasklara aktarıldı. Flaskın içerisine 5 mL FBS ve birkaç damla antibiyotik konuldu. Flaskın kapağı kapatılarak, CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2. Hücrelerin Yıkınması

Flasklar içerisine gerekli solüsyonlar konulduğunda hücreler inkübatörde hızlı bir şekilde büyür ve sayıları artar. Bununla birlikte flask içerisinde besiyerleri azalır ve hücre ölümleri başlar. Bu durumun önüne geçmek için belirli aralıklarla hücrelerin bakımı yapılmalıdır. Eğer hücreler flaskın tamamını kaplamamış ve içerisinde bulunan besiyerinin rengi değişmişse yıkama işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem flow kabinde yapılmalıdır. Bunun için çalışmalarımız esnasında, 75'lik flaskta bulunan ortam boşaltıldı. Flaskın içerisine 15 mL DMEM konuldu. Flaskın içerisine 5 mL FBS eklendi ve üzerine birkaç damla L- Glutamin eklenerek flask inkübatöre kaldırıldı.

3.6.3. Hücrelerin Pasajlanması

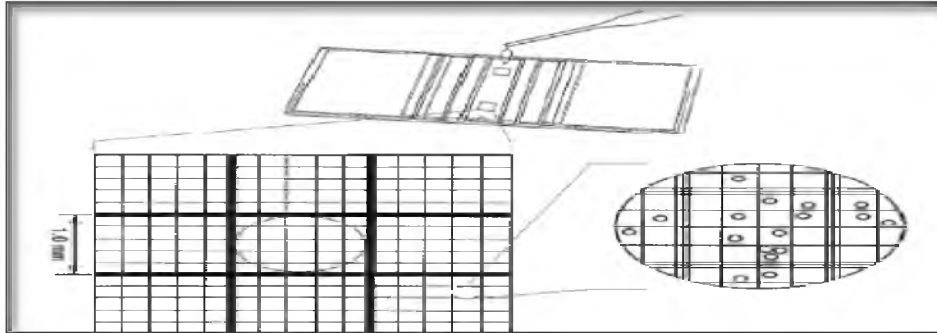
Hücreler flask içerisinde çoğalmaktadır. Hücreler flaskın bütün yüzeyini kapladığı anda yeni bir flaskta pasajlanması gerekmektedir. Aksi takdirde hücreler besin yetersizliği ve alan darlığı nedeniyle kontamine olmaya başlayacak ve kısa bir süre sonra da ölecektir. Pasajlama işlemi için, flaskta bulunan ortam boşaltıldı. Flaska 5 mL Tripsin konuldu. Hücreler yüzeye, yapılarında bulunan proteinler aracılığı ile tutunarak yapışır. Tripsin proteaz kaynaklı tipik bir enzim olduğundan flaskta yapışan hücrelerin proteinlerini

parçalayarak ortamdan ayrılmalarını sağlar. Tripsinin üzerine 15 mL DMEM konuldu. Bir flask yeni bir flask olacak şekilde pasajlama yapıldı. Flaskın içerisinde toplam 20 mL ortam bulunduğundan eski flasktan 10 mL çoklu pipet yardımıyla alındı ve yeni flaska aktarıldı. Bütün flaskların içerisine 8 mL DMEM konuldu. Flaskların tamamına 4 mL FBS eklendi ve içlerine birkaç damla L-glutamin konularak flasklar inkübatöre kaldırıldı.

3.6.3.1. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

İncelenecek hücreler tripan mavi ile boyanmıştır. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışa atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyamaktadır. Thoma lamının esası; $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Lamın çukur bir kısmı vardır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır (Şekil 3.1). Sayım bu karelerde yapılmaktadır. Sayım işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Çözünen hücreler, içerisinde 1:1 oranında olacak şekilde besiyeri bulunan steril 15 mL'lik falkona aktarıldı. 50 μl hücre, 50 μl tripan mavi ile birlikte mikrofüj tüpüne konuldu. Tüpte hafifçe pipetaj yapıldı. 50 μl hücre /tripan mavi karışımı pipet ile çekildi.



Şekil 3.1. Thoma lamının şematik hali

20 μl 'si, kılcal hareket ile lamele emdirilerek lamın her kenarına yayıldı. Thoma lamı faz kontrast inverted mikroskoba yerleştirildi. 1 mm'lik alandaki 16 karedeki canlı hücreler sayıldı. Toplam hücre sayısına göre hücreler flaska alındı. T25 flask en az 200.000 en fazla 300.000 hücre kapasitesine T75 flask en az 300.000 ve daha fazla hücre kapasitesine sahiptir. Uygulamalarımızda bu oranlar düşünülerek pasajlamalar gerçekleştirildi.

Hesaplama için; A= Birinci Bölge ve B= İkinci Bölge olarak adlandırıldı.

$$[(A + B)] \times 10^4 = 1 \text{ mL'deki hücre sayısı}$$

3.6.4. Hücrelerin 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi

MCF-7 ve HUVEC hücreleri, 37 °C' lik %5 CO₂ içeriğine sahip bir inkübatör içinde 25 cm² flasklarda, DMEM (yüksek glukoz, 2mM L-glutamine ve sodyum piruvat) ve % 10 FBS içeren besiyerlerinde kültüre edildi. Pasajlama durumuna gelen flasklar seçilerek ekim işlemine başlandı. Bu işlem steril bir laminar Flow-kabinde gerçekleştirildi. Ekim için tercih edilen flaskların ortamı boşaltıldı. Flaska yapışan hücrelerin kaldırılması amacı ile ortama 5 mL Tripsin-EDTA solüsyonu (% 0.25) ve fosfat tamponu (PBS) eklendi. Tripsinin üzerine 15 mL DMEM eklendi ve pipetaj yapılarak flaskların içerisinin iyice yıkanması sağlandı. Flasklar daha sonra bir flask bir falkon olacak şekilde falkonlara aktarıldı. Falkonlar 2000 rpm hızda 8 dakika santrifüjlendi ve santrifüj işleminden sonra hücrelerin falkonların alt kısmında toplanması sağlandı. Üst faz dökülerek, falkonlara yavaş yavaş vurularak hücreler kaldırıldı ve hücrelerin üzerine 20 mL DMEM ve 5 mL FBS eklendi. 96 kuyucuktan (100 µl/plate boşluğunda 5×10³ hücre olacak şekilde) her birine 200 µl lik karışım konuldu. İşlem bitiminde 96 kuyucuklu plateler inkübatöre kaldırıldı.

3.6.5. Hücrelere Etken Madde Uygulanması ve Hücre Büyüme Performanslarının Belirlenmesi

Steril herhangi bir falkonun içerisine 40 mL DMEM ve 10 mL FBS konularak bir karışım hazırlandı ve hazırlanan bu karışım pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı. Araştırmada kullanılan bis(α-aminoalkil-fosfinik asit) bileşikler, etil alkol içerisinde 0.1 M NaOH ilavesiyle çözünür hale getirildi. Oluşan karışım kısa süreli vortekslendi, iyice homojen olması sağlandı. Maddeler 10⁻³ ile 10⁻⁹ M konsantrasyon aralığında farklı dozlar halinde hücrelere uygulandı. 96 kuyucuklu platelere ekilen hücrelerin üzerine sırasıyla farklı konsantrasyonlardaki test bileşikler 3 tekrarlı olacak şekilde eklendi ve işlem bitiminde 96 kuyucuklu plateler inkübatöre kaldırıldı. Platelere üzerindeki hücrelerin büyüme performanslarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (1µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) test bileşiği (**4a-h**) ile muamele edilmiş hücre kültürleri 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, hücre büyüme performansları Zeiss Axio inverted mikroskop

(10x)'lu görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğrafları çekildi. Yaşayan ve büyüyen hücrelerin sayımının yapılması amacıyla Methylene blue boyası kullanıldı. Hücreler % 1 SDS içeren PBS tamponu içinde izole edildi ve methylene blue solüsyonu ile boyandı. Mikroplate okuyucuda 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.6.6. Hücrelere XTT Uygulanması ve Canlılık Tespiti

XTT, standart mikroplateokuyucu (Elisa Reader) kullanarak canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. XTT'nin içerisinde tetrazolium tuzu bulunmaktadır. Bu tuz sadece metabolik aktiviteye sahip olan hücreler tarafından formazana dönüştürülerek canlı hücrelerin tespitini yapar. XTT suda çözünme özelliğine sahip bir formazan tuzudur. İçerisinde fenol kırmızısı bulunmayan Medium'la birlikte kullanıldığında portakal rengine yakın bir renk oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrojenaz ile parçalanması sonucunda XTT formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin sahip olduğu mitokondriler aracılığı ile olmaktadır (Mosman 1983; Doyle and Griffiths 1998). Metabolik olarak aktif olan hücrelerin sarı tetrazolium tuzu olan XTT'nin turuncu formazan boyasına dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir. Formazan boyası sulu çözeltilerde çözünür ve direk olarak mikroplate okuyucu ile ölçülebilir. Deneylerimizde kullanacağımız Ticari kit Biotium Marka 30007 katalog numaralı ürünüdür. Kit içeriğinde, Steril XTT Solüsyonu (5x10 mL) ve steril aktivasyon reaktifi (PMS) (5x50 µL) bulunmaktadır.

Deneylere başlarken, XTT solüsyonu kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Eğer presipitasyon varsa 37 °C' de ısıtılarak karıştırıldı ve presipitasyonun çözülmesi sağlandı. 5 mL XTT solüsyonu üzerine 25 µL PMS eklendi ve vortekslendi. XTT çözeltisinden her bir kuyucuğa 50 µl konularak 96'lık plateler inkübatöre kaldırıldı. Plateler inkübatörde 37 °C'de 5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde plate hafif bir şekilde sallanarak boyanın kuyularda tekrar karışması sağlandı ve Elisa cihazına yerleştirildi. Cihazda 450-500 nm de absorbans okuması yapıldı.

3.6.7. Test Bileşiklerinin Apoptotik Etkinliklerinin Belirlenmesi

Meme kanseri üzerinde bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin, apoptotik etkinliklerinin belirlenmesi için MCF-7 kanser hücre hatları, Acridine orange ve ethidium bromide (AO/EB) kullanılarak boyandı ve ölçümleri yapıldı. Kanser hücreleri 12-well plakelere ekilerek 2×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğuna erişinceye kadar 24 saat antibiyotik içermeyen besiyerinde inkübe edildi. Standart yoğunluğa ulaşan hücrelere bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin uygulaması yapıldı. Bu işlemler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Daha önce yapılan MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarına test bileşiklerinin uygulanmasıyla elde edilen hücre canlılık analizleri sonucuna göre kanser hücreleri üzerinde bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin etkin dozları göz önünde bulundurularak, final konsantrasyonu 50 μ M olacak şekilde kimyasallar hücrelere uygulandı. 24 saatlik inkübasyondan sonra, hücreler 1 μ g/mL AO/EB solüsyonu ile boyandı ve floresan yoğunlukları Zeiss mikroskopta görüntülendi. Yaşayan hücreler yeşil yoğunluklu alanlar olarak görüntülenirken, apoptotik hücreler kırmızı yoğunluklu olarak gruplandırıldı.

3.6.8. Kaspaz Aktivitesinin Ölçülmesi

MCF-7 hücreleri, 50-1000 μ M konsantrasyonda test bileşikleri içeren plakelerde 36 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler, hücre lizis tamponuyla parçalandı. Kaspaz-3 aktivite testi için Invitrogen markalı "caspase-3 activity assay kit" üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanıldı. Kaspaz-3 aktivite testi spektrofotometrik tabanlı bir belirleme yöntemi olup, Ac-DEVD-pNA bileşiğinin kesilerek, kromofor p-nitroanilide (pNA) bileşiğinin oluşturulması esasına dayanmaktadır. Bu analiz için örnekler, plate üzerindeki her bir kuyucuğa yüklendi. 3 tekrarlı olarak kaspaz-3 inhibitörü (Ac-DEVDCHO) bulunan veya bulunmayan kaspaz-3 substratı (Ac-DEVD-pNA) içeren tampon içerisinde, 1 saat 37 $^{\circ}$ C de inkübe edildi. pNA çözeltisi standart olarak kullanıldı. Ac-DEVD-pNA ile 1 saat 37 $^{\circ}$ C de inkübe edildi. pNA oluşumu mikropate okuyucu (Biotec, USA) ile spektrofotometrik olarak 405 nm de takip edildi.

3.7. Topoizomeraz Enzim İnhibisyon Testleri

Bu deneyler kapsamında süpersarmal DNA relaksasyon ve dekatensasyon testleri uygulandı. Sentezlenen bileşikler (**4a-h**), 0,1 M sodyum hidroksit içeren etanol çözgeni içerisinde çözüldü. İlk olarak topoizomeraz reaksiyonları üzerinde çözgen etkisinin olup olmadığı belirlendi. Enzim inhibisyon reaksiyonlarında, İnsan Topoizomeraz I Relaksasyon ve İnsan Topoizomeraz II Dekatenasyon kitleri kullanıldı (Inspiralis, Norfolk, UK). Reaksiyon ürünleri % 1'lik, 1xTAE tamponu kullanılarak hazırlanan agaroz jelde yatay elektroforez aparatı ile (5V/cm) ayrıştırıldı (Thermo, Massachusetts, USA). Süpersarmal DNA relaksasyon reaksiyon ürünlerinin yürütüldüğü jelin ethidium bromide çözeltisi (0,5µg/mL) ile boyanmasını takiben UV altında görüntüleri alındı. Dekatenasyon analizleri için ise, reaksiyon ürünleri Et-Br varlığında yürütülüp görüntülendi. Deneyler, tip I ve tip II topoizomeraz inhibisyon analizleri için üç defa tekrarlandı.

3.7.1. Süpersarmal DNA Relaksasyon Ölçümleri

20 µL hacimde gerçekleştirilen reaksiyonlar 1 ünite topoizomeraz enzimi ve 0,5 µg süpersarmal plazmid substratı (pBR322), test bileşiği (reaksiyon içinde 1mM) varlığında ve yokluğunda, 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, % 5 gliserol içeren tampon ile gerçekleştirildi. Bu testin temeli topoizomeraz I enziminin, süpersarmal DNA'yı relakse etme özelliğine dayanmaktadır. Buna göre, topoizomeraz I enzim aktivitesini inhibe eden bileşikler reaksiyon sonunda süpersarmal DNA'nın relakse olmasını engelleyeceklerdir. Bir ünite enzim, 30 dk ve 37 °C'de 0,5 µg süpersarmal pBR322 DNA substratının relakse forma geçmesini sağlamaktadır.

3.7.2. Dekatenasyon Ölçümleri

Dekatenasyon aktivitesi testlerinde; test bileşiği varlığında ve yokluğunda enzimin kinetoplast-katene DNA ile 37 °C'de, 30 dk inkübasyonu ile meydana gelen reaksiyon ürünleri analiz edildi. Dekatenasyon reaksiyonu, 0.2 µg katene DNA (k-DNA)'nın 1 ünite tip II enzimi ile toplam 20 µl reaksiyon tamponu içerisinde (50 mM Tris HCl (pH=7.5), 125 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 µg/mL albumin),

gerçekleştirildi ve rezolüsyon ürünleri topoizomeraz II durdurma tamponu (% 5 sarkosil, % 0,0025 bromfenol mavisi, % 25 gliserol) kullanılarak analiz edildi.

3.8. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.8.1. Mikrobiyal Suşlar

Araştırmamız kapsamında incelediğimiz test bileşiklerinin (**4a-h**) antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri iki Gram-pozitif, üç Gram-negatif bakteri ve mantarlar kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildi. Test edilen mikroorganizmalar olarak *Staphylococcus aureus* ATCC-29213, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-700603 ve *Candida albicans* ATCC-10231 örnekleri kullanıldı. Bakteriyal suşlar gece boyunca (overnight) 37 °C'te Mueller Hinton Agar (MHA-Oxoid-CM 337) besiyeri içinde kültüre edildi. Mantar örnekleri ise gece boyunca 30 °C'te Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid-CM41) besiyeri içinde kültüre edildi. Bütün deneyler iki tekrar halinde yapıldı ve bakteriyal büyümenin göstergesi olan inhibisyon zon çapları ölçüldü.

3.8.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Test bileşiklerinin (**4a-h**), antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için Agar disk difüzyon metodu kullanıldı (NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999). Herbir kimyasal, 1 mL (1000 µg/mL) konsantrasyonda olacak şekilde etanol çözeltisinde, 0,1 M sodyum hidroksit eklenmesiyle çözünür hale getirildi. Hazırlanan kimyasallar steril filtre kağıdı diskler (6mm) üzerine 30 µg olacak şekilde uygulandı. Test edilen mikroorganizmaların bir süspansiyonu (0.1 mL, 10⁸ hücre/mL) katı besiyeri dökülmüş petri kutuları üzerine yayıldı. Kimyasalların emdirilmiş olduğu filtre kağıdı diskleri, mikroorganizma ekilmiş besiyerleri üzerine yerleştirildi. Daha sonra bu petri kutuları 4 °C'te 2 saat boyunca bekletildi ve bakteri denemeleri için 37 °C'te 24 saat, mantar denemeleri için ise 30 °C'te 48 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak gentamycin ve nystatin kullanıldı. Bütün testler üç tekrarlı olarak yapıldı.

3.9. MCF-7 Hücre Kültürlerinde Antioksidan Aktivitelerin Tespit Edilmesi

Çalışmamız kapsamında 1µM-100 µM aralığında farklı konsantrasyonlarda bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucu kanserli hücrelerde meydana gelen değişimlerin ve hücrelerin antioksidan yükündeki değişimlerin bazı biyokimyasal parametreler ile çeşitli analiz kitleri kullanılarak ortaya konulması ve en etkin test bileşiği konsantrasyonunun da belirlenmesi hedeflendi. Araştırmamızda sentezlediğimiz bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin MCF-7 kanser hücrelerindeki lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi ve tiyol düzeylerinin tayini, aril esteraz (Ar-Es) düzeylerinin ve PON-1 seviyesinin tayini şeklinde analizler yapıldı. Sentezlediğimiz kimyasalların, toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksini (OSİ) ne şekilde değiştirdiğini göstermek üzere Rel Assay marka ticari kitler kullanıldı. MCF-7 hücre kültürleri üzerinde test bileşiklerinin 1µM-100 µM aralığında farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte, biyokimyasal parametrelerin analizlerinin yapılabilmesi için, öncelikle hücre numunelerine 1/9 (v/v) oranında fosfat tamponu (pH=7,4; 50 mM) eklendi ve soğutuculu ortamda homojenizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Homojenizasyondan sonra homojenizat örnekleri, 3000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.9.1. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Analizi

MCF-7 hücre kültürlerinde bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin uygulanmasıyla birlikte lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyleri, (Dastan et al. 2014)'ün önerdiği metod ile belirlendi. Tiyobarbitürik asit (TBA) ile 90-95 °C'de reaksiyona giren MDA'nın oluşturduğu, pembe renkli kromojen moleküller, spektrofotometrik olarak 532 nm'de okundu ve absorbanları kaydedildi. Elde edilen sonuçlar nmol/g proteini olarak ifade edildi (Esterbauer and Cheeseman 1990; Dastan et al. 2014).

3.9.2. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Analizi

MCF-7 hücre kültürlerinde bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin uygulanmasıyla birlikte oluşan TAS, (Erel 2004) tarafından geliştirilen yöntemde ufak modifikasyonlar

yapılarak saptandı (Dastan et al. 2014). Bu yöntemde numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirir. 660 nm absorbansdaki değişim total antioksidan miktarıyla alakalıdır. Kitin kalibrasyonu E vitamini benzeri Trolox Equivalent adı verilen stabil antioksidan standardı ile yapıldı. Sonuç olarak, elde edilen veri litre başına eşdeğer Trolox (eşdeğerli mmol Trolox./l) milimol olarak ifade edildi (Erel 2004).

3.9.3. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi

MCF-7 hücre kültürlerindeki TOS, (Erel 2005) tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak belirlendi. Numunedeki oksidanlar ferrik iyonla tümleşik ferröz iyon-kıskacını oksitler. Mevcut oksidanlar; demir iyonunu, demir iyon-o-dianisidin kompleksine oksitlemektedirler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol olarak bulunan gliserol molekülleri tarafından artırılmaktadır. Ortamda bulunan gliserol, bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarabilmektedir. Ferrik iyonlar asidik ortamda “ksilenol orange” ile kromojen renkli bir kompleks oluştururlar. Analiz hidrojen peroksitle kalibre edilip, sonuçlar litre başına denk mikromolar hidrojen peroksit ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/l) olarak ifade edilmektedir (Erel 2005).

3.9.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Analizi

Total Oksidan Seviye (TOS)'nin, Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye oranlanması şeklinde ifade edilerek, Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) belirlendi ve bu oran, Total Oksidan Seviye (TOS)/Total Antioksidan Seviye (TAS) şeklinde gösterildi (Harma et al. 2003). Hesaplamalar yapılırken öncelikle, TAS değerleri $\mu\text{mol/l}$ 'ye çevrildi.

3.9.5. Toplam Tiyol Düzeylerinin Analizi

MCF-7 hücre kültürlerindeki serbest sülfidril gruplarının düzeyleri, Hu et al. (1993) tarafından modifiye edilen metoda göre analiz edildi. Bu yöntem, numunelerdeki serbest tiyol gruplarının bazik ortamda α -5,5-ditiyobis2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile sarı renkli bir kompleks oluşturması ve oluşan bu renkli bileşiğin 412 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır ve bu yöntem ile elde edilen sonuçlar milimolar olarak ifade edilmektedir (Dastan et al. 2014).

3.9.6. Aril Esteraz (ArEs) Enzimi Analizi

MCF-7 hücre kültürlerindeki aril esteraz enzim miktarı, “Rel Assay Aryl Esterase Kiti” kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlendi. Rel Assay Aril Esteraz Kiti ile ölçüm prosedürü kapsamında Reaktif 1 ve 2 olmak üzere 2 adet kit bileşeni kullanıldı. İlk olarak 548 nm de daha sonra 700 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı. Bu test, örnekte mevcut olan Aril esteraz enziminin, fenil asetat substratını fenol ve asetik asite dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Üretilen fenol kalorimetrik olarak, 4-aminoantipirin ve Potasyum ferrisiyanid ile oksidatif kompleks yapılarak ölçülür. Fenil asetatın nonenzimatik olarak hidrolizi, total hidroliz oranından çıkarılır. 1 ünite aril esteraz aktivitesi, 37 °C de 1 dakikada 1 litre başına hidrolizlenen 1 mmol fenil asetata eşittir. Çalışmamızdaki aril esteraz analizleri için ölçüm yapmak için Rel Assay Laboratuvarında otomatik biyokimya analizörü kullanıldı. Kalorimetrik olarak ölçülen nonenzimatik hidroliz değeri, örnek değerinden çıkarılarak enzimatik aktiviteye ait net değerler hesaplandı. Sonuçlar dakikada bir mikromolar substratın hidrolizine eşit olan kU/litre cinsinden ifade edildi.

3.9.7. Paraoksonaz (PON1) Enzimi Analizi

MCF-7 hücre kültürlerindeki paraoksonaz enzimi miktarı, “Rel Assay Paraoxonase Kiti” kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlendi. Rel Assay Paraoxonase kiti ile ölçüm yapmak için Rel Assay Laboratuvarında otomatik biyokimya analizörü kullanıldı. Örnekteki paraoksonaz enzimi reaksiyon ortamındaki paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat) substratını hidroliz etmesi prensibine dayanmaktadır ve açığa çıkan ürünün absorbans artışı, absorbans spektrumuna uygun dalga boyunda kinetik olarak izlenerek sonuçlar kaydedilir. 412 nm dalga boyunda, kinetik okuma modu olan açık sistem biyokimya otoanalizöründe aktivite tayini yapıldı. Paraokson çözeltisi günlük hazırlandı ve çözücü olarak aseton kullanıldı. Substrat çözeltisi içerisinde 2 mM kalsiyum klorür ve 2 mM Paraokson bulunmasına dikkat edildi. Aktivite ölçümü için optimal pH 8 olarak ayarlandı (Gürsu ve Gülcü 2003). Nonenzimatik hidroliz değeri, örnek değerinden çıkarılarak enzimatik aktiviteye ait net değerler hesaplandı. Sonuçlar dakikada bir mikromolar substratın hidrolizine eşit olan ünite/litre cinsinden ifade edildi.

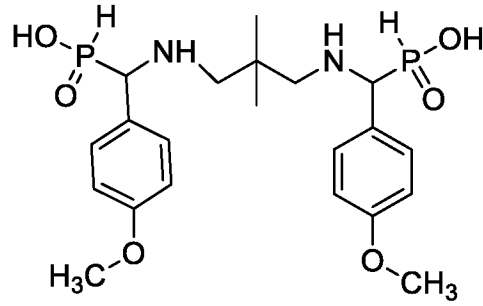
3.10. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 22.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, United States) ve Paleontological statistics (PAST3; Hammer et al. 2001) programları kullanıldı. Tek değişkenli verilerin normal dağılıma uygunluğu Lilliefors düzeltmeli Kolmogorov-Smirnov testi, Shapiro-Wilk testi ve Değişkenlik katsayıları ile çok değişkenli normal dağılıma uygunluğu için Mardia; (Dornik and Hansen omnibus) testi, varyans homojenliği için Levene testi kullanıldı. Bağımsıziki grubun karşılaştırılmasında Independent-Samples T testi Bootstrap sonuçlarıyla birlikte kullanıldı. İki'den fazla grupların birbiriyle karşılaştırılmasında One-Way Anova (Robust Test: Brown-Forsythe) testi Bootstrap sonuçlarıyla birlikte kullanılır iken Post Hoc analizleri için LSD, Dunnett ve Games Howell testleri kullanıldı. Nonparametrik yöntemlerden Kruskal-Wallis H Testi Monte Carlo simülasyon tekniği kullanılır iken Post Hoc analizler için nonparametrik posthoc test (Miller, 1966) testi kullanıldı. Bağımlı değişken (Derişim) ile bağımsız değişken (İnhibisyon %) arasındaki nedenselliği matematiksel model şeklinde ortaya koyabilmek için Linear Regression analizi ile test edildi ve liner ve kübik modeller kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. Kantitatif veriler tablolarda ortalama \pm S.D. (standart sapma) değerleri şeklinde ifade edilmiştir. Kategorik veriler ise n (sayı) ve yüzdelerle (%) ifade edilmiştir. Veriler % 95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0,05 ten küçük ise anlamlı kabul edilmiştir.

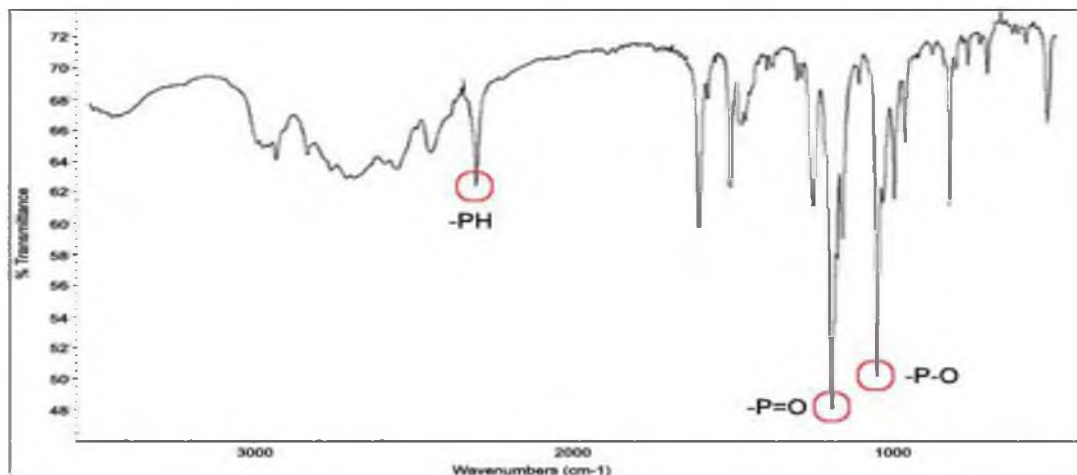
4. DENEYSEL BULGULAR

Sentezlediğimiz bileşiklerimize ait FT-IR ve NMR karakterizasyon bilgisi Tablo 4.1’de belirtilmiştir. Örnek olarak sadece **4g** bileşiğimize ait spektrumlara aşağıda yer verilmiştir (Şekil 4.1-4.4).

4.1. 2,2-dimetilpropan-1,3-diilbis[imino(4-metoksifenil)metandiil]bisfosfinik asit’in Karakterizasyonu (4g)

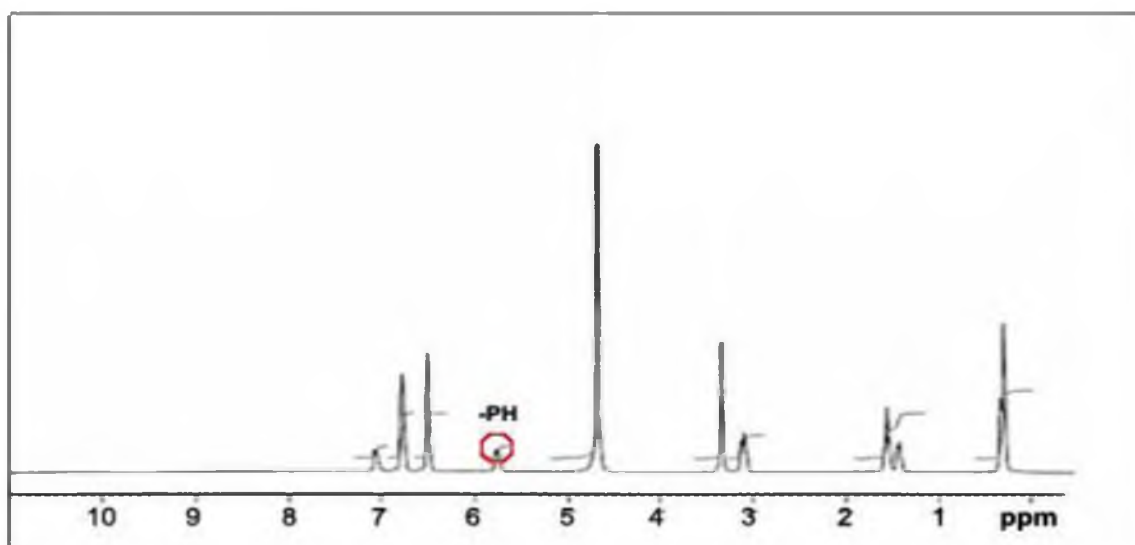


2,2-dimetilpropan-1,3-diilbis[imino(4-metoksifenil)metandiil]bisfosfinik asit’in IR spektrumu Şekil 4.1., ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.2., ¹³C-NMR spektrumu Şekil 4.3., ³¹P-NMR spektrumu Şekil 4.4.’de verildi. Sentezlenen aminofosfinik asitlerin spektrumlarında, maddemize özgü olan P-H bağına ait olan gerilme titreşimi 2300-2400 cm⁻¹ arasında, P=O bağına ait titreşim 1150-1200 cm⁻¹ arasında ve P-O⁻ bağına ait titreşim 1000-1100 cm⁻¹ arasındaki bölgede saptanmıştır.



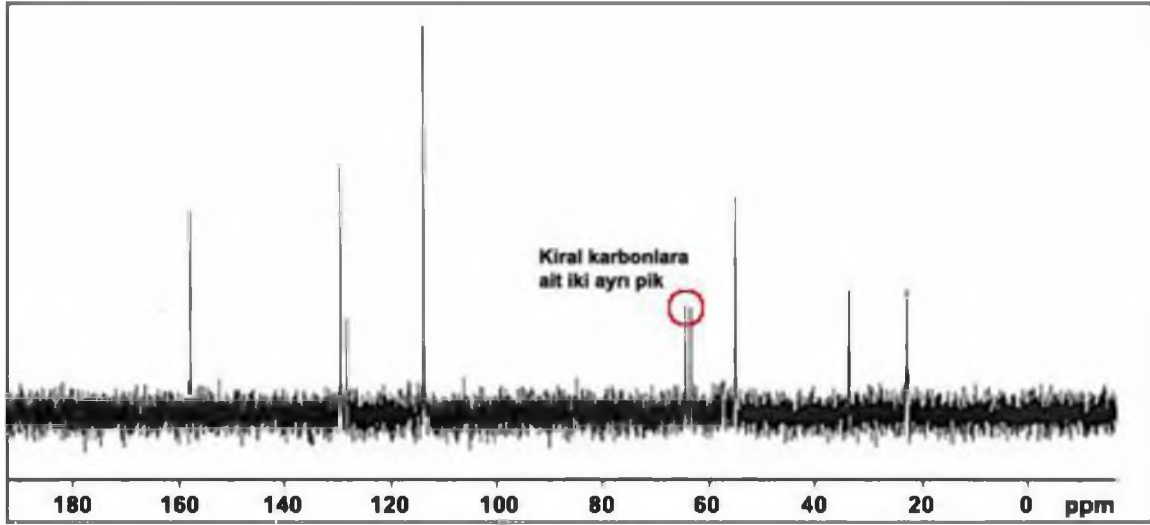
Şekil 4.1. 4g'nin FT-IR spektrumu

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3422 ($-\text{OH}$), 3220 ($-\text{NH}$), 3050-3024 ($-\text{Ar-H}$), 2933-2992 ($-\text{C-H}$), 2307 ($-\text{PH}$), 1609 ($-\text{C}=\text{C}$), 1162 ($-\text{P}=\text{O}$), 1054 ($-\text{P-O}$).



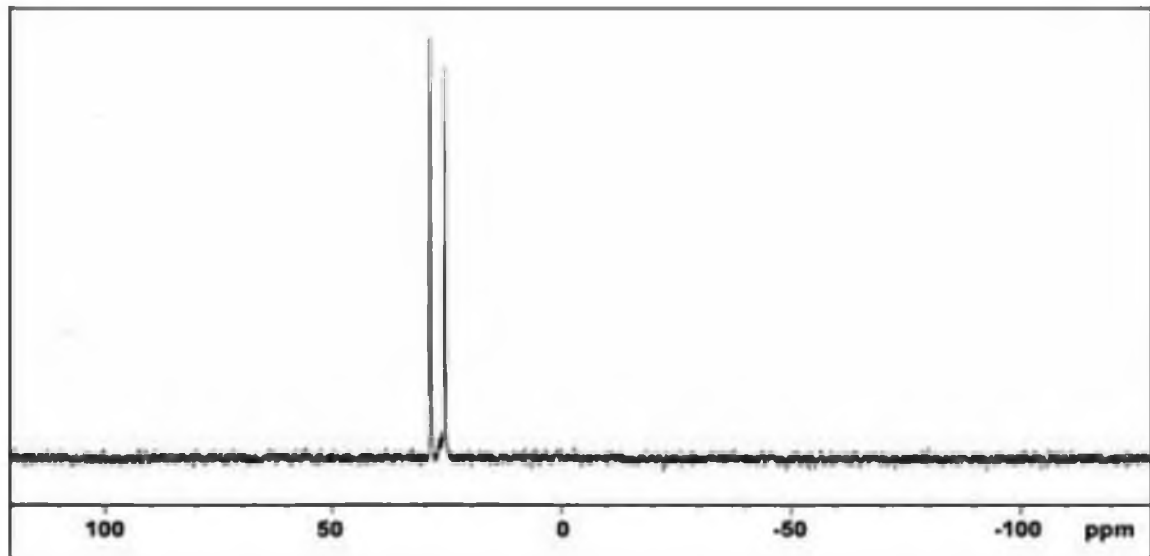
Şekil 4.2. 4g'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, NaOD/D₂O, δ , ppm): 6.85 (m, 4H, 4 \times Ar-H), 6.58 (m, 4H, 4 \times Ar-H), 5.83 (d, 2H, $J=517.6$ Hz, 2 \times PH), 3.42 (s, 6H, 2 \times O-CH₃), 3.19 (d, 2H, $J=12.4$ Hz, 2 \times PCH), 1.66 (s, 4H, 2 \times N-CH₂), 1.53 (m, 2H, 2 \times NH), 0.38 (m, 6H, CH₂-C-CH₃)



Şekil 4.3.4g'nin ^{13}C -NMR spektrumu

^{13}C -NMR (100 MHz, NaOD/D₂O, δ , ppm): 157.73, 129.29, 128.14, 113.72, 64.51, 63.55, 57.42, 55.06, 33.75, 22.87.



Şekil 4.4. 4g'nin ^{31}P -NMR spektrumu

^{31}P -NMR (162 MHz, NaOD/D₂O, δ , ppm): 28.64, 24.44.

Tablo 4.1. Sentezlenen fosfinik asit bileşiklerine (4a-h) ait spektral veriler

Bileşiğin adı	FT-IR (KBr, ν , cm^{-1}):	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, NaOD/D ₂ O, δ , ppm)	$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, NaOD/D ₂ O, δ , ppm)	$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, NaOD/D ₂ O, δ , ppm)
4a	3400 (–OH), 3215 (–NH), 2384 (–PH), 1597 (–C=C), 1182 (–P=O), 1017-1042 (–P-O) cm^{-1} .	6.92 (m, 4H, Ar-H), 6.60 (d, 2H, $J=514.8$ Hz, PH), 6.40 (m, 4H, Ar-H), 3.99 (m, 2H, PCH), 2.71 (m, 4H, N-CH ₂).	163.3, 128.2, 127.7, 124.4, 118.6, 113.6, 55.9 46.1.	
4b	3411 (–OH), 3266 (–NH), 2324 (–PH), 1612 (–C=C), 1165 (–P=O), 1046-1069 (–P-O) cm^{-1} .	6.88 (m, 4H, Ar-H), 6.57 (d, 2H, $J=516.4$ Hz PH), 6.28 (m, 4H, Ar-H), 3.01 (m, 2H, PCH), 2.87 (s, 6H, O-CH ₃), 2.02 (m, 4H, N-CH ₂).	158.1, 129.6, 127.9, 114.0, 63.1, 62.3, 55.3, 44.8.	
4c	3437 (–OH), 3241 (–NH), 2318 (–PH), 1617 (–C=C), 1180 (–P=O), 1066 (–P-O) cm^{-1} .	7.10 (s, 2H, Ar-H), 6.75 (s, 2H, Ar-H), 6.71(d, 2H, $J=518.4$ Hz PH), 6.68 (s, 2H, Ar-H), 3.67 (m, 2H, PCH), 2.22 (m, 4H, N-CH ₂).	138.5, 126.7, 125.5, 59.2, 58.2, 45.4, 42.5, 39.2.	
4d	3403 (–OH), 3258 (–NH), 2335 (–PH), 1605 (–C=C), 1179 (–P=O), 1049 (–P-O) cm^{-1} .	6.84 (m, 4H, Ar-H), 6.62 (d, 2H, $J=514.4$ Hz, PH), 6.40 (m, 4H, Ar-H), 3.94 (d, 2H, $J=12.8$ Hz, PCH), 2.07 (m, 4H, N-CH ₂), 1.23 (s, 2H, N-CH ₂ -CH ₂).	165.2, 128.1, 127.6, 124.3, 118.6, 113.5, 55.5, 44.6, 28.2.	
4e	3414 (–OH), 3252 (–NH), 2315 (–PH), 1613 (–C=C), 1181 (–P=O), 1070 (–P-O) cm^{-1} .	7.30 (m, 4H, Ar-H), 7.05 (m, 4H, Ar-H), 6.95 (d, 2H, $J=520$ Hz, PH), 3.77 (s, 6H, O-CH ₃), 3.70 (m, 2H, PCH), 2.15 (m, 4H, N-CH ₂), 1.24 (m, 2H, N-CH ₂ -CH ₂).	158.1, 129.6, 127.9, 114.0, 63.1, 62.3, 55.3, 44.8, 27.7.	
4f	3400 (–OH), 3224 (–NH), 2328 (–PH), 1613 (–C=C), 1198 (–P=O), 1054 (–P-O) cm^{-1} .	7.55 (d, 2H, Ar-H), 7.21 (t, 2H, Ar-H), 7.13 (s, 2H, Ar-H), 6.99 (d, 2H, $J=524.4$ Hz, PH), 4.06 (m, 2H, PCH), 2.39 (m, 4H, N-CH ₂), 1.65 (m, 2H, N-CH ₂ -CH ₂).	138.6, 127.2, 127.0, 125.7, 59.5, 58.6, 45.0, 27.7.	
4g	3417 (–OH), 3221 (–NH), 2307 (–PH), 1609 (–C=C), 1163 (–P=O), 1054 (–P-O) cm^{-1} .	7.50 (m, 4H, Ar-H), 7.25 (m, 4H, Ar-H), 6.53 (d, 2H, $J=517.6$ Hz, PH), 3.42 (s, 6H, O-CH ₃), 3.19 (d, 2H, $J=12.4$ Hz, PCH), 1.66 (s, 4H, N-CH ₂), 0.38 (m, 6H, CH ₂ -C-CH ₃).	157.7, 129.2, 128.1, 113.7, 64.5, 63.5, 57.4, 55.0, 33.7, 22.8.	28.64, 24.44.
4h	3400 (–OH), 3215 (–NH), 2351 (–PH), 1697 (–C=C), 1197 (–P=O), 1054 (–P-O) cm^{-1} .	7.01 (m, 2H, Ar-H), 6.60 (m, 4H, Ar-H), 6.54 (d, 2H, $J=525.2$ Hz, PH), 3.50 (d, 2H, $J=15.2$ Hz, PCH), 1.76 (m, 4H, N-CH ₂), 0.40 (m, 6H, CH ₂ -C-CH ₃).	139.59, 127.0, 126.3, 125.2, 61.1, 60.2, 57.6, 33.7, 23.4, 22.8.	27.55, 24.31.

4.2. *In Vitro* Antioksidan Aktivitelerin Değerlendirilmesi

Bütün fosfinik asit türevleri (4a–h) ve standart çözeltiler 50 µg/mL ile 500 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Sentezlenen fosfinik asit türevlerinin ve standart çözeltilerin antioksidan kapasiteleri aşağıda belirtilen 5 farklı yöntemle göre ortaya konulmuştur. Farklı *in vitro* antioksidan aktivite yöntemlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen ve her bir antioksidan aktivite testlerinde gözlenen sonuçların ifade edildiği IC_{50} değerlerini gösteren veriler, Tablo 4.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Çeşitli *in vitro* antioksidan aktivite metodlarından elde edilen, test bileşikleri ve standart çözeltilere ait IC_{50} değerleri

Test bileşikleri	IC_{50} değerleri ± Standart sapma				
	Hidroksil Radikal Yakalama Aktivitesi	Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesi	DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi	Metal Şelatlama Aktivitesi	Hidrojen Peroksit Yakalama Aktivitesi
Askorbik asit	32,90 ± 20,63*	44,43 ± 20,65*	19,238 ± 19,25*	-	52,28 ± 9,64*
BHT	38,27 ± 21,36*	39,70 ± 17,88*	75,35 ± 11,04*	45,24 ± 27,98*	201,15 ± 28,68*
4g	54,66 ± 16,87*	95,48 ± 120,67**	38,59 ± 21,33*	77,96 ± 19,92**	238,32 ± 8,51*
4h	52,45 ± 16,28*	66,44 ± 24,37*	43,73 ± 16,25*	66,85 ± 12,41*	201,23 ± 14,89*
4d	54,85 ± 16,14*	61,86 ± 49,47*	476,45 ± 11,81*	62,61 ± 30,16*	251,51 ± 6,71**
4a	55,25 ± 15,06*	62,10 ± 47,97*	483,02 ± 14,28*	134,73 ± 5,95*	293,19 ± 3,06**
4b	60,56 ± 15,54*	385,06 ± 8,31*	61,20 ± 18,71*	353,68 ± 10,33*	333,41 ± 3,91*
4c	48,15 ± 15,31*	51,62 ± 9,14*	420,70 ± 9,99*	37,51 ± 3,01*	60,87 ± 44,54*
4e	58,11 ± 14,79*	52,41 ± 48,16*	37,03 ± 18,07*	406,09 ± 15,41*	254,63 ± 68,25*
4f	48,40 ± 15,94*	55,91 ± 48,94*	424,22 ± 9,97*	48,46 ± 11,39**	60,07 ± 17,05*
α-tokoferol	-	57,40 ± 64,11*	-	35,12 ± 26,94*	-

Linear Regresyon (*Kübik Model **Linear Model)

4.2.1. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi lipit peroksidasyonuna sebep olan metalleri tutukladığından dolayı önemlidir (Kandepu 1999). Lipit peroksidasyonuna sebep olan radikaller, zararlı protein modifikasyonlarına ve DNA hasarlarına sebep olabilmektedir. Şelatlama yapabilen reaktifler, sekonder antioksidan moleküller olarak belirlenmiştir ve bunlar

redoks potansiyelini düşürmektedirler. Bu yüzden metal iyonlarının oksitlenmiş formlarını stabilize ederler. Ferrozin molekülü Fe^{2+} molekülüyle miktarsal olarak tayin edilebilecek kompleksler oluşturabilmektedir. Kompleks oluşumu, ortamda şelatlama ajanının bulunması durumunda engellenir ve bu da kompleksin belirteci olan kırmızı rengin miktarında azalma meydana getirir. Bu yüzden kırmızı renkli kompleksin azalmasının ölçülmesiyle şelatör ajanın, şelatlama aktivitesi hesaplanmaktadır (Shawmi and Parhangi 1980). Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde, test bileşikleri veya standart antioksidanların varlığında ferrozin- Fe^{+2} kompleksi, tam olarak oluşmamaktadır. Bu durum kullanılan bileşiklerin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir. Metal şelatlama aktivitesi, her bir test bileşiği için 50-500 $\mu\text{g/mL}$ olmak üzere farklı derişimlerde hazırlanmış fosfinik asit türevleriyle değerlendirilmiştir. Aynı zamanda test bileşikleriyle aynı konsantrasyonda hazırlanmış standart antioksidan olarak kabul edilen α -tokoferol ve BHT örnekleri referans olarak kullanılmıştır. Tüm örneklerin 562 nm'de absorbansları alınmış ve tutuklanan metalin yüzdesi hesaplanmıştır. Bu metotta, düşük absorbans değeri hesaplama sonucunda yüksek aktivite yüzdesine karşılık gelir. Sonuçlar Tablo 4.2.'de sunulmuştur. Bu çalışmada, denediğimiz tüm bileşikler içerisinde, **4c** bileşiği en yüksek metal şelatlama aktivitesi göstermektedir. Aynı zamanda **4c** bileşiğinin standart çözeltilerle karşılaştırıldığında iyi bir aktivite değeri sergilediği de görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız standart ve test bileşiklerinin metal şelatlama kapasitelerine göre sıralanmaları şu şekildedir: α -tokoferol>**4c**>BHT>**4f**>**4d**>**4h**>**4g**>**4a**>**4b**>**4e** (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Test bileşikleri ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteeri

Test bileşikleri	(50 $\mu\text{g/mL}$)	(100 $\mu\text{g/mL}$)	(200 $\mu\text{g/mL}$)	(500 $\mu\text{g/mL}$)	IC_{50}
BHT *	77,28 \pm 10,11	83,53 \pm 9,13	85,14 \pm 9,10	87,75 \pm 7,85	45,24 \pm 27,98*
α-tokoferol *	65,81 \pm 9,13	72,60 \pm 8,12	73,46 \pm 6,54	75,56 \pm 6,81	35,12 \pm 26,94*
4g **	49,29 \pm 8,46	50,02 \pm 10,11	52,19 \pm 7,13	59,05 \pm 4,56	77,96 \pm 19,92**
4h *	40,91 \pm 4,56	42,65 \pm 5,43	55,81 \pm 7,10	60,33 \pm 9,13	66,85 \pm 42,41*
4d *	37,58 \pm 8,12	50,12 \pm 7,48	54,69 \pm 6,45	58,61 \pm 8,42	62,61 \pm 30,16*
4a *	45,11 \pm 7,45	48,79 \pm 7,13	51,89 \pm 10,12	56,74 \pm 6,45	134,73 \pm 5,95*
4b *	38,18 \pm 8,15	40,26 \pm 6,10	45,83 \pm 3,45	53,08 \pm 5,10	353,68 \pm 10,33*
4c *	48,47 \pm 10,12	56,10 \pm 9,10	58,90 \pm 6,74	61,12 \pm 5,48	37,51 \pm 30,01*
4e *	40,01 \pm 12,11	42,54 \pm 8,14	46,81 \pm 5,81	51,01 \pm 6,13	406,09 \pm 15,41*
4f **	48,12 \pm 4,56	59,13 \pm 5,12	61,28 \pm 5,46	62,23 \pm 4,52	48,46 \pm 141,39**

Linear Regresyon (*Kübik Model **Linear Model)

Grafiklere 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 grafiklerde de gösterilmiştir (Şekil 4.5).

4.2.2. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

Hidrojen peroksit (H_2O_2), zayıf bir substrat olmasına rağmen, kuvvetli bir oksitleyici potansiyele sahiptir ve *in vivo* şartlarda süperoksit dismutaz gibi çeşitli oksitleyici enzimler tarafından meydana getirilmektedir. Pek çok farklı hücre tipinde 20–50 mg seviyesinde veya biraz daha düşük hidrojen peroksit miktarlarının sitotoksik etkili olduğu ve hücrelerde hidroksil radikallerinin çoğalmasına sebep olduğu bilinmektedir (Hudson 1990; Kilic vd 2014). Özellikle Fe^{+2} ve Cu^{+} gibi metal iyonlarının varlığında kolayca hidroksil radikaline ($OH\bullet$) dönüşebilmektedir. Bu yüzden canlı sistemlerde H_2O_2 'nin giderilmesi çok önemlidir.

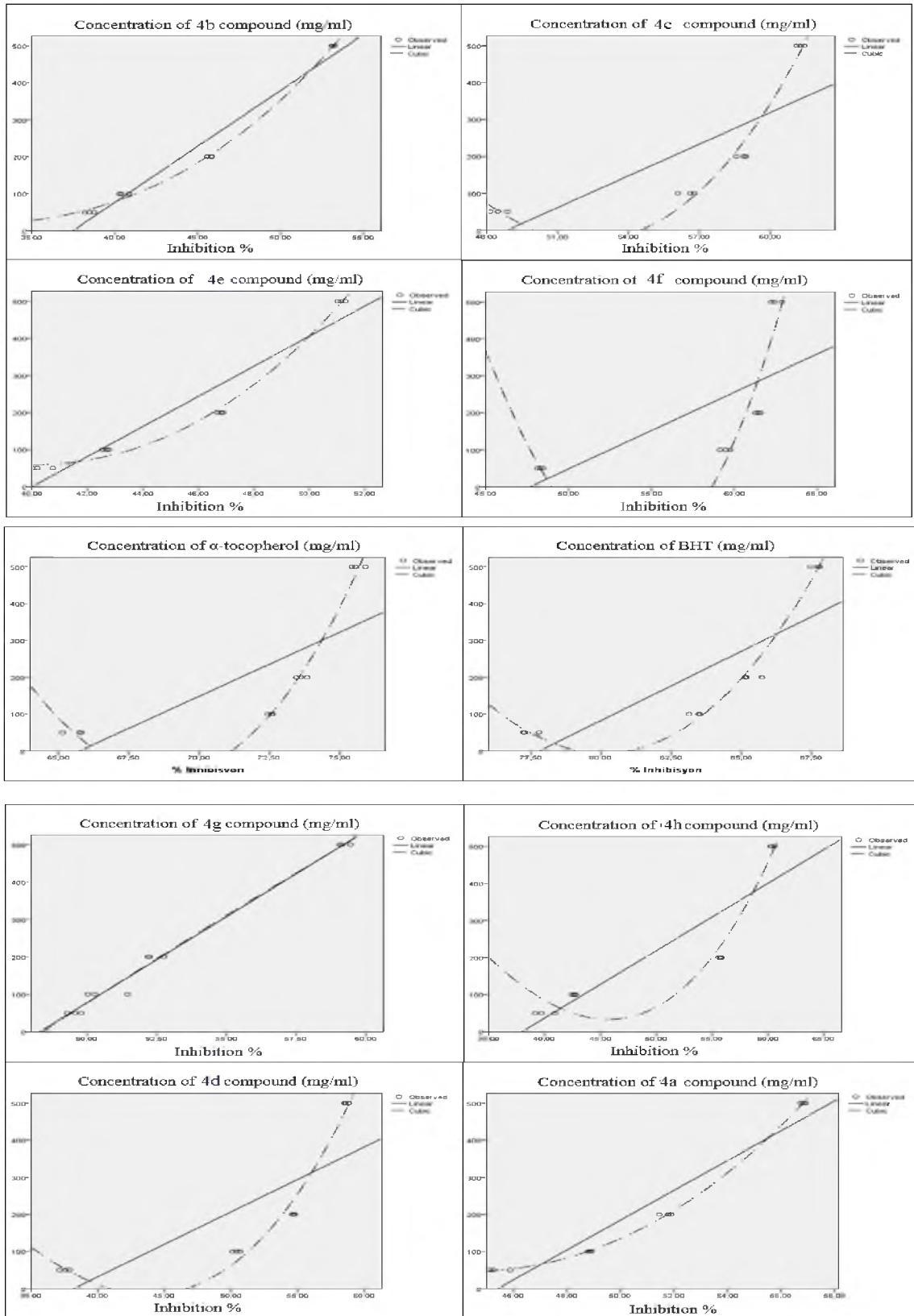
Bu çalışmada hidrojen peroksit giderme aktivitesi her bir test bileşiği için 50-500 $\mu g/mL$ olmak üzere farklı derişimlerde hazırlanmış fosfinik asit türevleriyle ve onlarla aynı konsantrasyonda hazırlanmış standart antioksidan olarak kabul edilen Askorbik asit ve BHT örnekleri ile 230 nm'deki absorbanları alınarak belirlenmiştir. Denediğimiz tüm bileşikler içerisinde, **4f** bileşiği (IC_{50} : 60,07 $\mu g/mL$) ve **4c** bileşiği (IC_{50} : 60,87 $\mu g/mL$) en yüksek hidrojen peroksit giderme aktivitesi göstermektedir. Hatta bu 2 bileşiğin H_2O_2 giderme aktivitesi, standart antioksidan olarak kullandığımız BHT bileşiğinden de oldukça yüksektir. Çalışmamızda kullandığımız standart ve test bileşiklerinin hidrojen peroksit giderme aktivitelerine göre sıralanmaları şu şekildedir:

Askorbik asit>4f>4c>BHT>4h>4g>4d>4e>4a>4b. Sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'deki grafiklerde sunulmuştur.

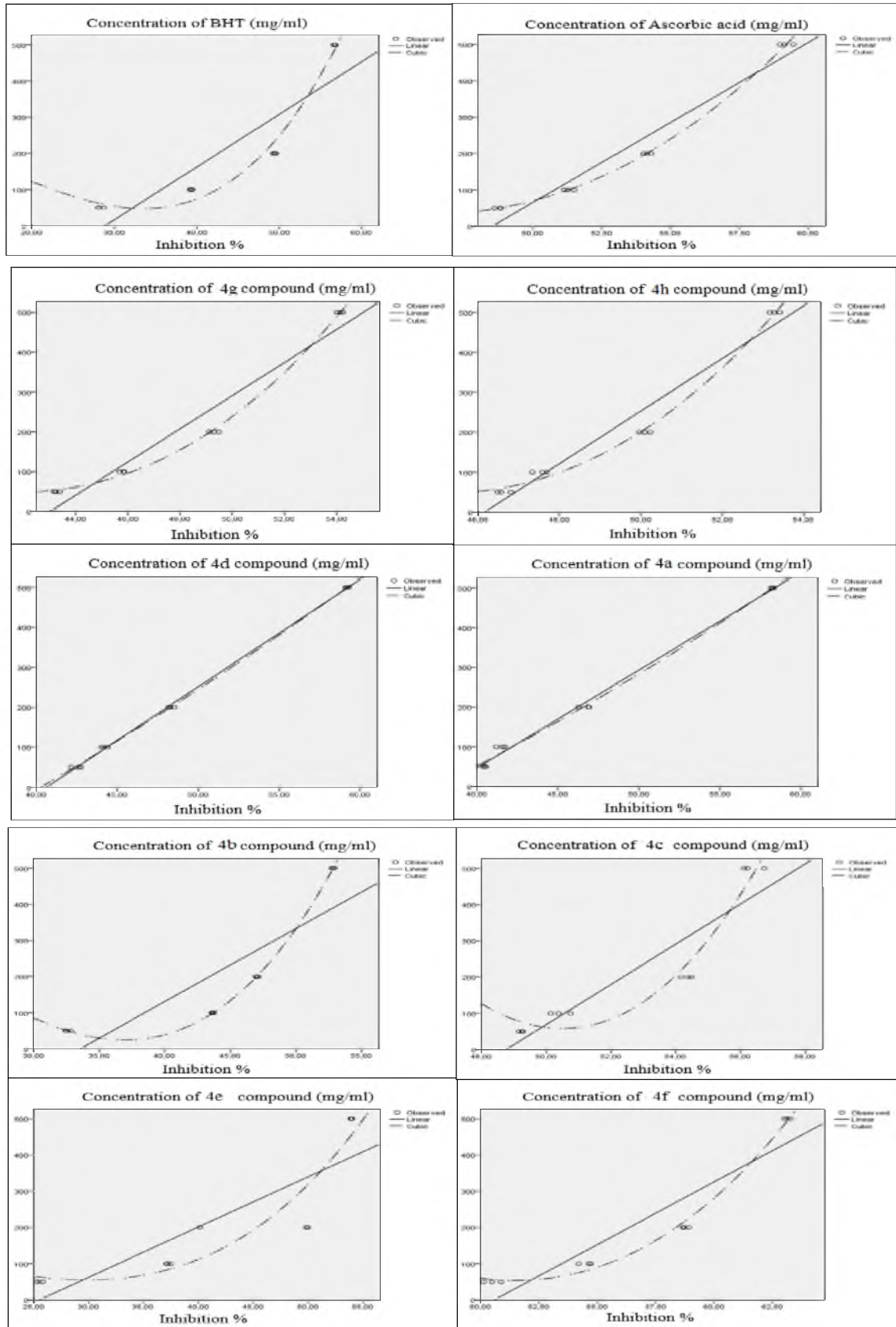
Tablo 4.4. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidrojen peroksit giderme aktiviteleri

<i>Test bileşikleri</i>	<i>(50 µg/mL)</i>	<i>(100 µg/mL)</i>	<i>(200 µg/mL)</i>	<i>(500 µg/mL)</i>	<i>IC₅₀</i>
Askorbik asid *	48,83 ± 3,15	51,12 ± 4,12	54,01 ± 6,48	58,96 ± 5,68	52,28 ± 9,64*
BHT *	28,14 ± 10,41	39,16 ± 9,10	49,24 ± 8,12	56,58 ± 7,12	201,15 ± 28,68*
4g *	43,18 ± 11,74	45,84 ± 10,40	49,12 ± 8,41	54,01 ± 7,85	238,32 ± 8,51*
4h *	46,49 ± 20,14	47,33 ± 18,16	49,96 ± 15,13	53,17 ± 6,10	201,23 ± 14,89*
4d **	42,14 ± 15,13	44,01 ± 13,24	48,18 ± 10,14	59,09 ± 8,98	251,51 ± 6,71**
4a **	40,38 ± 15,87	41,20 ± 12,23	46,89 ± 10,4	58,16 ± 10,17	293,19 ± 13,06**
4b *	32,81 ± 10,11	43,68 ± 9,41	46,94 ± 7,85	52,84 ± 6,89	333,41 ± 3,91*
4c *	49,16 ± 9,12	50,14 ± 7,10	54,16 ± 6,12	56,10 ± 6,85	60,87 ± 44,54*
4e *	25,17 ± 5,41	37,11 ± 3,45	49,98 ± 2,12	53,87 ± 3,56	254,63 ± 68,25*
4f *	50,12 ± 7,20	54,19 ± 6,54	58,67 ± 3,56	63,01 ± 3,18	60,07 ± 17,05*

*Linear Regresyon (*Kübik Model **Linear Model)*



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin metal şelatlama aktiviteleri



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri

4.2.3. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

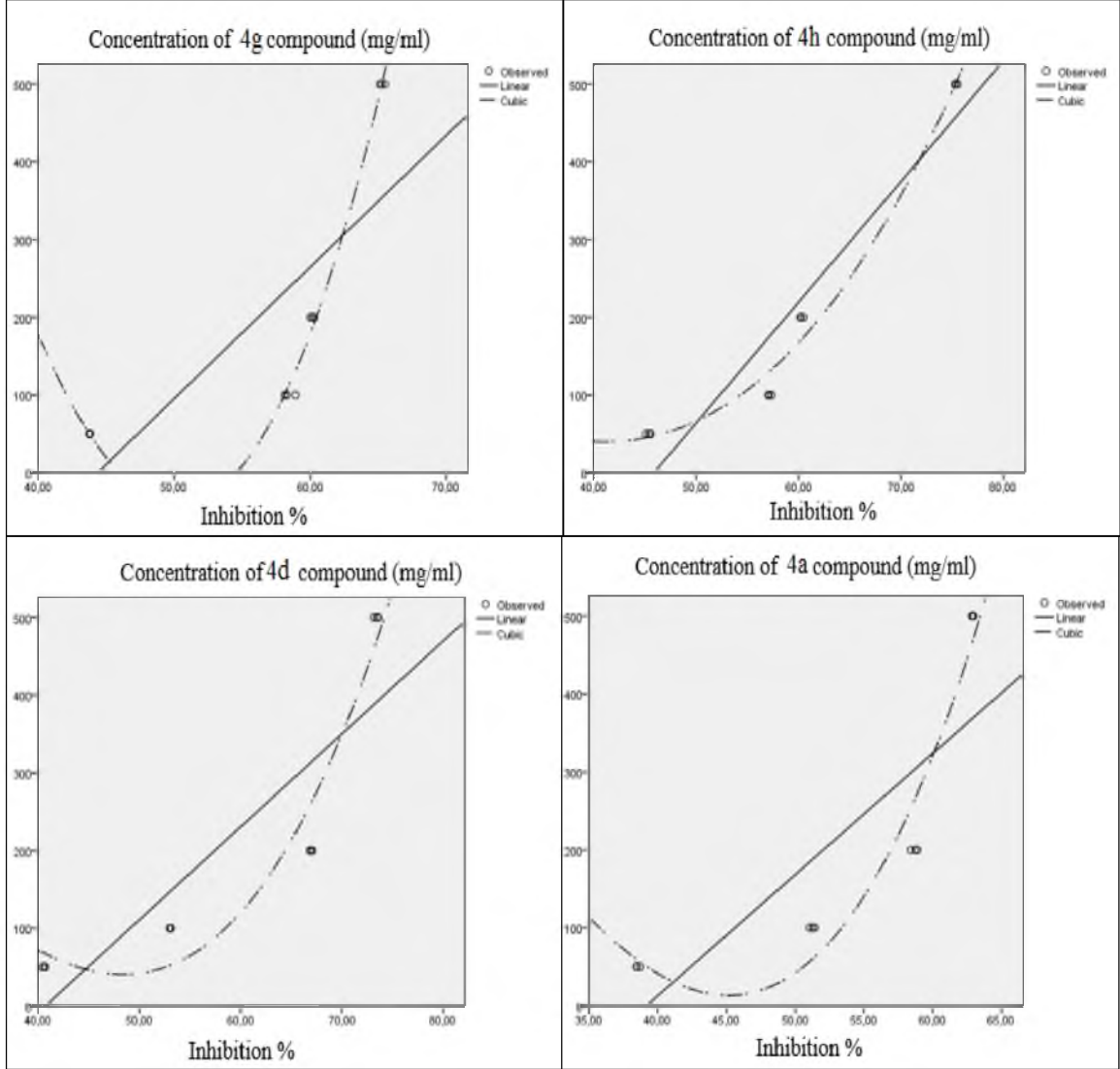
Süperoksit anyonları oksijen merkezli radikallerdir ve doku hasarlarında görülen biyolojik makromoleküller ile etkileşim potansiyelinden doğan aktif serbest radikallerin indikatörüdür (Halliwell et al. 1987). Bu analizin prensibi PMS/NADH-NBT sisteminde, PMS/NADH çifti tarafından meydana getirilen süperoksit anyonlarının NBT'yi indirgeme reaksiyonlarına dayanmaktadır. İndirgenmiş NBT ürünü 560 nm'de maksimum aktivite göstermektedir. Reaksiyon karışımında absorbands azalması, süperoksit anyonlarının giderildiğini ve dolayısıyla antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Süperoksit radikali giderme aktivitesi her bir test bileşiği ve standartlar için 50-500 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 560 nm'de absorbandslarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Fosfinik asit türevleriyle aynı konsantrasyonda hazırlanmış standart antioksidan bileşikler olarak α-tokoferol, BHT ve askorbik asit örnekleri referans seçilmiştir. Bu çalışmada denediğimiz tüm sentez bileşiklerinin süperoksit giderme aktiviteleri hemen hemen birbirine eşittir ve oldukça yüksektir. Denediğimiz tüm bileşikler içerisinde, **4c**, **4e** ve **4f** bileşikleri en yüksek süperoksit radikali giderme aktivitesi göstermektedir. Hatta bu bileşiklerin süperoksit temizleme aktivitesi, standart antioksidan olarak kullandığımız α-tokoferol bileşiğinden de yüksektir. Diğer taraftan **4b** bileşiği en düşük süperoksit temizleme aktivitesi göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız standart ve test bileşiklerinin süperoksit radikali temizleme aktivitelerine göre sıralanmaları şu şekildedir: BHT>Askorbik asit>4c>4e>4f>α-tokopferol>4d>4a>4h>4g>4b (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Test bileşikleri ve standart antioksidanların süperoksit giderme aktiviteleri

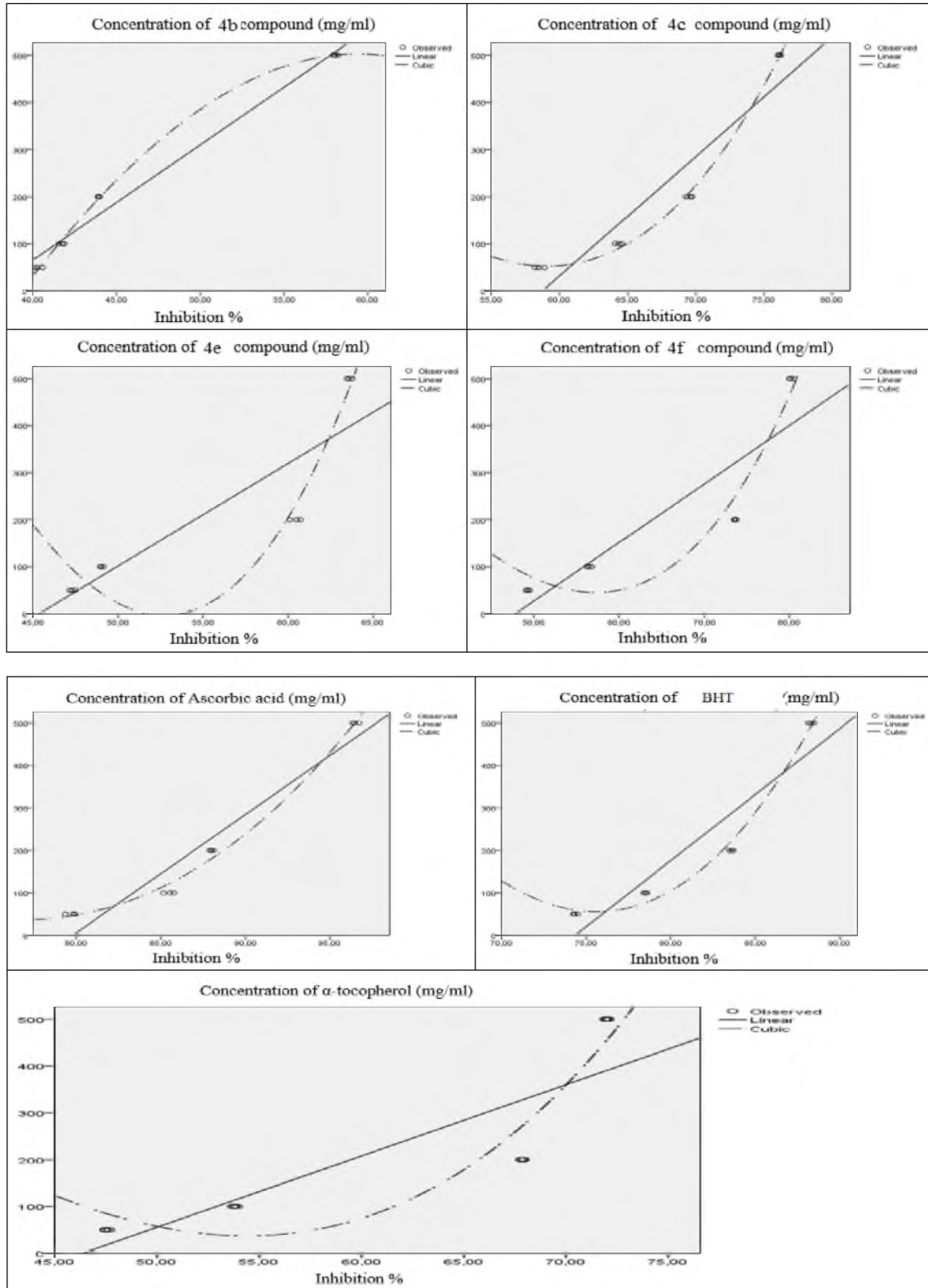
Test bileşikleri	(50 µg/mL)	(100 µg/mL)	(200 µg/mL)	(500 µg/mL)	IC ₅₀
Askorbik asid *	54,31 ± 3,45	78,39 ± 4,12	83,45 ± 4,30	88,13 ± 5,50	44,43 ± 20,6*
BHT *	39,36 ± 4,12	85,54 ± 3,20	87,92 ± 7,11	96,33 ± 3,25	39,70 ± 17,8*
α-tokoferol *	57,48 ± 5,87	53,72 ± 3,41	67,78 ± 2,56	71,91 ± 2,30	57,40 ± 64,1*
4g **	43,78 ± 4,12	58,12 ± 3,72	59,99 ± 5,13	65,11 ± 3,41	95,48 ± 120,6**
4h *	45,12 ± 4,56	57,04 ± 3,80	60,15 ± 2,20	75,28 ± 2,12	66,44 ± 24,3*
4d *	40,49 ± 3,30	52,98 ± 4,10	66,81 ± 3,15	73,12 ± 3,47	61,86 ± 49,4*
4a *	38,48 ± 3,56	51,06 ± 4,85	58,41 ± 3,22	62,86 ± 2,98	62,10 ± 47,9*
4b *	40,11 ± 4,12	41,58 ± 6,40	43,89 ± 5,15	57,95 ± 3,71	385,06 ± 8,3*
4c *	48,23 ± 10,01	64,11 ± 2,98	69,26 ± 9,12	76,03 ± 6,14	51,62 ± 9,1*
4e *	47,15 ± 7,51	48,95 ± 8,12	60,09 ± 3,30	63,47 ± 6,45	52,41 ± 48,1*
4f *	49,11 ± 4,12	56,23 ± 5,10	73,49 ± 3,45	80,01 ± 4,11	55,91 ± 48,9*

Linear Regresyon (*Kübik Model **Linear Model)

Fosfinik asit türevleri ve standartlardan elde edilen veriler, konsantrasyona karşılık % inhibisyon değerleri olarak grafik haline getirilmiştir. Grafiklere bakıldığında süperoksit radikali giderme aktivitesinin artan konsantrasyonla değişkenlik gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin süperoksit giderme aktiviteleri



Şekil 4.8. (devamı) Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin süperoksit giderme aktiviteleri

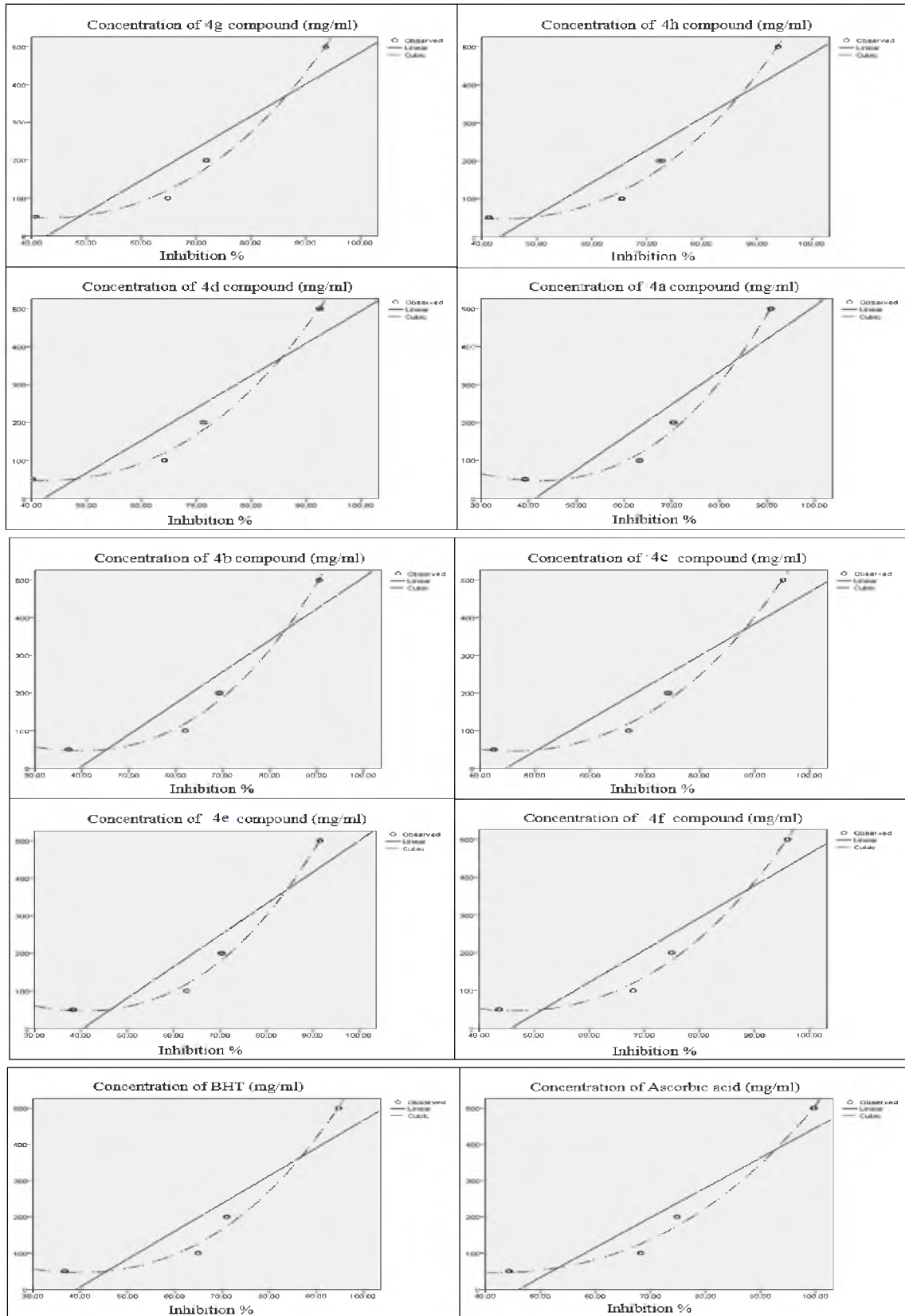
4.2.4. Hidroksil Radikali Yakalama Aktivitesi

Bu yöntemde deoksiriboz degradasyonu ile oluşan hidroksil (\bullet OH) radikallerinin yakalanması prensibine dayalı bir metod kullanılmıştır. Hidroksil radikali yakalama aktivitesi, 50-500 μ g/mL derişimlerdeki her bir fosfinik asit bileşiminin ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen α -tokoferol ve BHT örneklerinin 532 nm'deki absorbansları alınarak hesaplanmıştır. Denediğimiz her bir fosfinik asit bileşiminin hidroksil radikali süpürme aktiviteleri birbirine ve BHT, askorbik asit standartlarına oldukça benzerdir. Ayrıca her bir fosfinik asit bileşiminin, standart antioksidan maddeler kadar yüksek hidroksil radikali temizleme aktivitesi göstermiştir. Denediğimiz tüm bileşikler içerisinde, **4c** ve **4f** bileşikleri en yüksek hidroksil radikali (\bullet OH) giderme aktivitesi göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız standart ve test bileşiklerinin hidroksil radikali temizleme aktivitelerine göre sıralanmaları şu şekildedir: Askorbik asit>BHT>4c>4f>4h>4g>4d>4a>4e>4b (Tablo 4.6). Ayrıca fosfinik asit türevleri ve standartlardan elde edilen veriler, konsantrasyona karşılık % inhibisyon değerleri olarak grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.9).

Tablo 4.6. Test bileşikleri ve standart antioksidanların hidroksil radikali yakalama aktiviteleri

Test bileşikleri	(50 μ g/mL)	(100 μ g/mL)	(200 μ g/mL)	(500 μ g/mL)	IC ₅₀
Askorbik asid*	44,14 \pm 7,3	68,11 \pm 8,12	74,79 \pm 7,54	99,58 \pm 8,11	32,90 \pm 20,63*
BHT*	36,79 \pm 3,4	64,87 \pm 5,45	70,96 \pm 6,41	94,63 \pm 6,87	38,27 \pm 21,36*
4g*	40,54 \pm 10,2	64,82 \pm 9,16	71,75 \pm 9,63	93,58 \pm 9,12	54,66 \pm 16,87*
4h*	41,08 \pm 9,1	65,24 \pm 7,56	72,13 \pm 7,85	93,75 \pm 8,12	52,45 \pm 16,28*
4d*	40,04 \pm 8,1	64,06 \pm 7,12	71,06 \pm 8,11	92,22 \pm 8,11	54,85 \pm 16,14*
4a*	39,12 \pm 8,2	63,12 \pm 5,69	70,18 \pm 6,48	90,78 \pm 5,74	55,25 \pm 15,06*
4b*	37,01 \pm 11,1	61,89 \pm 10,28	69,01 \pm 10,71	90,42 \pm 10,20	60,56 \pm 15,54*
4c*	42,28 \pm 3,8	66,98 \pm 4,58	74,08 \pm 4,41	95,04 \pm 3,98	48,15 \pm 15,31*
4e*	38,01 \pm 8,3	62,69 \pm 7,12	70,12 \pm 7,56	91,42 \pm 8,11	58,11 \pm 14,79*
4f*	43,51 \pm 2,9	67,89 \pm 3,84	74,90 \pm 3,12	95,92 \pm 3,08	48,40 \pm 15,94*

Linear regresyon (Kübik model)



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin hidroksil radikali giderme aktiviteleri

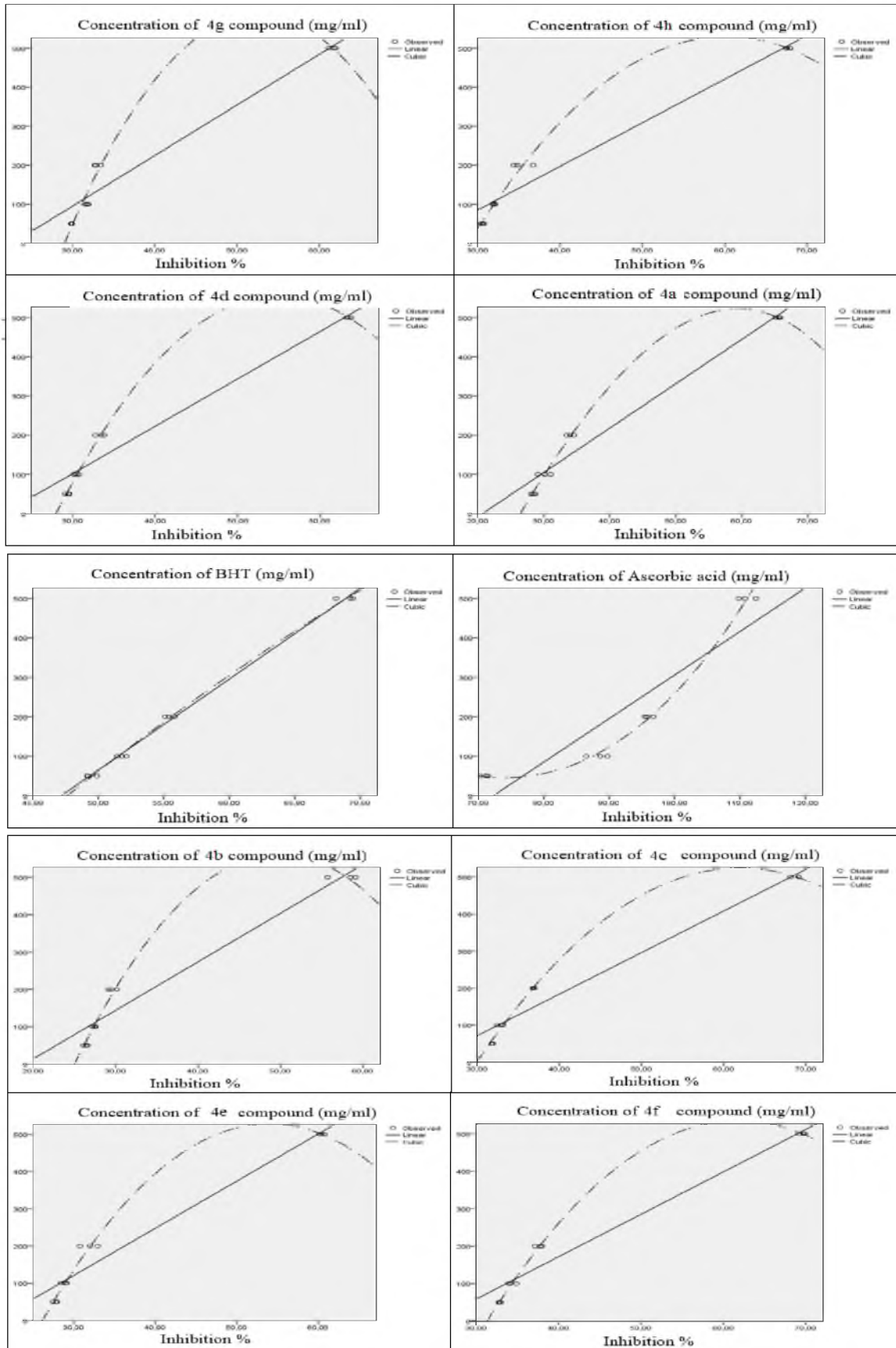
4.2.5. DPPH Süpürme Aktivitesi

Bir maddenin antioksidan özelliklerini değerlendirmek için, DPPH radikalini süpürme aktivitesine bakılması genellikle tercih edilen önemli bir metoddur (Orhan et al. 2011). Bütün örneklerin stok çözeltileri hazırlanarak, ardışık seyreltme yoluyla farklı derişimlerdeki örneklerinin DPPH çözeltilisinin rengini açma kapasiteleri, % inhibisyon olarak belirlenmiştir. Örnek derişimlerine karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 4.6 ve tüm veriler Tablo 4.6 da gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır. Bileşiklerin DPPH radikalini temizleme özellikleri birbirinden ve standartlardan çok farklı ve değişken bulunmuştur. **4a** bileşiği, en düşük DPPH temizleme aktivitesi gösterirken, **4e** ve **4g** bileşikleri çok yüksek aktivite göstermiştir. Hatta **4a**, **4g**, **4h** ve **4b** fosfinik asit bileşiklerinin standart olarak kullandığımız BHT çözeltilisinden bile daha yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. DPPH metoduna göre en yüksek antioksidan özellik gösteren askorbik asit standardı olmuştur. İlginç olarak diğer 4 yöntemde de en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülen **4b** bileşiğinin, bu yöntemde BHT standardından bile yüksek miktarda aktiviteye sahip olduuu görülmüştür. Bileşikler için DPPH radikalini temizleme aktivitesi sırasıyla şu şekilde tespit edilmiştir: Askorbik Asit>4e>4g>4h>4b>BHT>4c>4f>4d>4a (Tablo 4.7 ve Şekil 4.10).

Tablo 4.7. Test bileşikleri ve standart antioksidanların DPPH süpürme aktiviteleri

<i>Test bileşikleri</i>	<i>(50 µg/mL)</i>	<i>(100 µg/mL)</i>	<i>(200 µg/mL)</i>	<i>(500 µg/mL)</i>	<i>IC₅₀</i>
Askorbik asid	71,12 ± 20,12	86,49 ± 21,45	95,45 ± 19,12	112,45 ± 15,23	19,238 ± 19,25*
BHT*	45,89 ± 19,54	52,12 ± 18,56	55,12 ± 17,54	69,25 ± 16,40	75,35 ± 11,04*
4g*	29,89 ± 20,14	31,54 ± 21,84	32,89 ± 20,85	61,12 ± 19,13	38,59 ± 21,33*
4h*	30,45 ± 10,12	31,89 ± 9,65	34,45 ± 8,45	67,45 ± 7,14	43,73 ± 16,25*
4d*	29,11 ± 20,14	30,12 ± 19,12	32,78 ± 18,71	63,15 ± 16,40	476,45 ± 11,81*
4a*	28,10 ± 21,42	29,15 ± 22,31	33,45 ± 20,14	65,15 ± 20,10	483,02 ± 14,28*
4b*	26,11 ± 18,74	27,17 ± 16,45	29,12 ± 16,82	58,49 ± 13,24	61,20 ± 18,71*
4c*	31,78 ± 21,35	32,45 ± 15,54	36,75 ± 16,52	69,11 ± 13,46	420,70 ± 9,99*
4e*	27,45 ± 9,12	28,95 ± 8,95	30,79 ± 9,15	60,11 ± 8,11	37,03 ± 18,07*
4f*	32,76 ± 9,87	33,89 ± 7,56	37,15 ± 9,30	69,72 ± 6,43	424,22 ± 9,97*

Linear Regresyon (Kübik Model)



Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ve standart çözeltilerin DPPH giderme aktiviteleri

4.3. *In Vitro* Antitümör Özelliklerin Değerlendirilmesi

4.3.1. MCF-7 ve HUVEC Hücrelerinde Canlılık Değerleri

Test edilen bileşiklerin (4a–4h) sitotoksitesi, MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarında XTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. 4c, 4e ve 4f bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevleri, MCF-7 kanser hücrelerinde hemen hemen tüm konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat periyotlarında hücre proliferasyonunu azaltmıştır. Ayrıca yeni sentezlenen 4c ve 4f bileşiklerinin doza ve zamana bağlı olarak MCF-7 kanser hücrelerinde proliferasyonu daha etkili olarak inhibe ettiği görülmektedir ($P < 0.01$; Tablo 4.8; 4.9) 4e bileşiği ise 24 saat inkübasyon süresinde daha etkili sonuçlar vermiştir ($P < 0.05$). Buna rağmen diğer bileşiklerin bu hücre hattında düşük bile olsa dikkate değer oranlarda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.8, 4.9 ve Şekil 4.11). Buna ilaveten, sentezlenen 8 sonuç bileşiğinin normal fibroblast hücrelerinden oluşan HUVEC hücre hattında sadece en yüksek konsantrasyonlarda (10^{-3} - 10^{-4} M) hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. 4c ve 4e bileşiklerinin HUVEC hücre hatları üzerinde de 24 saatlik inkübasyon süresince, diğer kimyasallara nazaran daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.10, 4.11 ve Şekil 4.12). İnkübasyon süresi arttığı zaman hücrelerin etken madde ile daha fazla etkileşim halinde kaldıkları göz önünde tutulursa, bileşiğin anti-kanser aktivitesinin artması beklenmektedir. Nitekim 24 saatlik inkübasyon sonucunda görülen toksik etki ile karşılaştırıldığında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda bileşiklerin uygulanmış olduğu bütün konsantrasyonlarda hücreler üzerindeki anti-kanser aktivitesinin mükemmel bir düzeyde arttığı bulunmuştur. Test maddeleriyle muamele edilmiş MCF-7 ve HUVEC hücre kültürlerinin canlılık oranlarına ait sonuçlar karşılaştırmalı olarak da grafik halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.8. Test bileşiklerinin MCF-7 hücre kültürlerinde 24 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

MCF7 - 24 Saat								
Doz	4c	4e	4f	4g	4h	4d	4a	4b
0=I	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3	100,0±12,3
-9=II	78,6±5,8	74,1±1,9	76,2±0,5	139,7±0,5	123,4±0,1	178,8±0,7	178,3±6,7	137,5±4,0
-8=III	72,6±3,5	73,0±0,3	75,6±0,6	133,2±8,7	106,6±5,2	168,7±3,6	145,0±1,2	133,3±0,3
-7=IV	64,8±0,4	63,4±4,7	72,0±0,4	122,7±0,8	76,3±1,9	138,8±4,4	130,9±2,5	122,3±0,1
-6=V	63,5±3,1	63,4±1,1	58,4±3,0	119,5±5,9	64,8±1,5	130,6±14,6	127,5±4,1	118,4±0,0
-5=VI	45,2±3,3	61,2±5,5	57,7±2,6	113,7±3,3	49,6±11,8	127,7±1,2	123,3±4,3	112,4±0,1
-4=VII	32,7±11,5	50,1±1,5	56,7±1,0	104,5±0,8	47,4±0,1	115,3±2,0	117,2±0,2	98,1±1,5
-3=VIII	17,9±11,9	31,1±0,3	33,5±0,1	95,7±0,3	38,2±3,0	65,7±0,4	80,1±0,6	90,1±0,2
P değeri	<0,001	0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,038	0,001
I-VIII	0,005	0,010	<0,001	<0,001	0,010	0,068	0,254	0,737
I-VII	<0,001	0,091	<0,001	<0,001	0,021	0,425	0,343	1,000
I-VI	<0,001	0,033	<0,001	<0,001	0,012	0,117	0,977	0,579
I-V	<0,001	0,057	<0,001	<0,001	0,062	0,164	0,108	0,300
I-IV	0,060	0,043	<0,001	<0,001	0,170	0,037	0,085	0,198
I-III	0,097	0,126	0,671	0,002	0,955	0,006	0,032	0,074
I-II	0,806	0,136	1,000	0,489	0,179	0,006	0,002	0,043

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) - (Method:Bootstrap) Post Hoc Test: Dunnett - Games Howell Bütün veriler Ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Test bileşiklerinin MCF-7 hücre kültürlerinde 48 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

MCF7 - 48 Saat								
Doz	4c	4e	4f	4g	4h	4d	4a	4b
0=I	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8	100,0±12,8
-9=II	49,6±0,7	45,8±2,4	41,9±4,6	63,0±0,7	47,3±3,2	112,9±3,8	74,2±2,7	124,1±0,1
-8=III	39,4±6,1	49,4±4,4	34,5±8,8	61,9±0,2	43,3±0,7	92,1±4,3	65,1±0,3	115,9±1,3
-7=IV	39,5±9,6	51,3±1,2	29,9±0,3	57,2±19,6	42,6±6,4	73,0±1,3	59,5±0,3	110,0±0,4
-6=V	26,0±2,0	59,3±3,8	25,0±1,6	44,5±7,8	42,5±2,2	56,6±6,6	59,5±0,4	85,8±4,3
-5=VI	24,4±0,8	64,9±0,1	19,6±1,6	40,2±0,6	33,6±1,4	53,1±5,0	48,9±2,1	55,7±2,6
-4=VII	9,5±6,4	66,4±0,4	14,0±1,0	18,6±1,8	30,4±0,1	49,2±0,1	39,0±2,2	49,7±7,7
-3=VIII	8,3±0,1	30,2±0,9	12,2±1,2	42,4±0,3	19,5±2,6	22,6±0,1	30,2±0,0	60,2±0,0
P değeri	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
I-VIII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-V	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
I-IV	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,019
I-III	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,066	<0,001	0,001
I-II	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001



Şekil 4.11. Test bileşikleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin doza ve inkübasyon süresine göre canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri

Tablo 4.10. Test bileşiklerinin HUVEC hücre kültürlerinde 24 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

Doz	Huvec - 24 saat							
	4c	4e	4f	4g	4h	4d	4a	4b
0=I	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1	100,0±4,1
-9=II	78,7±13,1	63,0±3,8	84,2±1,0	64,9±4,2	61,2±0,4	120,8±2,6	97,9±12,5	101,4±7,0
-8=III	75,7±1,7	67,5±2,4	79,2±3,1	68,2±1,3	57,1±0,5	106,1±1,6	84,6±3,6	93,2±3,8
-7=IV	69,7±3,1	67,5±7,0	78,3±0,1	70,4±4,8	55,4±9,7	99,2±3,4	78,0±0,3	88,9±2,2
-6=V	67,0±0,6	68,7±8,2	76,9±0,7	78,7±7,2	50,7±8,1	92,5±2,6	71,9±0,6	76,5±7,8
-5=VI	65,1±0,9	69,1±6,6	70,1±1,6	80,1±0,3	46,2±2,4	90,0±1,6	66,7±2,2	74,7±5,7
-4=VII	57,1±1,6	73,1±1,7	67,2±2,0	82,6±1,9	45,0±2,3	72,8±5,0	59,6±0,2	66,3±2,8
-3=VIII	55,2±1,3	73,3±2,5	64,0±2,5	84,6±2,2	31,2±3,8	64,4±1,7	46,0±1,5	64,3±4,3
P değeri	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VIII	0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VII	<0,001	0,002	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
I-VI	0,002	0,005	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
I-V	0,003	0,014	0,008	<0,001	0,002	<0,001	0,005	<0,001
I-IV	<0,001	0,006	0,011	<0,001	0,008	<0,001	0,011	0,005
I-III	0,003	<0,001	0,003	0,240	0,001	<0,001	0,015	0,071
I-II	0,246	<0,001	0,024	0,741	0,002	<0,001	1,000	0,693

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe) - (Method:Bootsrap) Post Hoc Test: Dunnett - Games Howell Bütün veriler Ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Test bileşiklerinin HUVEC hücre kültürlerinde 48 saat uygulanmasıyla elde edilen canlılık değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

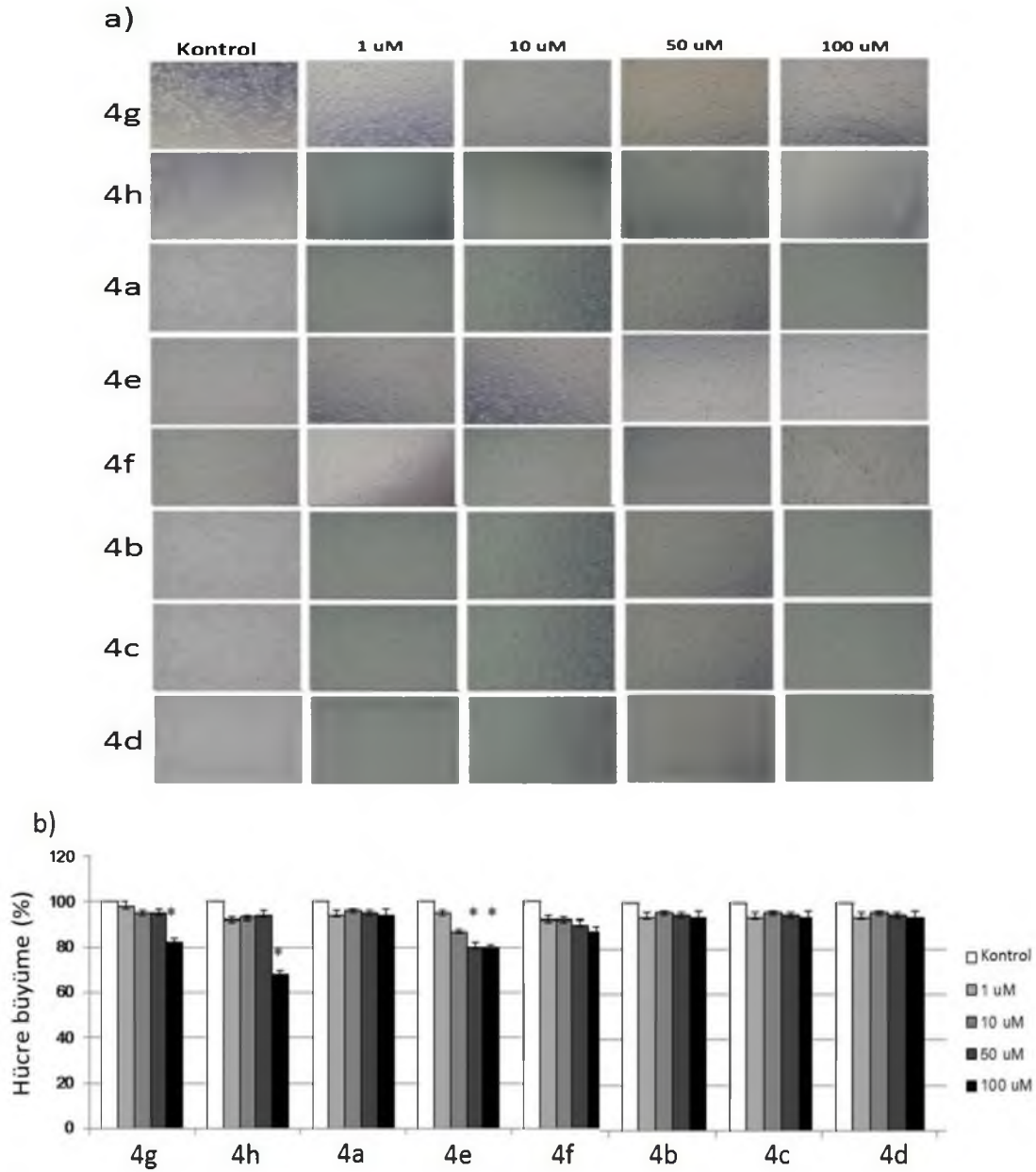
Doz	Huvec - 48 saat							
	4c	4e	4f	4g	4h	4d	4a	4b
0=I	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8	100,0±10,8
-9=II	94,4±3,6	89,6±0,1	120,4±2,3	64,6±2,2	51,9±2,5	68,0±2,3	79,6±9,0	106,0±19,4
-8=III	89,7±0,5	85,9±4,4	102,9±18,8	65,2±0,4	45,5±1,4	59,6±0,5	63,6±7,0	79,2±6,3
-7=IV	87,1±0,8	86,3±13,0	95,3±2,0	65,8±0,3	43,8±1,1	58,1±0,0	65,0±8,0	76,2±0,3
-6=V	80,4±0,0	75,4±0,5	76,5±0,3	68,7±2,1	41,3±1,6	56,2±0,9	60,2±0,3	68,1±0,2
-5=VI	78,1±0,4	75,2±1,0	75,1±0,4	69,8±1,2	30,5±4,5	53,6±0,3	52,5±0,3	57,1±2,2
-4=VII	76,0±1,4	76,2±0,7	67,1±0,3	77,5±0,3	23,4±3,0	41,1±0,2	45,4±1,2	50,1±1,8
-3=VIII	68,9±1,2	75,7±0,6	58,4±0,5	78,0±0,3	17,2±0,4	39,9±0,0	36,4±0,9	45,9±0,7
P değeri	0,004	0,007	0,001	0,003	<0,001	0,001	<0,001	0,009
I-VIII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VII	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-VI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I-V	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
I-IV	<0,001	0,005	0,399	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007
I-III	0,002	0,004	0,600	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,016
I-II	0,066	0,026	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,465



Şekil 4.12. Test bileşikleriyle muamele edilmiş HUVEC hücrelerinin doza ve inkübasyon süresine göre canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri

4.3.2. Test Bileşiklerinin Apoptotik Etkinlikleri

Farklı konsantrasyonlarda bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşikleriyle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin morfolojik yapıları ve büyümeleri Zeiss Axio inverted mikroskop (10x) altında görüntülenmiştir. Morfolojik değişiklikler apoptotik hücre ölümlerine işaret edebilmektedir. Kimyasallar tarafından etkilenen hücreler, normal birbirlerine yapışık hücre şekillerini kaybetmekte ve birkaç saat içinde birbirlerinden ayrılmış yuvarlak hücrelere dönüşmektedir. Bu şekildeki ayrık hücreler plate yüzeyinden kopmaktadır. Çalışmamızda 24 saat boyunca 1-100 μ M bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşikleri uygulanmış meme kanseri hücre hatlarında meydana gelen morfolojik değişimler 10x objektif büyütmesiyle inverted mikroskop altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiş ve büyüme grafikleri hazırlanmıştır (Şekil 4.13). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman **4e**, **4h** ve **4g** kimyasallarının 100 μ M konsantrasyonda uygulandığı gruplarda hücre büyüme yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmiştir ($p < 0.05$; Şekil 4.13). Ayrıca **4e** kimyasalının 50 μ M konsantrasyonda uygulandığı gruptaki hücrelerde de büyüme yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$; Şekil 4.14). Bu gruplarda gözlenen hücrelerin birbirinden ayrılması, şekillerinin değişmesi ve yuvarlak, buruşuk bağımsız hücreler haline dönüşmeleri, apoptoz görünümü olarak kabul edilmiştir. Diğer fosfinik asit kimyasallarında ve **4e**, **4h**, **4g** kimyasallarının diğer konsantrasyonlarında, kontrol grubu sonuçlarına göre herhangi bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$; Şekil 4.13).

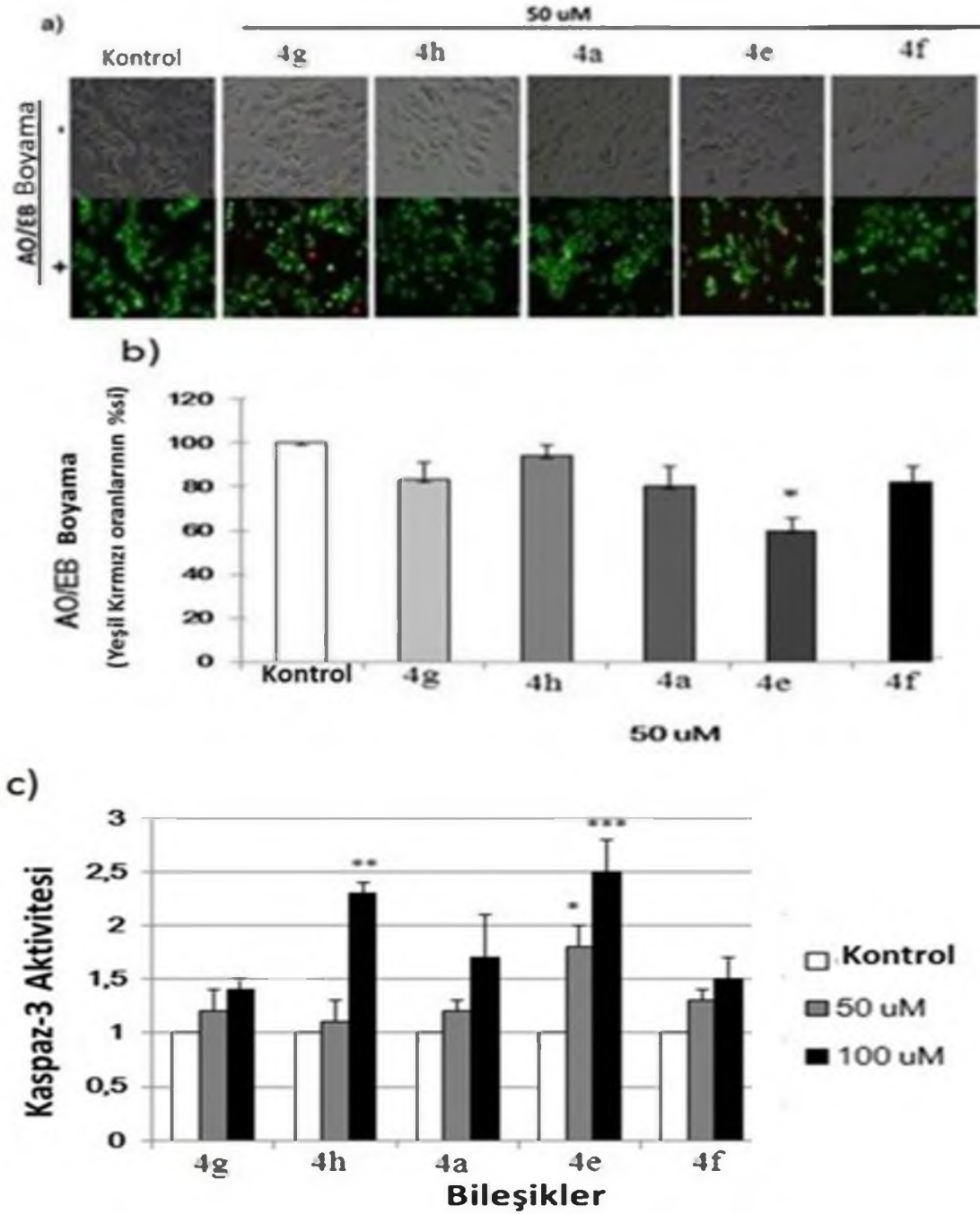


Şekil 4.13. a) Farklı konsantrasyonlarda (1-100 μM) bileşikleriyle (**4a-h**) inkübe edilmiş, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mikroskopik büyüme görüntüleri b) Farklı konsantrasyonlarda (1-100 μM) bileşikleriyle (**4a-h**) 24 saat boyunca inkübe edilmiş MCF-7 hücrelerinin büyüme yüzdeleri

Apoptoz, organizmanın gelişimi, hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik mekanizmaların sağlanması amacıyla doğal süreçlerde fizyolojik olarak meydana gelir. Ayrıca hücreler, çeşitli hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde de koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar (Vaux and Flavell 2000; Elmore 2007; Güleş ve Eren 2008). Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile

belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücrelerde görünür hale getirilerek belirlenmesi gerekir. Bu amaçla çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. (Güleş ve Eren 2008). Diğer taraftan, kanser terapilerine cevap oluşumunda hücre ölümünün kontrol edildiği en etkili temel mekanizmalardan birisi de apoptozdur. Bu çalışmada bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin çeşitli hücrelerde apoptoz gelişimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla MCF-7 kanser hücrelerine fosfinik asit bileşiklerinin uygulanmasıyla hücrelerde gözlenen apoptoz yanıtının nasıl olduğu acridine orange ve ethidium bromide boyaması kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca hücrelerin apoptotik indeksinin belirlenmesi için AO/EB boyamalarının yanında ticari “Kaspaz-3 kolorimetrik analiz kitleri” kullanılarak Kaspaz-3 seviyesine de bakılmıştır. Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu, p-nitroanilin (pNA) ile konjuge edilmiş kaspaz 3 spesifik peptid ile belirlenmiştir. Peptidin kaspaz 3 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak okunarak, absorbans değerlerine göre kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

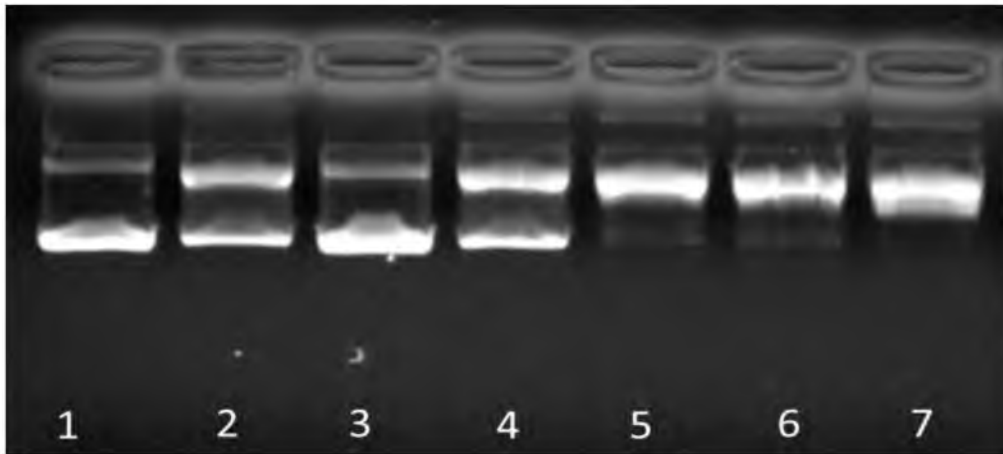
AO/EB sonuçlarına göre, sadece **4e** bileşiğinin 50 μ M konsantrasyonunda MCF-7 hücrelerindeki çekirdek kondensasyonunu azalttığı, çekirdek bozunumlarını başlattığı ve fragmentasyonun (parçalanmanın) görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.14). Ayrıca **4e** ve **4h** bileşiklerinin, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulandıklarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman kaspaz- 3 aktivitesinde artışlara sebep olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Diğer bileşikler için Kaspaz-3 aktivitesi üzerinde önemli ve anlamlı bir istatistiksel farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.14).



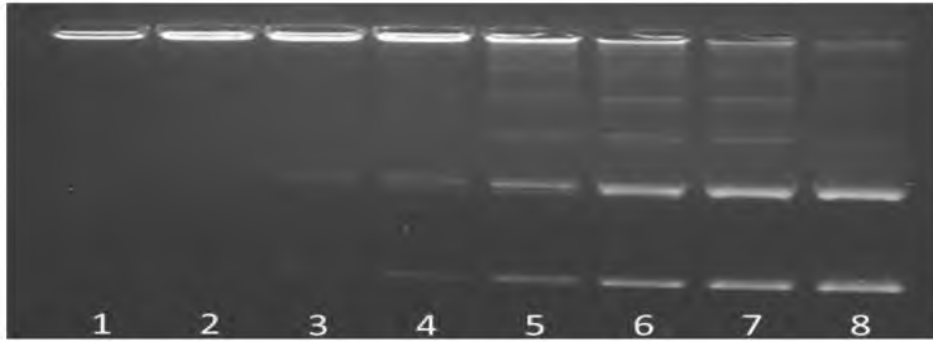
Şekil 4.14. a) AO/EB boyama mikroskop görüntüsü b) 50 µM konsantrasyonlu sentezlenen fosfinik asitlerle 24 sa inkübe edilmiş MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında AO/EB boyama oranları c) 50 µM-100 µM konsantrasyonlu sentezlenen fosfinik asitlerle 36 sa inkübe edilmiş MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında Kaspaz-3 aktivitesi (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 her bir bileşik kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır)

4.4. Topoizomeraz Enzimi Aktivite Değerleri

Sentezlenen bileşiklerin (**4a-h**) insan tip I ve II topoizomeraz enzimlerinin aktivitesini inhibe edip etmediği belirlenmiştir. Topoizomeraz I ve II enzimlerinin öncelikle gerçek ünite değerini bulmak için aktivite testleri gerçekleştirilmiş olup enzimlerin bir üniteye karşılık gelen konsantrasyonları bulunmuştur. Topoizomeraz I ve II aktiviteleri için sırasıyla Şekil 4.15 ve 4.16 elde edilmiştir. Her uygulama standart reaksiyon kompozisyonunda 0,5µg pBR322 ve 1:12 oranında seyreltilmiş stok topoizomeraz I enziminden sırasıyla 0; 1; 1.2; 1.5; 1.7; 2; 2.4 µL alınarak 37 °C'de 30 dk süre ile inkübasyonu takiben % 1'lik agaroz jeli içerisinde ayrıştırılmış ve jel Etidyum-Bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir. Topoizomeraz I stok enziminin asgari aktivitesinin 5 u/µL, topoizomeraz II' nin ise 10 u/µL değerinde olduğu belirlenmiştir.



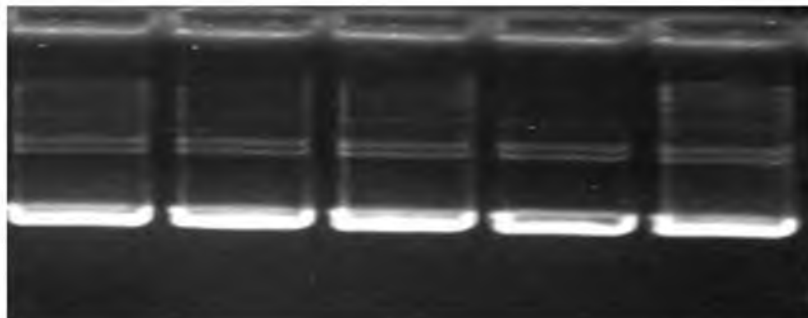
Şekil 4.15. İnsan topoizomeraz I enzimi aktivite testi. Her uygulama standart reaksiyon kompozisyonunda 0,5µg pBR322 ve 1:12 oranında seyreltilmiş stok topoizomeraz I enziminden 0 (uygulama 1), 1 (uygulama 2), 1.2 (uygulama 3), 1.5 (uygulama 4), 1.7 (uygulama 5), 2 (uygulama 6), 2.4 (uygulama 7) µL alınarak 37 °C'de 30 dk süre ile inkübasyonu takiben % 1'lik agaroz jeli içerisinde ayrıştırılmış ve jel Etidyum-Bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir



Şekil 4.16. İnsan topoizomeraz II enziminin asgari dekatasyon aktivitesini belirlemeye yönelik aktivite testi. Enzimin, 0 (uygulama 1), 1:120 seyreltme ile 2 (uygulama 2), 1:40 seyreltme ile sırasıyla 1 (uygulama 3), 1.3 (uygulama 4), 1.6 (uygulama 5), 2 (uygulama 6), 2.7 (uygulama 7), 4 (uygulama 8) μL alınarak 37 °C'de 30 dk süre ile inkübasyonu 37 °C'de 30 dk inkübasyon süresinde gösterdiği asgari dekatasyon aktivitesi. 0,5 $\mu\text{g/mL}$ Etidyum-Bromid içeren % 1' lik agaroz jeli içerisinde ayrıştırılmış ve jel Etidyum-Bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir

4.4.1. İnterkalasyon Analizi

Sentezlenen bileşiklerinin (**4a-h**) DNA interkalasyonu yapmadığı belirlenmiştir. Enzim yokluğunda, DNA ile birlikte tampon içerisinde 1mM konsantrasyondaki bileşiklerin varlığında reaksiyon ürünleri 37 °C'de, 30 dk süre ile inkübasyonu takiben, % 1'lik TAE agaroz jeli içerisinde ayrıştırılmış ve jel Et-Br ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir (Şekil 4.17).

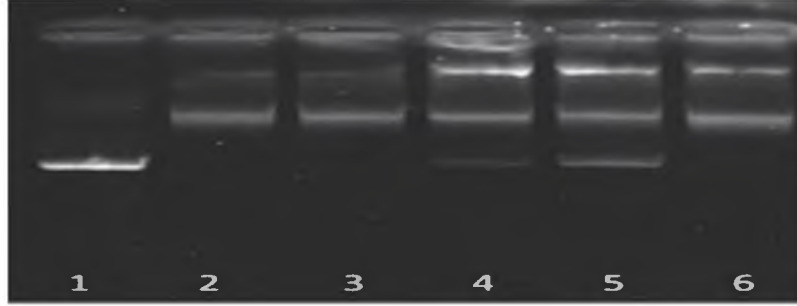


Şekil 4.17. Bileşiklerin interkalatif özelliklerine belirlemeye yönelik interkalasyon analizi

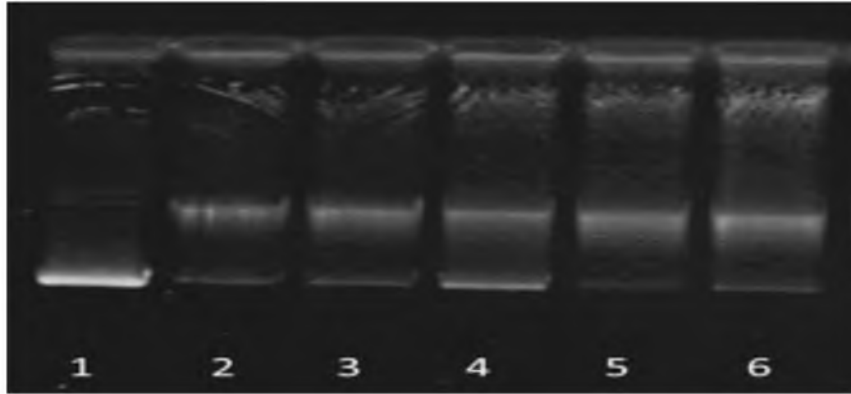
4.4.2. Süpersarmal DNA Topoizomeraz I Relaksasyon Ölçümleri

Topoizomeraz I relaksasyon analizine göre **4a-h** bileşiklerinin reaksiyon içerisinde 1mM konsantrasyonda topoizomeraz I enzimi üzerinde belirgin bir inhibisyon etkisi

görülmemektedir. Bununla birlikte **4f** ve **4h**'in çok hafif bir inhibisyon etkisi olduğu kabul edilebilir fakat anlamlı kabul edilebilmesi açısından bu bileşikler daha yüksek konsantrasyonda çalışılmamıştır (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).



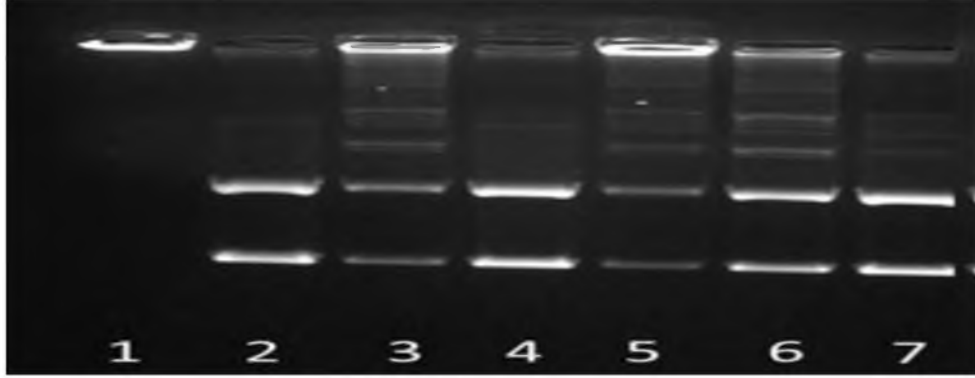
Şekil 4.18. Bileşiklerin topoizomeraz I'in aktivitesi üzerindeki etkisi. Sırasıyla 1: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA, 2: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I, 3: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I varlığında **4e**, 4: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I varlığında **4f**, 5: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I varlığında **4h**, 6: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I varlığında **4g** etkinliği



Şekil 4.19. Bileşiklerin topoizomeraz I'in aktivitesi üzerindeki etkisi. Sırasıyla 1: 0,5 µg pBR322 süpersarmal DNA ve 2: 0,5 µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I etkinliğini göstermektedir. 3-6. Jel paternleri: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomeraz I varlığında sırasıyla **4e**, **4f**, **4h**, **4a** etkinliğini göstermektedir

4.4.3. Topoizomeraz II Dekatenasyon Ölçümleri

Kinetoplast DNA (k-DNA) substratları ile yapılan topoizomeraz II dekatasyon testinin sonuçları Şekil 4.20'de verilmektedir. Bu deney sonucunda bileşiklerin topoizomeraz II aktivitesini yüzde yüz olarak inhibe etmediği görülmektedir. Bununla birlikte **4e** ve **4h**'in yüzde elliye yakın, **4a**'nın ise hafif olarak inhibisyon oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.20. Bileşiklerin topoizomerez II'in aktivitesi üzerindeki etkisi. Sırasıyla 1: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 2: 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomerez I etkinliğini göstermektedir. 3-7 jel paternleri ise, 0,5µg pBR322 süpersarmal DNA ve 1 ünite topoizomerez II varlığında sırasıyla **4e**, **4f**, **4h**, **4a**, **4g** etkinliğini göstermektedir

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Sentezlenen 8 farklı bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiği, 6 farklı patojene karşı antimikrobiyal aktiviteleri bakımından test edilmiş olup bu kimyasalların dendiğimiz patojenlere karşı herhangi bir antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir.

4.6. MCF-7 Hücre Kültürlerinde Antioksidan Aktivite Ölçümleri

4.6.1. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Yeni sentezlenen 8 farklı fosfinik asit bileşiklerinin (**4a-h**) farklı konsantrasyonlarda (1-50 µM), MCF-7 kanser hücre hatlarına uygulanmasıyla birlikte, genel olarak hücrelerdeki MDA değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel farklılıklar bulunmamıştır. Sadece **4g** bileşiğinde 10 µM ve 50 µM konsantrasyon gruplarında kontrol grubuna göre bir miktar fazla artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). **4c** bileşiğinde ise tüm doz gruplarında elde edilen MDA değerleri, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; diğer tüm bileşiklerde hemen hemen tüm doz gruplarında benzer değerler elde edilmiştir (Tablo 4.12; Şekil 4.21).

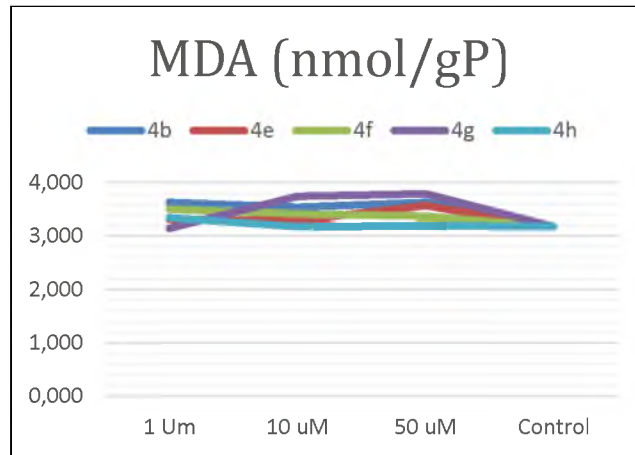
Tablo 4.12. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında MDA düzeyleri

Fosfinik asit bileşikleri	MDA Değerleri (nmol/gP)			
	Uygulanan dozlar			
	Ortalama±Std. Hata 1µM	Ortalama±Std. Hata 10µM	Ortalama±Std. Hata 50µM	Kontrol
4a	3,632±0,142	3,542±0,222	3,634±0,033	3,173±0,163
4b	3,032±0,112	3,242±0,192	3,334±0,093	3,173±0,163
4c*	3,140±0,074 ^{a*}	2,867±0,076 ^{b*}	2,893±0,136 ^{b*}	3,173±0,163 ^a
4d	3,332±0,122	3,242±0,202	3,334±0,013	3,173±0,163
4e	3,307±0,119	3,290±0,143	3,573±0,195	3,173±0,163
4f	3,497±0,080	3,411±0,221	3,336±0,095	3,173±0,163
4g**	3,136±0,070 ^a	3,738±0,127 ^b	3,790±0,123 ^b	3,173±0,163 ^a
4h	3,340±0,174	3,167±0,076	3,193±0,036	3,173±0,163

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0,05).

* işaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre MDA seviyesinde azalma görülmüştür.

** işaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre MDA seviyesinde artma görülmüştür.



Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan hücre kültürlerinde MDA düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi

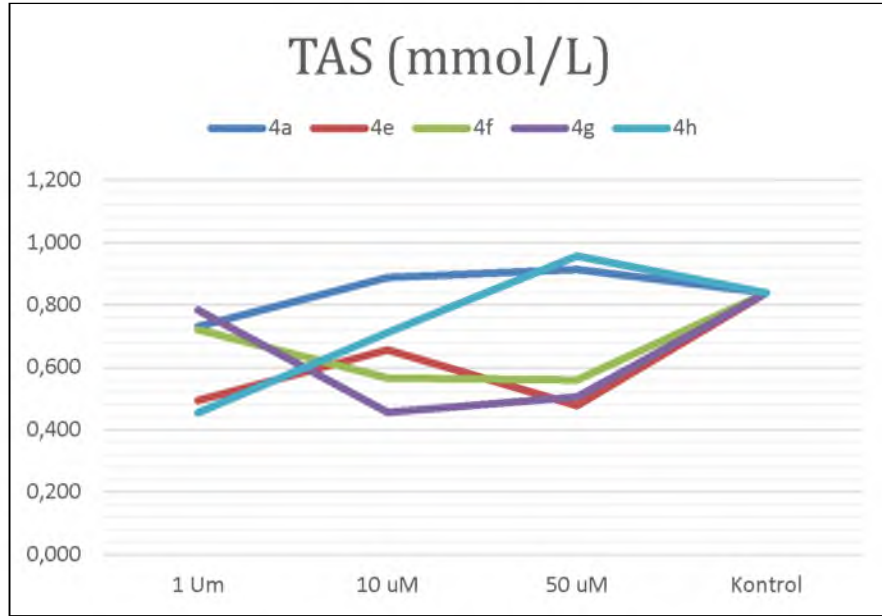
4.6.2. Toplam Antioksidan Seviyenin (TAS) Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışma sonucunda saptanan verilere göre, farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşiği (**4a-h**) uygulanan MCF-7 hücre hatlarında, TAS değerlerinde kontrol grubu verilerine göre bazı bileşiklerde istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) değişiklikler tespit edilmiştir. **4a**, **4b**, **4d** bileşiklerinin uygulandıkları bütün konsantrasyon gruplarından elde edilen verilere göre TAS değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ($P>0.05$) gözlenmiştir. **4c**, **4e**, **4f** ve **4h** bileşiklerinin uygulandıkları tüm konsantrasyon gruplarındaki TAS değerleri kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte uygulanan bileşiğin dozuna göre artış göstermiştir. **4a** ve **4g** bileşiklerinde ise uygulanan doz miktarı arttıkça elde edilen TAS değerinde düşme olduğu görülmektedir (Tablo 4.13; Şekil 4.22).

Tablo 4.13. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında TAS düzeyleri

TAS Değerleri (mmol/L)	Uygulanan dozlar			
	Ortalama±Std. Hata 1µM	Ortalama±Std. Hata 10µM	Ortalama±Std. Hata 50µM	Kontrol
4a	0,554±0,003	0,596±0,002	0,509±0,006	0,402±0,006
4b	0,454±0,013	0,496±0,012	0,409±0,016	0,402±0,006
4c	0,374±0,011 ^c	0,512±0,012 ^b	0,550±0,011 ^b	0,402±0,006 ^a
4d	0,354±0,001	0,396±0,005	0,309±0,008	0,402±0,006
4e	0,531±0,007 ^b	0,501±0,005 ^b	0,577±0,006 ^b	0,402±0,006 ^a
4f	0,512±0,001 ^b	0,465±0,004 ^b	0,568±0,004 ^b	0,402±0,006 ^a
4g	0,668±0,001 ^c	0,583±0,002 ^b	0,515±0,033 ^b	0,402±0,006 ^a
4h	0,474±0,001 ^b	0,612±0,002 ^c	0,650±0,001 ^c	0,402±0,006 ^a

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 4.22. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde TAS düzeylerini gösteren grafik

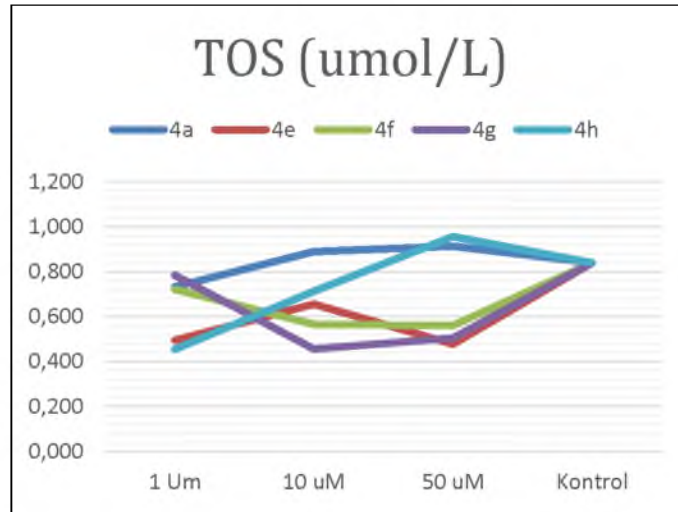
4.6.3. Toplam Oksidan Seviyenin (TOS) Değerlendirilmesi

Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında toplam oksidan seviyeleri (TOS) kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında, tüm deneysel gruplarda (1-50 µM) istatistiksel olarak anlamlı azalmaların ($P<0.05$) olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 µM konsantrasyonlarda kimyasal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak en düşük TOS değerleri tespit edilmiştir ($P<0.05$). Genel olarak **4e**, **4f**, **4g** ve **4h** bileşiklerinin uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre TOS miktarlarında en fazla düşüşlerin gerçekleştiği görülmektedir. (Tablo 4.14; Şekil 4.23).

Tablo 4.14. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında TOS düzeyleri

TOS Değerleri (µmol/L)	Uygulanan dozlar			
	Ortalama±Std. Hata 1µM	Ortalama±Std. Hata 10µM	Ortalama±Std. Hata 50µM	Kontrol
4a	0,731±0,002 ^b	0,888±0,001 ^a	0,913±0,003 ^a	0,838±0,005 ^a
4b	0,631±0,012 ^b	0,788±0,011 ^a	0,813±0,013 ^a	0,838±0,005 ^a
4c	0,354±0,012 ^c	0,611±0,014 ^b	0,856±0,011 ^a	0,838±0,005 ^a
4d	0,531±0,007 ^c	0,688±0,006 ^b	0,713±0,008 ^b	0,838±0,005 ^a
4e	0,493±0,002 ^c	0,655±0,003 ^b	0,477±0,004 ^c	0,838±0,005 ^a
4f	0,720±0,003 ^c	0,565±0,003 ^b	0,559±0,005 ^b	0,838±0,005 ^a
4g	0,783±0,002 ^a	0,455±0,003 ^c	0,504±0,003 ^b	0,838±0,005 ^a
4h	0,454±0,002 ^d	0,711±0,004 ^c	0,956±0,001 ^b	0,838±0,005 ^a

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).



Şekil 4.23. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde TOS düzeylerini gösteren grafik

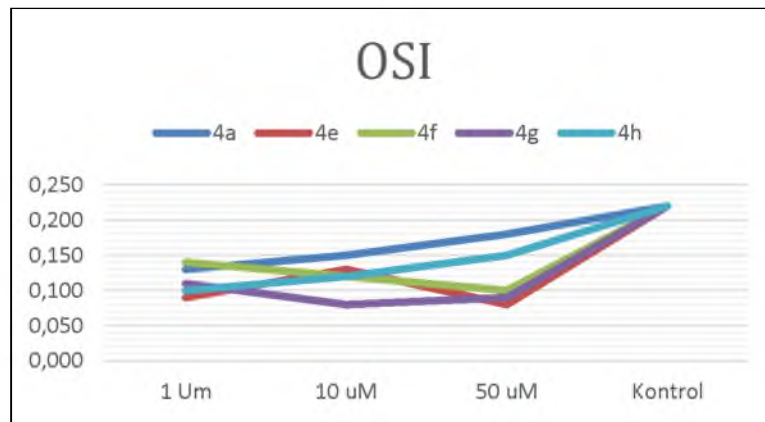
4.6.4. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışmaya göre, farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşiği (**4a-h**) uygulanan MCF-7 hücre hatlarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında OSİ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) azalmalar tespit edilmiştir. Sadece **4g** bileşiğinin kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki doz grupları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Genel olarak tüm bileşiklerde 1 μM konsantrasyon gruplarında en düşük OSİ değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.15; Şekil 4.24).

Tablo 4.15. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında OSİ düzeyleri

OSİ Değeri	Uygulanan dozlar			
	Median (Max.-Min.) 1 μM	Median (Max.-Min.) 10 μM	Median (Max.-Min.) 50 μM	Kontrol
4a	0,0013 (0,0013-0,0013) ^b	0,0015 (0,0015-0,0015) ^a	0,0018 (0,0018-0,0018) ^a	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4b	0,0013 (0,0013-0,0013) ^b	0,0015 (0,0015-0,0015) ^a	0,0018 (0,0018-0,0018) ^a	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4c	0,0010 (0,0010-0,0009) ^b	0,0012 (0,0012-0,0012) ^a	0,0015 (0,0015-0,0015) ^a	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4d	0,0013 (0,0013-0,0013) ^b	0,0015 (0,0015-0,0015) ^a	0,0018 (0,0018-0,0018) ^a	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4e	0,0009 (0,0009-0,0009) ^a	0,0013 (0,0013-0,0013) ^a	0,0008 (0,0009-0,0008) ^b	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4f	0,0014 (0,0014-0,0014) ^a	0,0012 (0,0012-0,0012) ^a	0,0010 (0,0010-0,0010) ^b	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a
4g	0,0011 (0,0011-0,0011)	0,0008 (0,0008-0,0008)	0,0009 (0,0011-0,0009)	0,0022 (0,0023-0,0021)
4h	0,0010 (0,0010-0,0009) ^b	0,0012 (0,0012-0,0012) ^a	0,0015 (0,0015-0,0015) ^a	0,0022 (0,0023-0,0021) ^a

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$).



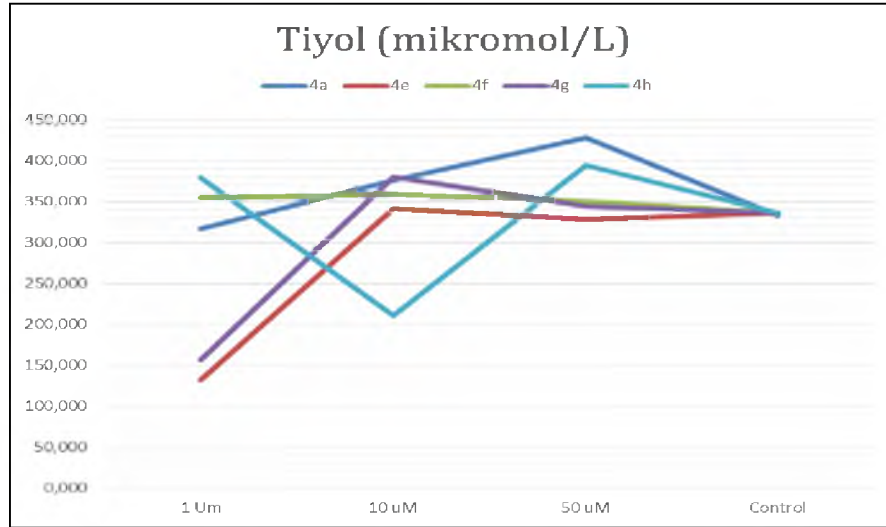
Şekil 4.24. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde OSİ düzeylerini gösteren grafik

4.6.5. Toplam Tiyol Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen bulgulara göre, farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşiği uygulanan meme kanseri hücre hatlarında, kontrol grubu tiyol düzeyleri ile karşılaştırıldığında, **4a**, **4b**, **4d**, **4e**, **4g** bileşiklerinin uygulandığı tüm konsantrasyon gruplarında (1 μM –50 μM) istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin ($P<0.05$) olduğu gözlenmiştir. **4c**, **4f**, **4h** bileşiklerinde ise kontrol grubu verilerine göre herhangi bir farklılık bulunmamıştır. İstatistiksel olarak en fazla artış, **4b** ve **4d** bileşiklerinin 50 μM konsantrasyon gruplarında görülmüştür. En düşük toplam tiyol değerleri **4e** ve **4g** bileşiklerinin 1 μM konsantrasyon gruplarında tespit edilmiştir (Tablo 4.16; Şekil 4.25).

Tablo 4.16. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında toplam tiyol düzeyleri

Total Tiyol Değerleri ($\mu\text{mol/L}$)	Uygulanan dozlar			
	Ortalama \pm Std. Hata 1 μM	Ortalama \pm Std. Hata 10 μM	Ortalama \pm Std. Hata 50 μM	Kontrol
4a	315,968 \pm 0,508 ^a	376,987 \pm 0,075 ^a	428,402 \pm 1,183 ^b	336,260 \pm 10,838 ^a
4b	305,968 \pm 0,518 ^a	356,987 \pm 0,085 ^a	408,402 \pm 1,193 ^b	336,260 \pm 10,838 ^a
4c	349,479 \pm 0,317	210,569 \pm 0,489	354,559 \pm 0,723	336,260 \pm 10,838
4d	315,968 \pm 0,508 ^a	376,987 \pm 0,075 ^a	428,402 \pm 1,183 ^b	336,260 \pm 10,838 ^a
4e	132,423 \pm 0,723 ^b	341,711 \pm 0,891 ^a	328,607 \pm 0,435 ^a	336,260 \pm 10,838 ^a
4f	354,706 \pm 0,425	358,485 \pm 0,188	350,405 \pm 0,307	336,260 \pm 10,838
4g	156,130 \pm 0,115 ^b	380,902 \pm 0,419 ^a	344,840 \pm 0,543 ^a	336,260 \pm 10,838 ^a
4h	379,479 \pm 0,317	210,569 \pm 0,289	394,559 \pm 0,223	336,260 \pm 10,838



Şekil 4.25. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde toplam tiyol düzeylerini gösteren grafik

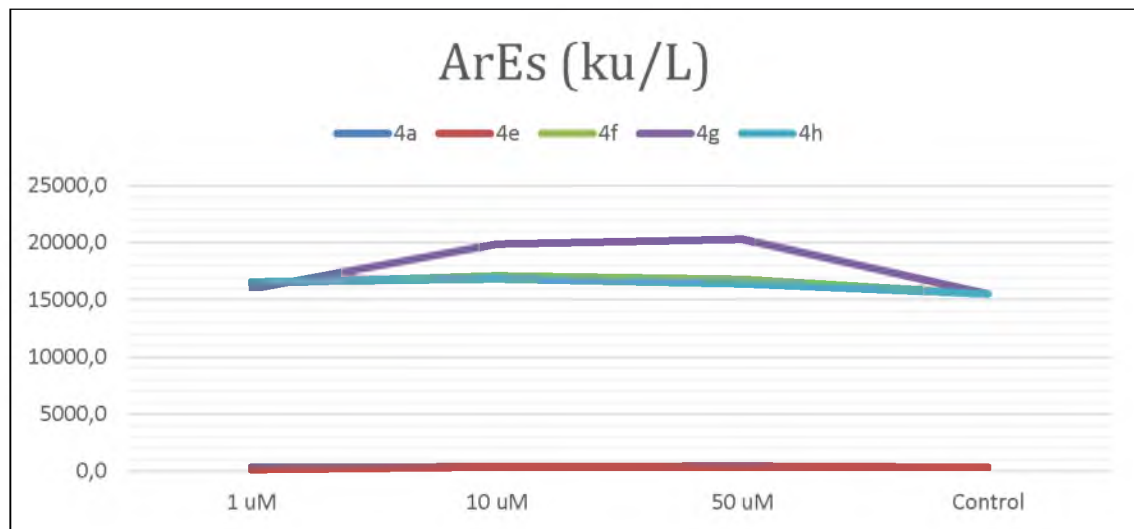
4.6.6. Aril Esteraz (ArEs) Enzimi Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Arilesteraz (ARE) aktivitesinin, PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (Mackness et al. 1991). Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ölçümlerinde kullanılan yöntemler temelde aynı olmakla birlikte farklı pH'larda çözeltiler kullanılmakta ayrıca farklı sıcaklıklarda reaksiyon oluşturulmaktadır (Hernandez et al. 1993; Mackness et al. 1993; Kelso et al. 1994). Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak paraokson yerine fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol ölçülmektedir. Çalışmamızın sonucunda elde edilen verilere göre, farklı konsantrasyonlarda (1 μ M–50 μ M) fosfinik asit bileşiği uygulanan meme kanseri hücre hatlarında, kontrol grubu ARE düzeyleri ile karşılaştırıldığında, **4c** bileşiği dışında diğer tüm fosfinik asit türevlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin ($P < 0.05$) olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak en fazla ARE değeri, **4g** bileşiğinde görülmüştür. En düşük ARE değeri ise **4b** ve **4c** bileşiklerinin 1 μ M konsantrasyon grubunda tespit edilmiştir (Tablo 4.17; Şekil 4.26).

Tablo 4.17. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında Aril esteraz enzimi düzeyleri

ArEs Değerleri (ku/L)	Uygulanan dozlar			
	Ortalama±Std. Hata 1µM	Ortalama±Std. Hata 10µM	Ortalama±Std. Hata 50µM	Kontrol
4a	16.331,333±2,028 ^a	17.994,333±1,202 ^b	18.258,000±2,517 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4b	15.331,333±2,228 ^a	16.994,333±1,402 ^b	17.258,000±2,717 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4c	15.553,667±2,733	15.821,333±2,528	15.393,667±1,964	15.489,333±256,048
4d	17.331,333±2,048 ^c	18.994,333±1,252 ^b	18.258,000±2,547 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4e	16.985,667±0,882 ^b	16.826,333±1,856 ^b	16.275,667±0,882 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4f	16.435,667±0,882 ^b	17.094,000±1,528 ^b	16.786,667±1,764 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4g	15.934,333±1,202 ^a	19.862,333±1,764 ^b	20.285,000±2,309 ^b	15.489,333±256,048 ^a
4h	16.553,667±2,333 ^b	16.821,333±2,028 ^b	16.393,667±1,764 ^b	15.489,333±256,048 ^a

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).



Şekil 4.26. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde Aril esteraz enzimi düzeylerini gösteren grafik

4.6.7. Paraoksonaz (PON1) Enzimi Düzeylerinin Değerlendirilmesi

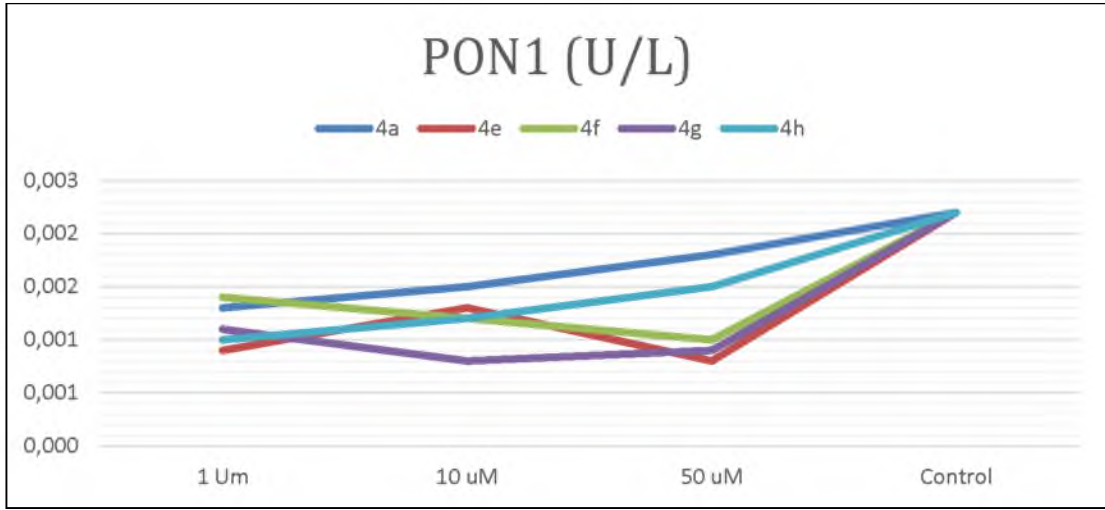
Paraoksonaz (PON1) enzimi glikoprotein yapısında olup, aromatik karboksilik asit esterlerini hidroliz eden ve HDL'ye sıkıca bağlı olan bir esterazdır (Hernandez et al.

1993; Kelso et al. 1994; Mackness et al. 1991,1993). LDL'nin oksidasyonu ve dolayısıyla lipid peroksitlerinin birikimi sırasında HDL'nin bu enzimatik mekanizmalarla lipid peroksitlerini azalttığı bilinmektedir (Eckerson et al.1983; Mackness et al. 1991, 1993; Navab et al. 1997; Odowara et al. 1997; Heinecke and Lusic 1998). Örnekteki paraoksonaz enzimi reaksiyon ortamındaki paraokson substratını hidroliz eder ve açığa çıkan ürünün absorbans artışı, absorbans spektrumuna uygun dalga boyunda kinetik olarak izlenmektedir. Nonenzimatik hidroliz değeri, örnek değerinden çıkarılarak enzimatik aktiviteye ait net değerler hesaplanır. Sonuçlar dakikada bir mikromolar substratın hidrolizine eşit olan ünite/litre cinsinden ifade edilmektedir. Yaptığımız çalışmanın bulgularına göre, farklı konsantrasyonlarda (1 μM –50 μM) fosfinik asit bileşiği uygulanan meme kanseri hücre hatlarında, kontrol grubu PON1 düzeyleri ile karşılaştırıldığında, **4c**, **4f**, **4e**, **4g** bileşiklerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin ($P<0.05$) olduğu gözlenmiştir. **4a**, **4b**, **4d**, **4h** bileşiklerinde ise kontrol grubu verilerine göre herhangi bir farklılık bulunmamıştır. İstatistiksel olarak en fazla PON1 değeri, **4c** ve **4g** bileşiklerinde görülmüştür. En düşük PON1 değeri ise **4e** bileşiğinin 1 μM konsantrasyon grubunda tespit edilmiştir (Tablo 4.18; Şekil 4.27).

Tablo 4.18. Farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında Paraoksonaz enzimi düzeyleri

PON1 Değerleri (U/L)	Uygulanan dozlar			
	Ortalama \pm Std. Hata 1 μM	Ortalama \pm Std. Hata 10 μM	Ortalama \pm Std. Hata 50 μM	Kontrol
4a	3.024,000 \pm 2,309	3.232,667 \pm 1,453	2.884,000 \pm 2,309	2.450,667 \pm 79,963
4b	3.024,000 \pm 2,329	3.032,667 \pm 1,473	2.684,000 \pm 2,329	2.450,667 \pm 79,963
4c	8.140,333 \pm 2,804 ^c	5.249,667 \pm 1,964 ^b	2.088,333 \pm 0,882 ^a	2.450,667 \pm 79,963 ^a
4d	3.224,000 \pm 2,312	2.432,667 \pm 1,445	2.794,000 \pm 2,325	2.450,667 \pm 79,963
4e	1.848,000 \pm 1,155 ^a	2.774,333 \pm 2,028 ^a	6.879,333 \pm 5,207 ^b	2.450,667 \pm 79,963 ^a
4f	5.008,333 \pm 0,882 ^c	5.844,667 \pm 1,764 ^b	5.874,000 \pm 2,082 ^b	2.450,667 \pm 79,963 ^a
4g	4.949,333 \pm 2,603 ^c	8.872,667 \pm 1,764 ^b	2.690,667 \pm 2,728 ^a	2.450,667 \pm 79,963 ^a
4h	9.140,333 \pm 2,404 ^c	6.249,667 \pm 1,764 ^b	2.088,333 \pm 0,882 ^a	2.450,667 \pm 79,963 ^a

Her satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 4.27. Kontrol grubu ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde Paraoksonaz enzimi düzeylerini gösteren grafik

4.6.8. MCF-7 Hücre Kültürlerinde Uygulanan Herbir Fosfinik Asit Bileşiğinin Antioksidan Aktivite Kapasiteleri Bakımından Karşılaştırılması

MCF-7 hücre kültürlerinde uygulanan fosfinik asit bileşiklerinin farklı doz gruplarına göre kontrol grubuyla karşılaştırılmaları yukarıdaki grafiklerde ayrıntılı olarak verilmiştir. Ayrıca her bir bileşiği sahip olduğu toplam reaktif oksijen türleri bakımından da değerlendirmek ve karşılaştırma yapmak, her bir türev bileşiğin potansiyelinin belirlenmesi açısından son derece uygun olacaktır. Bu nedenle, her bir bileşiğin deneme yapılan doz gruplarının ikişerli olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Buradaki istatistiksel farklılıkların $P < 0,05$ ve $P < 0,01$ değerine göre önemlilikleri derecelendirilerek Tablo 4.19 ile Tablo 4.26 arasındaki tablolarda rakamsal değerlerle ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Tablo 4.19. MCF-7 hücre hatına uygulanan 4a bileşiminin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA					Toplam tiyol		OSI
		(Nmol/gP)	TAS (mmol/L)	TOS (µmol/L)	AEs (ku/L)	PON1 (U/L)	(µmol/L)	Median (Max.-Min.)	
4a	1 µM	=I	3,632±0,142	0,554±0,003	0,731±0,002	16,331,333±2,028	3,024,000±2,309	315,968±0,508	0,0013 (0,0013-0,0013)
	10 µM	=II	3,542±0,222	0,596±0,002	0,888±0,001	17,994,333±1,202	6,232,667±1,453	376,987±0,075	0,0015 (0,0015-0,0015)
	50 µM	=III	3,634±0,033	0,509±0,006	0,913±0,003	18,258,000±2,517	2,884,000±2,309	428,402±1,183	0,0018 (0,0018-0,0018)
	Total	=IV	3,603±0,078	0,553±0,013	0,844±0,028	17,527,889±301,552	4,046,889±546,819	373,786±16,252	0,0015 (0,0018-0,0013)
	Kontrol	=V	3,173±0,163	0,402±0,006	0,838±0,005	15,489,333±256,048	2,450,667±79,963	336,260±10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)
		I→V	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,011
		II→V	NS	NS	NS	0,031	NS	NS	NS
		III→V	NS	NS	NS	0,025	NS	0,039	NS
		IV→V	NS	0,001	<0,001	0,020	0,039	NS	0,010

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (monte Carlo) Post Hoc Test:nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max:Maximum - Min:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.20. MCF-7 hücre hatuna uygulanan 4e bileşiminin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA (Nmol/gp)		TAS (mmol/L)		TOS (µmol/L)		ARes (ku/L)		PON1 (U/L)		Toplam Tiyol (µmol/L)		OSI Median (Max.-Min.)	
		Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH
4e	1 µM	=I	3,307±0,119	0,531±0,007	0,493±0,002	16,985,667±0,882	1,848,000±1,155	132,423±0,723	0,0009 (0,0009-0,0009)						
	10 µM	=II	3,290±0,143	0,501±0,005	0,655±0,003	16,826,333±1,856	2,774,333±2,028	341,711±0,891	0,0013 (0,0013-0,0013)						
	50 µM	=III	3,573±0,195	0,577±0,006	0,477±0,004	16,275,667±0,882	6,879,333±5,207	328,607±0,435	0,0008 (0,0009-0,0008)						
	Total	=IV	3,390±0,090	0,536±0,011	0,542±0,028	16,695,889±107,545	3,833,889±773,014	267,580±33,844	0,0009 (0,0013-0,0008)						
	Kontrol	=V	3,173±0,163	0,402±0,006	0,838±0,005	15,489,333±256,048	2,450,667±79,963	336,260±10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)						
Post Hoc test		I→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	0,008	NS						
		II→V	NS	<0,001	<0,001	NS	0,001	NS	NS						
		III→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	0,018						
		IV→V	NS	0,002	0,028	0,012	NS	NS	0,004						

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (Monte Carlo) Post Hoc Test:nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max.:Maximum -Min.:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.21. MCF-7 hücre hatuna uygulanam **4f** bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA	TAS	TOS	ArES	PON1	Toplam Tiyol	OSI
		(Nmol/gp)	(mmol/L)	(μ mol/L)	(ku/L)	(U/L)	(μ mol/L)	(Max.-Min.)
4f	1 μM	\pm I	\pm I	\pm I	\pm I	\pm I	\pm I	\pm I
		3,497 \pm 0,080	0,512 \pm 0,001	0,720 \pm 0,003	16,435,667 \pm 0,882	5,008,333 \pm 0,882	354,706 \pm 0,425	0,0014 (0,0014-0,0014)
	10 μM	\pm II	\pm II	\pm II	\pm II	\pm II	\pm II	\pm II
		3,411 \pm 0,221	0,465 \pm 0,004	0,565 \pm 0,003	17,094,000 \pm 1,528	5,844,667 \pm 1,764	358,485 \pm 0,188	0,0012 (0,0012-0,0012)
50 μM	\pm III	\pm III	\pm III	\pm III	\pm III	\pm III	\pm III	
	3,336 \pm 0,095	0,568 \pm 0,004	0,559 \pm 0,005	16,786,667 \pm 1,764	5,874,000 \pm 2,082	350,405 \pm 0,307	0,0010 (0,0010-0,0010)	
Total	\pm IV	\pm IV	\pm IV	\pm IV	\pm IV	\pm IV	\pm IV	\pm IV
	3,415 \pm 0,077	0,515 \pm 0,015	0,615 \pm 0,027	16,772,111 \pm 95,095	5,575,667 \pm 141,899	354,532 \pm 1,178	0,0012 (0,0014-0,0010)	
Kontrol	\pm V	\pm V	\pm V	\pm V	\pm V	\pm V	\pm V	\pm V
	3,173 \pm 0,163	0,402 \pm 0,006	0,838 \pm 0,005	15,489,333 \pm 256,048	2,450,667 \pm 79,963	336,260 \pm 10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)	
Post Hoc test	I \rightarrow V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	NS
	II \rightarrow V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	NS
	III \rightarrow V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	0,011
	IV \rightarrow V	NS	0,002	0,036	0,002	0,014	NS	0,010

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (Monte Carlo) Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standard hata - Max.:Maximum - Min.:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.22. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4g bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA (Nmol/gP)			TAS (mmol/L)			TOS (µmol/L)			AFeS (ku/L)			PON1 (U/L)			Toplam Tiyol (µmol/L)		OSI Median (Max.-Min.)	
		Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	
4g	1 µM	=I	3,136±0,070	0,668±0,001	0,783±0,002	15,934,333±1,202	2,949,333±2,603	156,130±0,115	0,0011 (0,0011-0,0011)											
	10 µM	=II	3,738±0,127	0,583±0,002	0,455±0,003	19,862,333±1,764	8,872,667±1,764	380,902±0,419	0,0008 (0,0008-0,0008)											
	50 µM	=III	3,790±0,123	0,515±0,033	0,504±0,003	20,285,000±2,309	2,690,667±2,728	344,840±0,543	0,0009 (0,0011-0,0009)											
	Total	=IV	3,555±0,118	0,589±0,024	0,581±0,051	18,693,889±692,582	4,837,556±1,009,469	293,957±34,848	0,0009 (0,0011-0,0008)											
Kontrol	=V	3,173±0,163	0,402±0,006	0,838±0,005	15,489,333±256,048	2,450,667±79,963	336,260±10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)												
Post Hoc test	I→V	NS	NS	<0,001	0,001	<0,001	0,011	NS												
	II→V	0,032	0,010	<0,001	0,002	<0,001	NS	0,010												
	III→V	0,021	0,009	<0,001	NS	0,007	NS	NS												
	IV→V	NS	0,001	0,042	0,044	NS	NS	0,008												

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (monte Carlo) Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max.:Maximum -Min.:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.23. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4h bileşiminin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA (Nmol/gP)			TAS (mmol/L)			TOS (µmol/L)			Aves (ku/L)			PONI (U/L)			Toplam TiyoI (µmol/L)		OSI Median (Max.-Min.)	
		Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	
4h																				
	1 µM	=I	3,640±0,174	0,474±0,001	0,454±0,002	16,553,667±2,333	9,140,333±2,404	379,479±0,317	0,0010 (0,0010-0,0009)											
	10 µM	=II	3,167±0,076	0,612±0,002	0,711±0,004	16,821,333±2,028	6,249,667±1,764	210,569±0,289	0,0012 (0,0012-0,0012)											
	50 µM	=III	3,193±0,036	0,650±0,001	0,956±0,001	16,393,667±1,764	2,088,333±0,882	394,559±0,223	0,0015 (0,0015-0,0015)											
	Total	=IV	3,333±0,095	0,579±0,027	0,707±0,072	16,589,556±62,385	5,826,111±1,023,362	328,202±29,489	0,0012 (0,0015-0,0009)											
	Kontrol	=V	3,173±0,163	0,402±0,006	0,838±0,005	15,489,333±256,048	2,450,667±79,963	336,260±10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)											
		I→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	0,011											
		II→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	0,022											
		III→V	NS	<0,001	<0,001	NS	0,001	NS	NS											
		IV→V	NS	0,033	NS	0,003	0,048	NS	0,008											

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (Monte Carlo) Post Hoc Test:nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max.:Maximum -Min.:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.24. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4c bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA (Nmol/gP)		TAS (mmol/L)		TOS (µmol/L)		ArEs (ku/L)		PON1 (U/L)		Toplam TiyoI (µmol/L)		OSI Median (Max.-Min.)
		Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH			
4c	1 µM	=I	3,140±0,074	0,374±0,011	0,354±0,012	15,553,667±2,733	8,140,333±2,804	349,479±0,317	0,0010 (0,0010-0,0009)					
		=II	2,867±0,076	0,512±0,012	0,611±0,014	15,821,333±2,528	5,249,667±1,964	210,569±0,489	0,0012 (0,0012-0,0012)					
	50 µM	=III	2,893±0,136	0,550±0,011	0,856±0,011	15,393,667±1,964	2,088,333±0,882	354,559±0,723	0,0015 (0,0015-0,0015)					
		=IV	2,933±0,195	0,479±0,037	0,607±0,082	15,589,556±62,885	4,826,111±1,023,962	308,202±29,989	0,0012 (0,0015-0,0009)					
Kontrol	=V	2,973±0,163	0,302±0,016	0,738±0,015	15,489,333±256,948	2,450,667±79,963	336,260±10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)						
	I→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	NS	0,011						
Post Hoc test	II→V	NS	<0,001	<0,001	NS	<0,001	0,022	NS						
	III→V	NS	<0,001	<0,001	NS	0,001	NS	NS						
	IV→V	NS	0,033	NS	0,003	0,048	NS	0,008						

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (monte Carlo) Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller (1966) - Independent T test (Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max.: Maximum - Min.: Minimum - NS: Not Significant.

Tablo 4.25. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4b bileşiminin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA						Toplam Triyol ($\mu\text{mol/L}$)	OSI Median (Max.-Min.)
		(Nmol/gP) Ort \pm SH	TAS (mmol/L) Ort \pm SH	TOS ($\mu\text{mol/L}$) Ort \pm SH	AFEs (ku/L) Ort \pm SH	PONI (U/L) Ort \pm SH	Ort \pm SH		
4b	1 μM	=I	3,032 \pm 0,112	0,454 \pm 0,013	0,631 \pm 0,012	15,331,333 \pm 2,228	3,024,000 \pm 2,329	305,968 \pm 0,518	0,0013 (0,0013-0,0013)
	10 μM	=II	3,242 \pm 0,192	0,496 \pm 0,012	0,788 \pm 0,011	16,994,333 \pm 1,402	6,032,667 \pm 1,473	356,987 \pm 0,085	0,0015 (0,0015-0,0015)
	50 μM	=III	3,334 \pm 0,093	0,409 \pm 0,016	0,813 \pm 0,013	17,258,000 \pm 2,717	2,684,000 \pm 2,329	408,402 \pm 1,193	0,0018 (0,0018-0,0018)
	Total	=IV	3,303 \pm 0,028	0,453 \pm 0,023	0,744 \pm 0,038	16,527,889 \pm 301,752	4,086,889 \pm 546,839	353,786 \pm 16,272	0,0016 (0,0018-0,0013)
	Kontrol	=V	3,073 \pm 0,103	0,402 \pm 0,016	0,738 \pm 0,015	15,189,333 \pm 256,248	2,250,667 \pm 79,983	316,260 \pm 10,858	0,0025 (0,0023-0,0021)
Post Hoc test		I \rightarrow V	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,011
		II \rightarrow V	NS	NS	NS	0,031	NS	NS	NS
		III \rightarrow V	NS	NS	NS	0,025	NS	0,039	NS
		IV \rightarrow V	NS	0,001	<0,001	0,020	0,039	NS	0,010

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (Monte Carlo) Post Hoc Test:nonparametrik posthoc test (Miller(1966) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standard hata - Max.:Maximum - Min.:Minimum - NS:Not Significant.

Tablo 4.26. MCF-7 hücre hattına uygulanan 4d bileşiğinin toplam reaktif oksijen türleri bakımından değerlendirilmesi

Bileşik	Örnek	MDA						Toplam TiyoL ($\mu\text{mol/L}$)	OSI Median (Max.-Min.)
		(Nmol/gP) Ort \pm SH	TAS (mmol/L) Ort \pm SH	TOS ($\mu\text{mol/L}$) Ort \pm SH	ARes (ku/L) Ort \pm SH	PON1 (U/L) Ort \pm SH	Ort \pm SH		
4d	1 μM	=I	3,332 \pm 0,122	0,354 \pm 0,001	0,531 \pm 0,007	17,331,333 \pm 2,048	3,224,000 \pm 2,312	315,968 \pm 0,508	0,0013 (0,0013-0,0013)
	10 μM	=II	3,242 \pm 0,202	0,396 \pm 0,005	0,688 \pm 0,006	18,994,333 \pm 1,252	6,432,667 \pm 1,445	376,987 \pm 0,075	0,0015 (0,0015-0,0015)
	50 μM	=III	3,334 \pm 0,013	0,309 \pm 0,008	0,713 \pm 0,008	18,258,000 \pm 2,547	2,794,000 \pm 2,325	428,402 \pm 1,183	0,0018 (0,0018-0,0018)
	Total	=IV	3,303 \pm 0,058	0,353 \pm 0,015	0,644 \pm 0,030	18,527,889 \pm 301,572	4,346,889 \pm 546,819	373,786 \pm 16,252	0,0015 (0,0018-0,0013)
Kontrol	=V	3,053 \pm 0,143	0,202 \pm 0,009	0,638 \pm 0,008	16,489,333 \pm 256,068	2,670,667 \pm 79,963	336,260 \pm 10,838	0,0022 (0,0023-0,0021)	
	Post Hoc test	I \rightarrow V	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,011
4d	Kontrol	II \rightarrow V	NS	NS	NS	0,031	NS	NS	NS
		III \rightarrow V	NS	NS	NS	0,025	NS	0,039	NS
		IV \rightarrow V	NS	0,001	<0,001	0,020	0,039	NS	0,010

OneWay ANOVA (Bootstrap) Test - Post Hoc Test: Dunnett T and T3 - Kruskal Wallis Test (monte Carlo) Post Hoc Test: nonparametrik posthoc test (Miller(1966)) - Independent T test(Bootstrap) - Mann Whitney U test (Monte Carlo) - SH: Standart hata - Max.:Maximum -Min.:Minimum - NS:Not Significant.

5. TARTIŞMA

Canlılarda oksijenli solunum mekanizmalarıyla enerji kaynağı olan karbonun oksijen ile yanması sonucunda; serbest radikal olarak adlandırılan süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit gibi aktif oksijen formları ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller; organizmadaki hücrelerin membranına, hücre yapısında bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asitlere ve kalıtsal materyal olan DNA'ya zarar vererek, pek çok hastalığa neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar gün geçtikçe serbest radikallerin yeni hastalıkların oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkilerin ortaya koymaktadır. Antioksidan maddeler; serbest radikallerin neden olduğu zararlı reaksiyonları durdurarak, singlet oksijenini bağlayarak ve metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarında metalleri bağlayarak dejeneratif hastalıkların oluşumunu önlemektedir (Velioğlu 2006).

Organofosfor bileşiklerinin farklı antimikrobiyal, antitumoral, antioksidan aktivitelerinin olduğu ve enzim inhibitörü, antidepresan, antitüberküloz, antiinflamatuvar, antihipertansif ajan olarak farklı biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca bazı metabolik kemik hastalıkları, osteoporöz, paget hastalığı, multiple myeloma, meme-akciğer-prostat kanserleri gibi çeşitli tümörlere ait kemik metastazlarının bulunduğu olgularda bisfosfonat grubu ilaçlardan yararlanılmaktadır (Migliorati et al. 2006; Sezer ve Şen, 2011). Organofosfor bileşikleri, oldukça geniş farmakolojik özelliklere sahip olmalarından dolayı biyokimya, organik kimya ve farmasötik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında yeni sentezlenen bazı bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin farklı *in vitro* yöntemler kullanarak antioksidan, antitümör, antimikrobiyal ve topoizomeras aktiviteleri gibi bazı biyolojik etkinlikleri araştırılmıştır. Bu şekilde, sentezlenen bileşiklerin potansiyel bir terapötik antikanser ajanı olarak etken madde olma özellikleri veya antioksidan ve biyoaktif bir madde olarak biyomalzeme niteliğinin değerlendirilmesi planlanmıştır. *In vitro* antioksidan aktivitelerin değerlendirilmesi bakımından, yeni sentezlediğimiz bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşikleri, metal şelatlama aktiviteleri, süperoksit radikali süpürme aktiviteleri, hidrojen

peroksit giderme aktiviteleri, hidroksil ve DPPH radikali yakalama aktiviteleri gibi farklı *in vitro* yöntemlerle araştırılmıştır.

Literatüre bakıldığı zaman, çalışmamızda kullandığımız bu yöntemlerden herhangi birini kullanarak fosfinik asit türevlerinin potansiyel antioksidan etkilerini araştıran çalışmalar mevcut değildir. Ancak ticari olarak satılan dimetil fosfinik asit (C₂H₇O₂P, Sigma aldrich) fenil fosfinik asit (C₆H₇O₂P, Sigma aldrich), difenil fosfinik asit (C₁₂H₁₁O₂P, Sigma aldrich), bis(4-metoksifenilfosfinik asit) (C₁₄H₁₅O₄P, Sigma aldrich), ve diizooktiliditiyofosfinik asit (C₁₆H₃₅PS₂, Sigma aldrich) gibi kimyasalların antioksidan olduğu belirtilmiştir (<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistryproducts.html?TablePage=16251643>). Bazı çalışmalarda ise organofosfatların, hücresel reaksiyonlardaki lipoksijenaz, peroksidaz, dehidrojenaz gibi enzimler tarafından üretilen hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerini üretmek yoluyla, oksidatif stresi artırdıkları gösterilmiştir (Abdollahi et al. 2004; Nurulain et al. 2013). Bizim çalışmamızda bileşiklerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek amacıyla, 5 farklı *in vitro* antioksidan aktivite analiz yöntemi aynı anda kullanılmıştır. Literatürdeki farklı çalışmalarda, bazı sentetik veya bitkisel izolatların antioksidan aktivitelerinin araştırılmasında genellikle bu yöntemlerin bir veya birkaçının birlikte kullanıldığı görülmektedir. Bu şekilde çalışmamız kapsamında farklı antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinin birbiriyle de kıyaslamasını yapmak mümkün olmuştur. **4f** ve **4c** bileşiklerinin bu yöntemlerin sonuçlarına göre, standart antioksidanlara yakın değerlerde hatta bazı testler için standartlardan daha yüksek aktivite düzeylerinde sonuçlar verdiğini göz önünde tutarsak, bu bileşiklerin antioksidan etkilerinin iyi sayılabilecek bir düzeyde olduğu söylenebilir. **4a** ve **4b** bileşiklerinin hemen hemen tüm yöntemlerde düşük antioksidan aktivite değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden **4a** ve **4b** bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin çok iyi olmadığı belirtilebilir. DPPH radikali yakalama aktivitesi metodunun sonuçlarına göre çok aktif olan bileşiklerin diğer yöntemlerde çok yüksek aktivite göstermediği bulunmuştur. Nitekim **4a** ve **4b** bileşiklerinin DPPH radikali yakalama aktivitesi dışında diğer tüm yöntemlerde standart antioksidanların aktivitelerine göre çok düşük düzeylerde kaldığı görülmektedir.

Diğer taraftan test bileşiklerinin tümünün metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları görülmektedir. Ancak 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 oldukları söylenemez. Ancak tüm maddeler arasında **4c** bileşiğinin tüm konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden ve BHT standardından daha yüksek bir metal şelatlama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Bileşikler kendi aralarında kıyaslandıklarında en düşük metal şelatlama aktivitesine **4e** bileşiğinin, en yüksek aktiviteye ise **4c** bileşiğinin sahip olduğu görülmüştür.

H₂O₂ giderme aktivitesi artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. **4a** ve **4b** bileşikleri tüm gruplarda en düşük aktiviteyi göstermiş, **4f** ve **4c** bileşikleri ise BHT standardından bile yüksek aktivite göstermiştir. Test ettiğimiz tüm bileşikler hidrojen peroksit giderme aktiviteleri bakımından askorbik asitten daha düşük aktiviteye sahiptir. Diğer taraftan özellikle **4f** ve **4c** bileşiklerinin askorbik asite çok yakın düzeyde bir aktiviteye sahip olduğu da görülmüştür. Test edilen bileşiklerin süperoksit radikalini giderme aktivitelerine bakıldığında ise en yüksek aktiviteye sahip bileşikler **4c**, **4e** ve **4f** olup, bunlar aynı zamanda standart olarak kullanılan α -tokoferolden bile yüksek aktivite göstermişlerdir. En düşük aktiviteli bileşikler ise **4g** ve **4b** bileşikleridir. Genel olarak *in vitro* şartlarda yaptığımız çalışmada elde edilen bulgulara göre, fosfinik asit bileşiklerin serbest radikallerin hasarlayıcı etkilerini azaltan ve engelleyen antioksidan aktivitelere sahip olduğunu söylemek mümkündür.

MCF-7 Hücre Kültürlerinde Reaktif Oksijen Türlerinin değerlendirilmesi bakımından, test edilen fosfinik asit türevlerinin hücredeki farklı parametreler üzerinde bazı etkilerinin olduğu görülmüştür. Buna göre **4c** bileşiği MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür. **4a** ve **4g** bileşikleri ise kontrole göre MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır. Diğer bileşiklerde istatistiki açıdan anlamlı farklar bulunmamasına rağmen kontrole göre MDA düzeyinde değişimler görülmüştür. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, organizmada fizyolojik ve metabolik bozukluklara yol açmaktadır. Buna göre **4a** ve **4g** bileşiklerinin, MDA düzeyini arttırmaları bakımından diğer bileşiklere göre prooksidan bir etkiye sahip oldukları söylenebilir. **4g**, **4e**, **4b**, **4d** bileşiklerinin diğer antioksidan yöntemlerde de düşük bir aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Buna ilaveten **4g**, **4e**, **4b**, **4d** bileşiklerinin lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA değerlerini bir miktar arttırması da, bu bileşiklerin antioksidan

olarak etkisinin olmadığı hatta negatif yönde bir etkisi olduğu fikrini düşündürmüştür. **4c**, **4f** ve **4h** bileşikler diğer antioksidan yöntemlerde de iyi aktivite göstermiş olmakla birlikte, MDA değerlerini azaltması bakımından en etkili olan **4c** bileşiği, reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesini sağlayarak hücrenin zarar görmesini engellemektedir. MCF-7 hücrelerine uygulanan **4f** ve **4h** bileşiklerinin, meme kanseri hücrelerinde MDA değeri üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır. Farklı dozlarda fosfinik asit bileşiklerinin uygulandığı MCF-7 hücrelerindeki total antioksidan seviyesine bakıldığı zaman, **4a**, **4b** ve **4d** bileşiklerinin uygulanmasının kontrol grubuna göre önemli bir istatistiksel fark oluşturmadığı görülmektedir. Diğer taraftan **4c**, **4e**, **4f** ve **4h** fosfinik asit bileşiklerinin MCF-7 hücrelerine eklenmesi sonucunda, kontrol grubuna göre hücrelerdeki total antioksidan seviyesinin arttığı görülmektedir. **4g** bileşiği ise kontrol grubuna göre TAS değerlerini düşürmektedir. Bu durum **4g** bileşiğinin prooksidan aktivite taşıdığını göstermekle birlikte, **4c**, **4e**, **4f** bileşiklerinin antioksidan maddeler olabileceği görüşünü desteklemektedir. Fosfinik asit bileşiklerinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen total oksidan seviye (TOS) sonuçlarına göre **4c**, **4b**, **4e**, **4d** ve **4f** bileşiklerinin TOS değerlerini kontrol grubuna nazaran azalttıkları görülmektedir. **4h** bileşiği ise kontrol grubuna göre TOS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır. MCF-7 hücrelerine uyguladığımız fosfinik asit bileşiklerinin hücrelerin oksidatif stres indeksi (oksidan/antioksidan) üzerindeki etkilerine baktığımızda, 1 µM konsantrasyonlu doz grubunun kontrol grubu değerlerinden genel olarak farklı olduğu gözlenmektedir. **4a**, **4b**, **4c**, **4d** ve **4h** bileşiklerinin, hücrelerdeki OSİ değerlerini kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı (P<0.05) saptanmıştır. **4e** ve **4f** bileşiklerinin 1 µM konsantrasyon grubunda ise kontrol grubu verilerine göre, istatistiksel anlamlı bir artış gözlenmektedir (P<0.05). Oksidatif stres indeksi; toplam oksidan seviyenin, toplam antioksidan seviyeye oranı şeklinde ifade edildiği için, çalışmada OSİ değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre düşük olması, fosfinik asit bileşiklerinin etkin antioksidan kapasite göstermesinin bir sonucudur. OSİ değerlerinde düşmeye sebep olan fosfinik asit bileşikler, kararsız yapıdaki bileşiklerin hasar yapıcı oksidan etkilerini daha az düzeye indirir. OSİ değerlerinin, kontrol grubu değerlerine göre önemli bir şekilde artış gösterdiği gruplarda ise, bu durum; lipit peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkmasındaki artışla birlikte, organizmada hücresel hasarların meydana geldiği şeklinde açıklanabilir. Farklı konsantrasyonlardaki fosfinik asit çözeltilerinin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında peroksidit süpürücü özellikte olan tiyol düzeylerine

etkilerini incelediğimizde, kontrol grubu değerlerine göre, **4f** ve **4h** dışındaki bütün farklı konsantrasyonlarda fosfinik asit uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artışların ($P<0.05$) olduğu belirlenmiştir. **4f** ve **4h** bileşiklerinin uygulandığı gruplarda da tiyol seviyelerinde dozlara göre artışlar olmuştur fakat $P<0.05$ seviyesinde anlamlı değildir. En yüksek tiyol seviyesi **4a** ve **4d** bileşiklerinin 50 μ M konsantrasyonda uygulandığı hücre grubunda tespit edilmiştir. Tiyol grupları, tek başlarına veya şelatör ajanlarla birlikte birçok toksik etkili ağır metallerin zararlı etkilerine karşı antioksidan rol oynamaktadırlar (Çaylak 2010). Oksidanların engellenmesini sağlayan tiyol grupları doğal antioksidanlar olarak etki ederler. Enzimatik antioksidan savunma sistemlerinin yanı sıra radikallerin sebep olduğu hasarların önlenmesinde önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olan tiyol grupları birçok fitokimyasalın antioksidan özelliğinin artırılmasında da etkilidirler. Ağır metal iyonlarıyla çökelti oluşturabilme yeteneğine sahip olan tiyoller, biyolojik yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleriyle de hücrelerde önemli antioksidan aktiviteler gösterirler. Antioksidan etkili tiyoller, radikal hasarından hücreleri koruyarak oksidasyonların engellenmesi ve radikallerin sebep olduğu hasarların giderilmesinde rol oynayarak, lipid peroksidasyonu gibi olumsuz proseslerin engellenmesi ile hücreleri oksidatif zararlardan korumaktadırlar (Manda et al. 2010). Bu nedenle tiyol grubu içeren bileşikler, kuvvetli antioksidanların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Biyolojik sistemlerde yer alan tiyollerin antioksidan savunma sistemlerinin koordinasyonunda esas rol oynaması başta olmak üzere sayısız fonksiyonları bulunmaktadır. Dolayısıyla, canlıda tiyol düzeylerinin artışına paralel olarak antioksidan seviyenin de artış göstermesi beklenmektedir.

Paraoksonaz-1 (PON1; arildialkil fosfataz, [EC 3.1.8.1]) enzimi glikoprotein yapısında ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'e sıkıca bağlı olan antioksidan ve antiatherojenik (damar daralmasını, tıkanmasını engelleyici) fonksiyonları olan esterazdır. Ayrıca lipoproteinleri oksidatif zararlara karşı korumaktadır (Gülcü ve Gürsu, 2003). Paraokson gibi organofosfatları ve yağ asitlerinin paration dışında, diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolizleyebilmektedir. PON'un, bir pestisid olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve lipid peroksidleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak gibi başlıca iki fonksiyonu

bulunmaktadır (Mackness et al. 1998). PON1'in lipit peroksitlerin yanısıra hidrojen peroksit üzerine de etkili olup, peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır. Paraoksonaz 1 enzim aktivitesindeki ve miktarındaki düşüşlerde, oksidatif hasarın yeterince engellenemediği, bu yüzden de diyabet, kalp damar hastalıkları, hepatit, prostat kanseri ve bazı oto immün hastalıkların oluştuğu bildirilmiştir (Gür vd. 2006; Hofer et al. 2006; Marchegiani et al. 2008). Paraoksonaz ayrıca aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (Gülcü ve Gürsu 2003). Arilesteraz (ARE) aktivitesinin, PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (Mackness 1998). Çalışmamızda test edilen fosfinik asit türevlerinin MCF-7 hücrelerindeki PON1 ve Aril esteraz enzimi aktivitelerinde bazı etkilerinin olduğu görülmüştür. Aril esteraz enzim aktivitesi bakımından **4c** bileşiğinin uygulandığı grupta kontrol grubuna göre herhangi bir değişme gözlenmezken, diğer tüm bileşiklerin uygulandığı gruplarda Aril esteraz miktarlarında artışlar bulunmuştur. PON1 aktivitesi bakımından gruplar değerlendirildiğinde ise **4c, 4f, 4e, 4g** bileşiklerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin ($P<0.05$) olduğu gözlenmiştir. **4a, 4b, 4d, 4h** bileşiklerinde ise kontrol grubu verilerine göre herhangi bir farklılık bulunmamıştır. İlginç olarak her iki enzim bakımından da gruplardaki artışların dozlara göre düzenli bir değişiminden söz edilememektedir. Çünkü bazı bileşiklerin 1 μM konsantrasyonunda en yüksek enzim aktivitesi bulunurken bazı bileşiklerin 50 μM konsantrasyon gruplarında en yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Ayrıca her iki enzimden elde edilen sonuçlar birbiriyle çok fazla örtüşmemektedir. Bu durumun kimyasalların uygulandığı hücre kültürü ortamlarının hazırlanması sırasında kullanılan besiyeri ve tamponlardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü literatüre göre çeşitli tuz solüsyonlarının paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerini etkilediği belirtilmektedir. Sodyum klorürün artan konsantrasyonlardaki ilaveleri PON1 aktivitesinde stimülasyon oluşturmalarına rağmen, ARE aktivitesi üzerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Eckerson 1983). Bu nedenle; PON1 aktivite ölçümlerinde 1 molar NaCl ilave edilirken, ARE ölçümlerinde NaCl kullanılmamaktadır. PON1 aktivitesi için pH'nın etkisi glisin ve Tris-HCl tamponları ile araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada Tris-HCl tamponu için optimal pH:11.2 olarak tespit edilirken (Mueller et al. 1983); bir başka çalışmada ise tam aktivasyon için optimal pH: 7.5-8 olarak belirlenmiştir (Mackness 1998). Aynı şartlarda

pH'nın 10.5 olması aktiviteyi yaklaşık % 26 oranında azaltmaktadır ($P < 0.05$). Ayrıca bu enzimler açısından farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçümleri yapılarak, sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Aktivite ölçümleri yapılırken absorbansın zamanla azaldığı dikkat çekmektedir (Gülcü ve Gürsu 2003). Bu yüzden her iki enzimle çalışılırken ortam şartlarının çok iyi stabilize edilmesi gerekmektedir ve hücre kültürü içeriklerine fazla müdahale edilemeyeceğinden dolayı, normalden büyük sonuçlar ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu yüzden fosfinik asit bileşiklerinin, meme kanseri hücrelerinde PON1 ve ARE değerlerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır. Ancak paraoksonaz ve arilesteraz gelecekte çok çalışılan ve ilgi çeken enzimler olacağından, çalışmamız kapsamında elde edilen paraoksonaz ve arilesteraz ölçümleri, gelecekte yapılacak hücre kültürü ve diğer çalışmalar için faydalı olacaktır.

Fosfinik asit bileşikleriyle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin *in vitro* antitümör düzeylerine ait elde ettiğimiz sonuçlar tablo 4.8-4.11 ve şekil 4.11-4.14 arasında verilmiştir. Bileşikler dozlara göre ve uygulandıkları zamana göre istatistiksel olarak farklı sonuçların ortaya çıkmasına sebep olmuşlardır. Aynı zamanda fosfinik asit bileşiklerinden bazılarında antitümör aktivitesi gözlenirken bazılarında aktivite olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlarımıza göre **4c**, **4e** ve **4f** fosfinik asit türevleri, MCF-7 kanser hücrelerinde hemen hemen tüm konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat periyotlarında antitümör aktivitesi göstermiştir. Diğer fosfinik asit türevlerinin de MCF-7 hücre hatlarında antiproliferatif etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Aynı zamanda çalışmamızda denediğimiz fosfinik asit türevlerinin HUVEC endotelial hücre hatları üzerinde de genellikle yüksek dozlu uygulama gruplarında antiproliferatif aktivitelere sahip olduğu görülmektedir. Dikkat çekici bir nokta olarak **4c** ve **4e** bileşiklerinin HUVEC hücre hatları üzerinde de, diğer kimyasallara nazaran daha etkili olduğu belirlenmiştir. Vasküler endotelial hücreler, buldukları yerler nedeniyle fizyolojik ve patolojik süreçlerde çok kritik rollere sahiptir (Meng et al. 2010; Xuan et al. 2014). Endotelial hücreler pek çok kimyasal ajan için primer hedef bölgelerdir. Pek çok antikanser kimyasal ajan endotelial hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitelerinden dolayı klinikte kullanılamazlar. Ancak uygulanan sentetik yada doğal bileşiğin sadece doza bağlı olarak HUVEC hücre hattında olumsuz etkileri olabilir. Nitekim propolis gibi çok yararlı olduğu bilinen doğal antioksidan maddelerin bile, kanser hücrelerini öldürdüğü görülürken aynı zamanda yüksek dozlarda HUVEC hücrelerinde de zararlı olduğu

gösterilmiştir (Xuan et al. 2014). Bu durumda araştırılan bileşiğin etkilerinin doza veya süreye bağlı olarak değişimi mutlaka belirlenerek ilaç olarak kullanımı kesinleştirilmelidir. Sentezlediğimiz bis(α -aminoalkil-fosfinik asit) bileşiklerinin apoptotik etkinliklerini belirlemek istediğimiz, hücre kültürlerinde büyüme analizleri ve morfolojik yapılarının incelenmesi sonucunda ise **4e**, **4h** ve **4g** kimyasallarının 100 μ M konsantrasyonda uygulandığı gruplarda hücre büyüme yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmiştir. Ayrıca **4e** kimyasalının 50 μ M konsantrasyonda uygulandığı gruptaki hücrelerde de büyüme yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlıdır. Hücrelerin morfolojileri ve gelişimleri inverted mikroskopta görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. Buradan elde edilen bulgular XTT kiti kullanarak, antiproliferatif aktivitelerini belirlemeye çalıştığımız deney sonuçlarını destekler ve netlik kazandırır niteliktedir. Çünkü fosfinik asit bileşiklerinin sitotoksik etkilerini araştırdığımız, XTT analizi sonucuna göre 8 farklı fosfinik asit bileşiğimizin de MCF-7 hücre hatlarında yüksek derecede etkili olduğu görülmektedir. Daha sonra yaptığımız hücrelerin morfolojik incelenmeleri ve büyüme grafiklerine göre **4e**, **4h** ve **4g** kimyasallarının esas etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Antitümör çalışmalarından elde edilen bulgularda, *in vitro* antioksidan testlerinden ve reaktif oksijen türlerini araştırdığımız testlerden gelen sonuçlarla uyumludur. Fosfinik asit bileşiklerinin apoptotik etkinliklerini karşılaştırdığımız AO/EB sonuçlarına göre, sadece **4e** bileşiğinin 50 μ M konsantrasyonunda MCF-7 hücrelerindeki çekirdek kondensasyonunu azalttığı, çekirdek bozunumlarını başlattığı yani apoptoz oluşumunun görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca **4e** ve **4h** bileşikleri, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulandıklarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman kaspaz-3 aktivitesinde artışlara sebep olmuştur ($P < 0.05$). Diğer bileşiklerin Kaspaz-3 aktivitesi üzerinde önemli ve anlamlı bir istatistiksel farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.14). Aynı zamanda **4e**, **4h** ve **4g** kimyasallarının da ancak yüksek dozlarda kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu gözükmemektedir. Çok yüksek dozlarda etkili olmaları hem de HUVEC hücre hatları üzerinde de etkili olmaları onların çok iyi niteliklerde antikanser özelliğinde olmadıklarını göstermektedir. Diğer taraftan apoptotik etkinlik bakımından da sadece **4e** bileşiğinde, Kaspaz aktivitesi bakımından da sadece **4e** ve **4h** bileşiklerinde aktivite bulunması da sadece bu 2 bileşiğin antitümör etkili olabileceğini ama zayıf kapasitede bir antitümör etkiye olabileceğini göstermektedir. Bu veriler ışığında **4e** ve **4h** bileşikleri dışındaki fosfinik asit bileşiklerimizin antitümör etkili olmadığı

söylenbilir. Ancak şu noktayı da hiç unutmamak gerekir ki: farklı doku ve organlardan köken alan hücrelerin metabolizma hızları, detoksifikasyon yetenekleri, oksidatif strese dayanıklılıkları ve yaşam süreleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle farklı hücre hatlarında aynı kimyasal maddenin lethal dozları farklılık göstermektedir. Bu yüzden test ettiğimiz fosfinik asit bileşiklerimizin, meme kanseri hücre hattından başka kanser hücre hatlarında da denemeleri yapılarak etkinlikleri hakkında karşılaştırmalar ortaya konmalıdır.

Antikanser ajan ve antibiyotik olarak da kullanılabilen topoizomeraz inhibitörleri, kanserle mücadelede oldukça önemlidir. Hücre bölünmesi esnasında DNA sarmalının düz iplikçikler halinde açılmasını sağlayan topoizomerazların inhibisyonu, bölünmeyi durdurarak hücrenin çoğalmasını engellemektedir (Potmesil and Pinedo 1995; Şen 2015). İnhibitör maddeler, topoizomeraz I ve topoizomeraz II türevi enzimlerin çalışmasını bozarak hücre çoğalmasını engellemekte, dolayısıyla kanserin ilerlemesini durdurmaktadır (Alibadi et al. 2004). Bu şekilde çalışan bir antikanser nitelikli topoizomeraz inhibitörü, hastalık sürecinde saç kaybı, kusma, mide bulantısı ve vücut direncinin düşmesi gibi negatif semptomları da azaltmaktadır (Zhang et al. 2012). Bu tez kapsamında yeni sentezlenen fosfinik asit türevlerinin topoizomeraz inhibitör etkisinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bu sayede ilaç adayı olan fosfinik asit bileşiklerinin apoptotik etki mekanizmasının belirli düzeyde aydınlatılması ve topoizomeraz inhibitörü olabilme nitelikleri literatüre kazandırılmıştır. Bu noktada, **4f** ve **4h** fosfinik asit bileşiklerinin Topoizomeraz I üzerinde hafif bir inhibisyon etkisi olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte **4e** ve **4h** fosfinik asit bileşiklerinin Topoizomeraz II'yi yüzde elliye yakın, **4a** bileşiğinin ise hafif olarak inhibe ettiği görülmektedir. Topoizomerazların ekspresyonu tümör ile bağlantılı olmamasına rağmen, kanserli dokularda normal dokulara göre daha yüksektir. Aynı zamanda yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde topoizomeraz I ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Korwek et al. 2012). Topoizomerazın inhibisyonu ile dolaylı yoldan oluşan DNA kırıkları transkripsiyonun durmasına sebep olmaktadır (Wu and Liu 1997; Şen 2015).

6. SONUÇ

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. Meme kanseri de dünya genelinde kadınları etkileyen en yaygın tümör tiplerindendir. Şu an için kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin büyük yan etkileri bulunmaktadır. Bu sebeple tedavide daha düşük yan etkilere sahip yeni kemoterapötiklerin araştırılmaları kanser çalışmalarının birincil konusudur (Poggi et al. 2001). Fizyolojik süreçte hücrelerin doğal bir ölüm şekli olan apoptozu (programlı hücre ölümü) uyaran anti-kanser ajanların kullanılması, yeni kemoterapötik ilaç geliştirilmesi çalışmalarında etkili bir yöntemdir. Bu sayede kanserli hücreler ölürken buldukları dokuya zarar vermemekte, ilacın yan etkileri azalmaktadır (Ellis et al. 1997). Organofosfor bileşikler özellikle fosfonik asitler, fosfinik asitler, bifosfonatlar, başta kanser olmak üzere pek çok hastalık tedavisinde terapötik amaçla kullanılan aktif fosfor grupları taşıyan bileşiklerdir. Bu bağlamda bizim çalışmamız da sentezlenmiş olan fosfinik asit bileşiklerinin çeşitli biyolojik özelliklerinin anlaşılması ve *in vitro* koşullarda hücre içinde çeşitli biyokimyasal süreçlerdeki etkinliklerinin belirlenmesi bakımından çok önemlidir. Çalışmamız kapsamında ilk olarak yeni sentezlenen fosfinik asit bileşiklerinin *in vitro* antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Genel olarak çalışmalarda bir maddenin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için bir veya birkaç farklı analiz yöntemi kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda 5 farklı antioksidan yöntem kullanılarak hem bileşiklerin daha net olarak antioksidan kapasitelerinin ortaya konulmasına çalışılmış hemde yöntemleri birbirleriyle karşılaştırmak mümkün olmuştur. *In vitro* antioksidan aktivite sonuçlarına göre 8 bileşikte farklı derecelerde aktif bulunmuştur. Sitotoksik aktivite ve *in vitro* antitümör çalışmalarında ise sentezlediğimiz fosfinik asit bileşiklerinin meme kanseri hücrelerinde ve normal endotelial hücrelerde uygulamaları yapılmıştır. Buna göre tüm fosfinik asit bileşiklerinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik olarak etkili

olduğu, özellikle **4c**, **4e** ve **4f** bileşiklerinin kuvvetli aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Ne yazık ki tüm bileşikler kanser hücrelerinin yanında aynı zamanda normal endotelial hücrelerinde de toksik etkili bulunmuştur. *In vitro* antitümör çalışmasında da mikroskop altında fosfinik asit bileşikleri uygulanmış MCF-7 hücreleri morfolojileri ve büyümeleri bakımından değerlendirilmiş, çeşitli boyama yöntemleri kullanılarak bileşiklerin apoptotik etkinlikleri değerlendirilmiştir. **4e**, **4h** ve **4g** fosfinik asitlerinin yüksek dozlarda kullanıldığı zaman antitümör aktivitelerinin olabileceği anlaşılmıştır. Özellikle **4e** bileşiğinin diğerlerine kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bileşenlerin apoptotik etkinliklerinin bir belirteci olarak kaspaz aktivitelerini araştırdığımızda, AO/EB boyaması sonuçlarına göre, sadece **4e** bileşiğinin apoptoz oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak **4e** ve **4h** bileşikleri de, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulandıklarında, kaspaz-3 aktivitesinde artışlara sebep olmuştur. Özellikle **4c**, **4e**, **4f**, ve **4h** maddelerinin iyi antioksidan aktivite ile birlikte sergilemiş oldukları iyi antitümör özellikleri bu bileşiklerin farmakolojik açıdan önemli bir biyoaktivite sergilediklerinin göstergesi olabilir. Son yıllarda üzerinde durulan konulardan bazıları da kanser kemoterapisi sırasında takviye olarak kişilere antioksidanların verilmesinin, antineoplastik etkinlik üzerindeki etkilerinin araştırılması yada antioksidan takviyelerinin kemoterapi sırasında oluşan yan etkilerin gelişimi üzerine etkileri olmaktadır. *In vitro* sistemlerde ve bazı hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlar, kemoterapi sırasında antioksidatif dozda vitaminlerin kullanılmasının yararlı olduğunu gösterse de halen klinik çalışmalar devam etmektedir. Burada en hassas nokta, dışarıdan verilen antioksidanlar, kullanılan kemoterapötik ajanın oksidatif stres yaratarak apoptozis yoluyla öldürmeye çalıştığı kanser hücrelerinin dejenerasyonunu, apoptoza gitmesini engellemelidir. Bununla beraber, eğer kemoterapötik uygulaması ile oluşan radikaller ilacın sadece yan etkilerinden sorumlu yani ilacın antineoplastik aktivitesinden sorumlu değilse, antioksidanların kullanımı ilacın yan etkilerinin en aza indirilmesi için yararlı olabilir. Diğer taraftan farelerde tümör hücrelerinde yapılan bazı çalışmalarda, E vitamini gibi bazı antioksidanların hücrelerdeki ROT ve DNA hasarını azalttığı ama aynı zamanda tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuç onkojenlerin tümörlerdeki ROT seviyesini, endojen antioksidanları aktive etmek yoluyla azalttığına yönelik geçmişteki düşünceleri değiştirmiştir. Bu yüzden günümüzde antioksidanların, hücrelerdeki ROT ve DNA hasarını azaltmak yoluyla tümör hücre proliferasyonunu

artırması neticesinde tümör büyümesine sebep olduklarına inanılmaktadır. Dolayısıyla antioksidan kullanımlarının, erken dönemdeki kanserlerde veya hastalık gelişmesi konusunda risk altında olan insanlarda güvenilir olmadığı sonucuna varılmıştır (Sayın et al. 2014). Bu nedenle oksidatif stres oluşturulan hücrelerde antioksidanların etkilerinin incelendiği ayrıntılı çalışmalara daha fazla yer verilmelidir (Kısmalı ve Sel 2012). Tam olarak bu noktada, bu tez çalışması ile sentezlenen bir seri fosfinik asit bileşikleri hem antioksidan özellikleri bakımından hem de antitümöral özellikleri bakımından birlikte bütün olarak incelenmeye çalışılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında sentezlenip farklı biyoaktif farmakolojik özelliklerini ortaya koymaya çalıştığımız bu araştırmanın mevcut literatür bilgisine katkı sağlayacağına inanmaktayız. Sentezlenen fosfinik asit bileşiklerinin bu çalışma kapsamında her tür hücre için kesin antioksidan ya da kesin oksidan madde oldukları netleşmiş olmasa da, ileriki çalışmalar için model moleküllerin seçimi ve tasarımında faydalanılabilecek nitelikte olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca sentezlediğimiz fosfinik asit bileşiklerimizin biyomalzeme ve biyouyumlu malzeme olma gibi özelliklerinin de araştırılarak sağlık ve/veya diğer endüstri sektörlerindeki katkılarının da değerlendirilmesi gerektiğine şiddetle inanmaktayız.

KAYNAKLAR

Abdel-Monem WR (2010) Synthesis and antimicrobial evaluation of some newpolyheterocyclic systems containing 1,2,4-triazine moiety. *European Journal of Chemistry* 1: 168-172

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor* 10: RA141-7

Abdou WM, Kamel AA, Khidre MD (2015) Design, Synthesis, and Antioxidant/Antidiabetic Activity of Nucleic Acid Bases Bearing Fused N,S-Heterocyclic Phosphor Esters. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 52: 1654–1662A

Akkus (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları Konya

Albayrak S, Sa dıç O, Aksoy A (2010) Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4): 401-409

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th Ed

Allen MC, Fuhrer W, Tuck B, Wade R, Wood JM (1989) Renin inhibitors. Synthesis of transition-state analogue inhibitors containing phosphorus acid derivatives at the scissile bond. *Journal of Medicinal Chemistry* 32: 1652-1657

Alibadi SH, Tabarzadi M, Zarghi A (2004) Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivatives. *Il Farmaco* 59: 645–649

Atherton FR, Hassal CH, Lambert R (1987) Synthesis and structure-activity relationships of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl)phosphonic acid and (aminomethyl)phosphonic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 30: 29-40

Aruoma OI (1998) Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(2): 199–212

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation* 101: 1581-1590

Aydın A, Yılmaz H (2007) Ditiyofosfonikasit O-alkil esterlerinin lantanit kompleksleri üzerine ara tirmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 1-106

Babine RE, Bender SL (1997) Molecular recognition of protein–Ligand complexes: applications to drug design. *Chemical Reviews* 97: 1359-1472

Baskol G, Köse K (2004) Paraoksonaz: biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi paraoksanase: biochemical features, functions and clinical importance. *Erciyes tıp dergisi (Erciyes Medical Journal)* 26: 75(2): 75-80

Bonarska D, Kleszczy ska H, Sarapuk J (2002) Antioxidative activity of some phenoxy and organophosphorous compounds. *Cellular & Molecular Biology Letters* Vol 7: 929 – 935

Breuil V, Euller-Ziegler L (2006) Bisphosphonate therapy in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 73: 349–354

Bukhari IH (2002) Preparation, Characterization and biological evaluation of Schiff-base metal complexes of some drug substances, Doktora Tezi, Bahauddin Zakeriya Üniv., Pakistan.

Burçak G, Andican G (2004) Oksidatif DNA hasarı ve ya lanma. *Cerrahpa a Tıp Dergisi* 35(4)

Burt RK, Poirier MC, Bohr VA (1991) Special article: Antineoplastic drug resistance and DNA repair. *Annals of Oncology* 2(5): 325-334

Bülbül D, Ark M (2011) Pirazol türevi bile iklerin olası anti kanser aktivitelerinin incelenmesi. Gazi Üniversitesi, Sa lık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı

Carr AC, Zhu BZ, Frei B (2000) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research* 87: 349-354

Cates LA, Li VS (1985) Phosphinic Acid analogues of methylaspartic and methylglutamic acids as antibacterials. *Pharmaceutical Research* 2: 135-136

Chopra S, Wallace HM (1998) Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology* 55: 1119–1123

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van-zanden J, Van bladeren PJ (2001) The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 141-152

Cole DJ (1985) Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: *The herbicide glyphosate*. (Grossbard, E. and Atkinson, D., Eds.) Butterworths, London, pp. 48-74

Collinsova M, Jiracek J (2000) Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine. *Current Medicinal Chemistry* 7: 629–647

Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmik W (1997) Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144-1152

Çankayalı I, Demira K, Eri O, Ersöz B, Moral AR (2005) The effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. *Advances Therapy* 22: 107-116

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997) Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3(4): 92-95

Çaylak E (2010) Çocuklarda kurun zehirlenmesi, oksidatif stres ve tiyol bileşiklerin antioksidan etkisi. *Çocuk Dergisi* 10(1): 13-23

Dandapani M, Zachariah A, Kavitha MR, Jeyaseelan L, Oommen A (2003) Oxidative damage in intermediate syndrome of acute organophosphorus poisoning. *Indian Journal Medical Research* 117: 253-9

Dani C, Mertelli E, Bertini G (2003) Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 88(2): 119-23

Dastan SD, Dastan T, Gulhan MF, Kirkbes A, Talas ZS (2014) Biochemical changes in muscle and gill tissues of rainbow trout treated with various concentrations of pollen extract. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences* 4(10): 540-544

Dastan T, Dastan DS, Atas M, Orek C, Koparir P, Parlak EA, Baral I, Koparir M, Cetin A (2016) Investigation of anti-proliferative and antioxidative effects of some bis (- amino) phosphinic acid derivatives. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* Vol.29, No.5(Suppl): September, pp.1853-1862

Deaton CM, Marlin DJ (2003) Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2, 3, 278-291

Dingwall JG, Campell CD, Baylis EK (1979) -Amino-phosphonous acids for inhibiting bacteria and yeast. *UK Pat. Appl* 542: 938-941

Dinis TCP, Madeira VC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161-169

Doyle A, Griffiths JB (1998) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley&Sons 57-61: 62-6456

Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN (1983) The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 35: 1126-1138

Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77

Ellis PA, Simit IE, Carthy MC, Salter DS (1997) Preoperative chemothreapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 349

Elmore S (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516

Elsa SH, Westergaard M, Burden DA, Lomenick JP, Osheroff N (1997) Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs. *Biochemistry* 36(29): 19-24

Erel O (2004) A Novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37: 112-119

Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38: 1103-11

Ergün S, Güneri P, Koca H (2008) Çene kemiklerinin yeni tehlikesi: bisfosfonatlar. *Cumhuriyet Üniversitesi Di Hekimliği Fakültesi dergisi* 11: 140-145

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymology* 186: 407-421

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879

Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 44: 147-59

Gan N, Smolen A, Eckerson W, La Du BN (1991) Purification of human serum paraoxonase/Arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition* 19: 100-106

Gancarz R, Wieczorek JS (1978) A Useful Method for the Preparation of 1-Aminoalkane phosphonic Acids. *Synthesis* 625

Gancarz R, Dudek M (1996) Structure-activity studies of aminophosphonic derivatives of fluorene. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* 114: 135-142

Gilard V, Martino R, Malet-Martino M, Niemeyer U, Pohl J (1999) Chemical stability and fate of the cytostatic drug ifosfamide and its N-dechloroethylated metabolites in acidic aqueous solutions. *Journal of Medical Chemistry* 42: 2542-2560

Gittens SA, Bansal G, Zernicke RF, Uludag H (2005) Designing proteins for bone targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1011-1036

Gouverneur V, Lalloz MN (1996) N-Hydroxy- -amino phosphonate derivatives as potential haptens for eliciting catalytic antibodies. *Tetrahedron Letters* 37: 6331-6334

Güle Ö, Eren Ü, (2008) Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* (2): 73-78

Gülcü F, Gürsu MF (2003) Paraoksonaz ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry* 28(2): 45-49

Gur M, Aslan M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Selek S, Erel O, Ozdogru I (2006) Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation* Nov 36(11): 779-87

Hahn M, Subbiah MT (1994) Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins. *Biochemistry and molecular biology international Journal* 33: 699-704

Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI (1987) The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165: 215-219

Halliwell B, Gutteridge JMC (2000) Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford New York

Hammer Q, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1, 4-9

Hande KR (2008) Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* 3: 13-26

Hartley B (1990) *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*

Harma M (2005) Oxidative stress in women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics&Gynecology* 192: 656-657

Harma M, Erel O (2003) Increased oxidative stress in patients with hydatiform mole. *Swiss Medical Weekly* 133(41-42): 563-6

Halliwell B, Gutteridge J (1996) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second Edition. Oxford: Clarandon Press

He XP, Xie J, Tang Y, Li J, Chen GR (2012) CuAAC Click Chemistry Accelerates the Discovery of Novel Chemical Scaffolds as Promising Protein Tyrosine Phosphatases Inhibitors. *Current Medical Chemistry* 19: 2399-2405

Heinecke IW, Lusis AJ (1998) Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?. *American Journal of Human Genetics* 62: 20-24

Hernandez AF, Pla A, Valenzuela A, Gil, F, Hougen HP, Villanueva E (1993) Paraoxonase activity in human pericardial fluid its relationship to coronary artery disease. *International Journal Legal Medicine* 105: 321-324

Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschimkus C, Jenkins AJ, Silink M, Donaghue KC (2006) Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *Journal of Diabetes and its Complications* 20(5): 322-8

Hsiang YH, Hertzbergj R, Hechtj S, LiuS L (1985) Camptothecin Induces Proteinlinked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry* 27: 14873-14878

<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16251643>

Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B (1993) Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 121: 257-62

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856

Hudson BJB (1990) Food antioxidants. Elsevier Applied Science, London and New York.

Hyun-Joon H, Gong-Shil N (1992) An efficient synthesis of anilinobenzylphosphonates. *Synthetic Communications* 22: 1143

Ishiguri Y, Yamada Y, Kato T, Sasaki M, Mukai K (1985) *Eur. Pat. Appl.*, EP 87 301807

Ishiguri Y, Yamada Y, Kato T, Sasaki M, Mukai K (1982) *Eur. Pat. Appl.*, EP 82-301905, *Chem. Abstr.*, 98, 102686

bilir S (2008) Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Edirne

James E, Eggers PK, Harvey AR, Dunlop SA, Fitzgerald M, Stubbs KA., Raston CL (2013) Antioxidant phospholipid calix[4]arene mimics as micellar delivery systems. *Organic & biomolecular chemistry* 11(36): 6108-6112

Janicke B (2012) Holographic time-lapse video showing live human prostate cells (DU145) undergoing apoptosis, induced by etoposide. *Phase Holographic Imaging AB*

Josept A, Knight MD (1999) Free radicals oxidative stress and cancer in free radicals antioxidants, aging and disease. Washington P. 304

Kaboudin B, As-Habei N (2003) Microwave-assisted synthesis of α -aminophosphinic acids from hypophosphorus acid salts under solvent free conditions. *Tetrahedron Letters* 44: 4243-4245

Kaboudin B, Haruki T, Yamagishi T, Yokomatsu T (2007) Diastereoselective Addition of α -Substituted α -Amino-H-Phosphinates to Imines Using $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ as an Efficient Lewis Acid Catalyst. *Tetrahedron* 63: 8199-8205

Kaboudin B, Haruki T, Yamagishi T, Yokomatsu T (2007) Diastereoselective Synthesis of Novel α -Amino- β -hydroxyphosphinates by Hydrophosphinylation of α -Amino-H-phosphinates to Aldehydes. *Synthesis* 20: 3226-3232

Kaboudin B, Jafari J (2008) One-Pot Synthesis of 1-Aminophosphinic Acids Using 50% Hypophosphorus Acid under Microwave Irradiation. *Journal of the Iranian Chemical Society* 5: 97-102

Kafarski P, Lejczak B, Tyka R, Koba L, Pliszcak E, Wieczorek P (1995) Herbicidal activity of phosphonic, phosphinic, and phosphonous acid analogues of phenylglycine and phenylalanine. *Journal plant growth regulation* 14: 199-203

Kafarski P, Lejczak B, Kukhar VP, Hudson HH (2000) Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. pp. 407-422. Eds. Wiley: New York

Kafarski P, Lejczak B (2001) Aminophosphonic acids of potential medical importance. *Current Medicinal Chemistry -Anti-Cancer Agents* 1: 301-312

Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F (2002) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202: 227-235

Kamel AA (2015) Phosphorus Compounds in Pharmaceutical Drugs and Their Rising Role as Antioxidants and Antidiabetics: A Review. *International Journal of Chemical and Biomedical Science* 1(3): 56-69

Kandepu NM (1999) Mannich bases of chalcones and cyclohexanones as candidate cytotoxic agents. Ottawa: University of Saskatchewan

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human & Experimental Toxicology* 30: 1119-40

Katoh K, Yoshino S, Kubota S, Wada Y, Ogata Y, Nakahama M, Arai M (2007) Effects of Organic Sulfur and Phosphor Compounds Used as Antioxidants on the Thermal Behavior of Nitrocellulose and its Decomposition Mechanism. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* 32(5): 406-410

Katoh M, Hiratake J, Kato H, Oda J (1996) Mechanism-based inactivation of *E. coli* - glutamylcysteine synthetase by phosphinic acid- and sulfoximine-based transition-state analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 1437-1442

Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA (1994) Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 33: 832-839

Kerr, JFR, Wyllie AHA, Currie R, "Apoptosis: abasic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics", *British Journal of Cancer*, 26, 239, 1972.

Kerr DJ, Wheldon TE, Kerr AM, Freshney RI, Kaye SB (1986) The effect of adriamycin and 4"-deoxydoxorubicin on cell survival of human lung tumour cells grown in monolayer and as spheroids. *British Journal of Cancer* 54:423-429

Keser S (2012) Civanperçemi (*achillea millefolium*), alıç (*crataegus monogyna*) ve bö ürtlen (*rubus discolor*)'den toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve oksidatif stres olu turulmu ratlarda bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ocak, Elazı

Kılınç K (1985) Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları, toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 10: 60-89

Kılıç I, Yesiloglu Y, Bayrak Y (2014) Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 130: 447-452

Kısmalı G, Sel T (2012) Paraquat ile olu turulmu oksidatif stresin hepg2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin ara tırılması. *Fırat Üniversitesi, Sa lık Bilimleri Veteriner Dergisi* 26(2): 79-85

Kleszczy ska H, O wi cimska M, Witek, S, Przystalski S (1998) Inhibition of lipid peroxidation in the erythrocyte membranes by quaternary morpholinium salts with antioxidant function. *Z. Naturforsch* 53c: 425-430

Kleszczy ska H, Sarapuk J, O wi cimska M, Witek S (2000) Antioxidative activity of some quaternary ammonium salts incorporated into erythrocyte membranes. *Z. Naturforsch* 55c: 976-980

Kleszczy ska H, Sarapuk J (2001) New aminophosphonates with antioxidative activity. *Cellular and Molecular Biology Letters* 6: 83-91

Kolodiazhnyi OI (2005) Asymmetric synthesis of hydroxyphosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry* 16: 3295-3340

Kovacic P (2003) Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stres. *Current Medical Chemistry* 10: 2705-9

Köse K, Dogan P (1992) Lipit peroksidasyonu. *Erciyes Üniversitesi, Tıp Dergisi, Ek1:* 340-350

Köse A, Gunay N, Kose B, Ocak AR, Erel O, Demiryurek AT (2010) Effects of atropine and pralidoxime pretreatment on serum and cardiac oxidative stress parameters in acute dichlorvos toxicity in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97: 249–255

Koparir P, Karaarslan M, Orek C, Koparir M (2011) Synthesis and In-Vitro Antimicrobial Activity of Novel Aminophosphinic Acids Containing Cyclobutane and 1,3-Thiazole. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 186(12): 2368-2376

Koparir P, Karaarslan M, Orek C, Koparir M (2012) Synthesis and Characterization of Novel Chiral (1*R*,2*R*)-1,2-Bis[5-(Aminomethylphosphinic Acid)-1,3,4-Thiadiazol-2-YL]Ethane-1,2-Diols. *Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 187(7): 864-870

Korwek Z, Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O (2012) Inhibition of TM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair (Amst)* 11: 864-73

Kukhar VP, Hudson HR (2000) *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity*. Wiley Chichester

Latajka R, Krezel A, Mucha A, Jewginski M, Kafarski P (2008) Conformational investigations of bis(α -aminoalkyl)phosphinic acids and studies of the stability of their complexes with Cu(II). *Journal of Molecule Structure* 87764-71

Lejczak B, Kafarski P, Gancarz R (1988) Plant growth regulating properties of 1-amino-1-methyl phosphonic acid and its derivatives. *Journal of Pest Science* 22: 263-275

Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000) *Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects*. *Journal of Medicinal Chemistry* 43: 305-341

Levine M (1997) New Concepts in Biology and Biochemistry of Ascorbic Acid. *The New England Journal of Medicine* 314: 892-901

Lichtenthaler R, Marx F, Kind OM (2003) Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *European Food Research and Technology* 216: 166–173

Li J, Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27

Liu F, Ooi VEC, Chang ST (1997) Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* 60: 763-771

- Lowe SW, Lin AW (1998) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485-495
- Lowitz BB, Casciato AD (2000) *Medical oncology & principles of cancer biology*.
- Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ (1998) Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *Journal of Bone and Mineral Research* 13: 1668-1678
- Lukaszewicz-Hussain A (2010) Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry Physiology* 98:145-50
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal Science of Food Agriculture* 86: 2046–2056
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN (1991) Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Letters* 286: 152-154
- Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN (1993) Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis* 104: 129-135
- Mackness MI, Arroll SI, Mackness B, Durrington PN (1997) Alloenzymes of paraonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 349: 851-852
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkei W, Durrington PN (1998) The effect of the human serum paraonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters* 423: 57-60
- Mackness MI (1998) Why plasma should not be used to study paraonase. *Atherosclerosis* 136: 195-196
- Mader MM, Bartlett PA (1997) *Binding Energy and Catalysis: The Implications for Transition-State Analogs and Catalytic Antibodies*. *Chemical Reviews* 97: 1281-1301
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613: 1–19
- Manda KR, Adams C, Ercal N (2010) Biologically important thiol in aques extract of spices and evaluation of their in vitro antioxidant properties. *Food Chemistry* 118: 589-593

McLean JA, Karadas F, Surai PF, McDevitt RM, Speake BK (2005) Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 141: 366-372

Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C (2008) Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Research- Mary Ann* 11(1): 113-27

Mazzacurati M, Graziano B, Carla Boga (2007) Advanced Studies on the Synthesis of Organophosphorus Compounds. *Dissertazione Finale, Alma Mater Studiorum Università Di Bologna* pp: 4

Mecoci P, Beal MF, Polidori MC, Cherubini A, Chiosne F (1997) Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain. *Molecular and Chemical Neuropathology* 31: 53-64

Medyantseva EP, Vertlib MG, Kutyreva MP, Khaldeeva EI, Budnikov GK, Eremin SA (1997) The specific immunochemical detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-ichlorophenoxyacetic acid pesticides by amperometric cholinesterase biosensors. *Analytica Chimica Acta* 347: 71-78

Meng N, Wu L, Gao J, et al (2010) Lipopolysaccharide induces autophagy through BIRC2 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* vol. 225 (1): 174-179

Meyer F, Laaziri A, Papini AM, Uziel J, Juge S (2004) A novel phosphorus-carbon bond formation by ring opening with diethyl phosphite of oxazolines derived from serine. *Tetrahedron* 60: 3593-3597

Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS (2006) Bis phosphonate-associated osteonecrosis a long term complication of bisphosphonate treatment. *The Lancet Oncology* 7: 508-14

Moonen K, Laureyn I, Stevens CV (2004) Synthetic methods for azaheterocyclic phosphonates and their biological activity. *Chemical Reviews* 104: 6177-6185

Moosun S, Joule JA, Bhowon GM, Lalloo JS (2012) Antibacterial, Antioxidant and Binding Studies of Some Novel Diaryl Sulphide Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 187: 1383-1400

Mosman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63

Mueller RF, Hosnung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG (1983) Plasma paraoxonase polymorphism. A new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *American Journal of Human Genetics* 35: 393-408

Murray RK, Granner DK, Mayes RA, Rodwell VW (1996) *Harper's biochemistry*. McGraw-Hill Medical U.S.A

Nadithea V, Baea YH (2010) Synthesis and characterization of hemoglobin conjugates with antioxidant enzymes via poly(ethylene glycol) cross-linker (Hb-SOD-CAT) for protection from free radical stress. *International Journal of Biological Macromolecules* 47: 603-613

Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten RI, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AI, Fogelman AM, La Du BN (1997) Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 2005-2019

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 9th International Supplement., Wayne Pa. M100-S9.

Nobi H, Gille L (2005) Staniek K. Intraselüler generation of reactive oxygen species by Mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 69: 719-723

Nurulain MS, Szegı P, Tekes K, Naqvı SNH (2013) Antioxiğants In Organophosphorus Compounds Poisoning. *Antioxiğants And Organophosphorus Poisoning arh Hig Rada Toksikol* 64: 169-177

Odaba o lu F, akır A, Süleyman H, Aslan A, Bayır Y, Halıcı M, Kazaz C (2006) Gastro protective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *I Ethnopharmacol* 103(1): 59-65

Odowara M, Tachi Y, Yamashita K (1997) PON1 polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 2257-2260

Orhan I., Ozcelik B, Sener B (2011) Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. *Turkish Journal of biology* 35: 251-258

Oruç EÖ, Üner N (1999) Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution* 105: 267-272

Oruç EÖ, Üner N (2000) Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127: 291-296

Ovalı E, Uçar F (2003) Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon 217: 7-16

Örek C, Koparır M (2012) Bazı aril-alkil diaminofosfinik asit türevlerinin sentezi ve karakterizasyonu. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 1-81

Palacios F, Alonso C, de los Santos JM (2004) Beta-phosphono-phosphinopeptides derived from beta-amino-phosphonic and phosphinic acids. *Current Organic Chemistry* 8: 1481-1496

Palaska E (2015) Antikanser ilaçlar. 2nd ed. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları

Parlak AE, Çelik S (2015) Bis-1,2,4- triazol içeren bazı mannich bazlarının biyolojik etkilerinin araştırılması. U ak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 1-92

Patron M, Dowsett M, Smith L (2001) Studies of apoptosis in breast cancer. *British Medical Journal* 322: 1528-15325

Pena-Llopis S (2005) Antioxidants as potentially safe antidotes for organophosphorus poisoning. *Current Enzyme Inhibition* 1: 147-56

Perkow W (1988) Wirksubstanzen der Pflanzenschutz und Schadlingsbekämpfungsmittel. Part II. (Parey, P. Ed.), Verlag, Berlin und Hamburg, p. 24

Poggi MM, Coleman CN, Mitchell JB (2001) Sensitizers and Protectors of Radiation and Chemotherapy. *Current Problems in Cancer* 25(6): 338-245

Possamai FP, Fortunato JJ, Agostinho J, Quevedo D, Wilhelm FF, Dal-Pizzol F (2007) Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23: 198-204

Potmesil M, Pinedo H (1995) Camptothecins: New Anticancer Agents. CRC Press, Boca Raton USA, 14-17

Prasad GS, Rao GN (2013) Synthesis of Biologically Active α -Aminophosphonates. *Journal of Modern Medicinal Chemistry* 1: 49-60

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290- 4302

Ranjbar A, Solhi H, Mashayekhi FJ, Susanabdi A, Rezaie A, Abdollahi M (2005) Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 88-91

Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* 157: 1415-1430

Rikans LE, Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochemica et Biophysica Acta* 1362: 116-127

Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JF (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10: 1003-1008

Robbins S, Cotran R, Kumar V (1992) Cellular injury and cell death. In: Jennifer Mitchell (Ed). *Pathologic Basis of Disease* WB Saunders Company 1-35

Sanders JM, Gomez AO, Mao J, Meints GA, Van Brussel EM, Burzynska A, Kafarski P, Gonzales-Pacanowska D, Oldfield E (2003) 3-D QSAR investigations of the inhibition of *Leishmania major* farnesyl pyrophosphate synthase by bisphosphonates. *Journal of Medical Chemistry* 46: 5171–5183

Sarac K, Orek C, Cetin A, Dastan T, Koparir P, Dastan SD, Koparir M (2016) Synthesis and In Vitro Antioxidant Evaluation of New bis - Aminoalkylphosphinic Acids Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* DOI: 10.1080/10426507.2016.1192620

Sayin VI, Ibrahim XM, Larsson E, Nilsson AJ, Lindahl P, Bergo OM (2014) Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Science Translational Medicine* 6: 221-225

Scalzo RL (2008) Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry* 107: 40–43

Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy J, Pierce JD (2005) A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses, *Intens. Critical Care Medicine* 21: 24-28

Schoneich C (1999) Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Experimental Gerontology* 34(1): 19-34

Schug KA, Lindner W (2005) Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate residues. *Chemical Reviews* 105: 67-114

Seyferth D, Marmor RS, Hilbert P (1971) Reactions of dimethylphosphono-substituted diazoalkanes. (MeO)₂P(O)CR transfer to olefins and 1,3-dipolar additions of (MeO)₂P(O)C(N₂)R. *The Journal of Organic Chemistry* 36: 1379-1386

Sezer F, en BG (2011) Bisfosfonatlar ve çene kemi i üzerine etkileri. Ege Üniversitesi Di Hekimli i Fakültesi, A ız, Di ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, 1-40

Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M (2007) Protective effects of alphatocopherol and N-acetylcysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 17: 109-15

Shawali AS, Parhangi C (1980) Hydrazidoyl holides in synthesis of heterocycles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 17833

Smith WW, Bartlett PA (1998) Macrocyclic Inhibitors of Penicillopepsin. 3. Design, Synthesis, and Evaluation of an Inhibitor Bridged Between P2 and P1. *Journal of the American Chemical Society* 120: 4622-4628

Soltaninejad K, Abdollahi M (2009) Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systemic review. *Medical Science Monitor* 15: RA75-90

Song O (2004) Oxidative Stress: a theoretical model or biological reality. *Comptes Rendus Biologies* 327: 649-662

Sun T, Hu C (2005) Antioxidant activites of buckweat extracts. *Food Chemistry* 90: 743-749

Sun J, Liu RH (2005) Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer letters* 20: 1-11

Suwalsky M, Benites M, Villena F, Aguilar F, Sotomayor CP (1996) Interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with cell and model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1285: 267-276

en M (2015) Bazı Sentetik Bile iklerin Topoizomeraz Enzimaktivitesi Üzerine Etkisi. Anadolu Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü 1-48

Tao W, Hangoc G, Hawes JW, Si Y, Cooper, S, Broxmeyer HE (2003) Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34(+) cells treated with etoposide. *Experimental Hematology* 31: 251-260

Thirumalai T, Viviyana Therasa S, Elumalai EK, David E (2011) Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle". *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 63-66

Thomas MJ (1995) The Role of Free Radicals and Antioxidants. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition* 35(1-2): 21-39

Tüzün C (1997) *Biyokimya*, 3. Baskı Palme Yayıncılık 151-187

Uzunhan S, Çelik AT(2014) *Heliotropium hirsutissimum*'dan elde edilen farklı ekstraktların fitokimyasal analizi ve biyolojik aktivitelerinin de erlendirilmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* 1-128

Quin LD (2000) *A Guide to Organophosphorous Chemistry*. Wiley Interscience

Wang X, Quinn PJ (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research* 38: 309-336

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. *The Journal of Clinical Investigation* 96: 2882-2891

Worms KH, Schmidt-Dunker M (1976) Phosphonic acids and derivatives. In *Organic Phosphorus Compounds*, Vol. 7; Kosolapoff, G. M.; Maier, L., Eds.; Wiley: New York

Wroblewski ST, Lin S, Hynes Jr, Wu H, Pitt S (2008) Synthesis and SAR of new pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazines as potent p38 MAP kinase inhibitors. In *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18: 2739-2744

Wu J, Liu FL (1997) Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Oxford University Press Nucleic Acids Research* 25: 4181-4186

Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F (2014) Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume Article ID 280120, 11 pages

Yardımcı AS, Özkan Y, Özkan E, Torun M, İmrek B (2003) The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* 338(1-2): 99-105

Yiotakis A, Georgiadis D, Matziari M, Makaritis A, Dive V (2004) Phosphinic peptides: synthetic approaches and biochemical evaluation as Zn-metalloprotease inhibitors. *Current Organic Chemistry* 8: 1135-1158

Ye Y, Liu M, Kao JLF, Marshall GR (2008) Design, synthesis, and metal binding of novel *Pseudo*-oligopeptides containing two phosphinic acid groups. *Biopolymer* 89: 72-85

Yoku AÖ (2012) Bazı Yeni 1,2,4-Triazol Türevlerinin Sentezi Ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kars

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

Yuan J, Shaham SS, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* Cell Death Gene *ced-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 β -Converting Enzyme. *Cell* 75: 641-652

Vaux DL, Flavell RA (2000) Apoptosis genes and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 12: 719-724

Velio lu 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

Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR (2004) Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorus insecticide poisoning. *Indian Journal of Pharmacology* 36: 76-9

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine* 18: 1639

ÖZGEÇM

1979 yılında Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve liseyi Sivas'ta tamamladı. 1999 yılında nönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. 2004 yılında, Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsüne başladı ve "Türkiye'deki Çevre sorunlarına karşı biyoloji öğretmenlerinin bakış açıları" konulu tez çalışmasını tamamlayarak mezun oldu. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Doktora Programına kayıt yaptırdı. Ailesel sebeplerden dolayı eğitimine bir süre ara verdi. 2014 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalına yatay geçiş ile kayıt yaptırdı. Evli ve bir çocuk babasıdır.