



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLK DEFA SENTEZLENEN 1,2,4-TRİAZOL SCHİFF BAZI BİLEŞİKLERİNİN
ANTİOKSİDAN, ANTİ-ELASTAZ VE ANTİ-TİROZİNAZ AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ

SİBEL EŞ

AĞUSTOS 2013

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLK DEFA SENTEZLENEN 1,2,4-TRİAZOL SCHİFF BAZI BİLEŞİKLERİNİN

ANTİOKSİDAN, ANTİ-ELASTAZ VE ANTİ- TİROZİNAZ

AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

SİBEL EŞ

AĞUSTOS 2013

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı,

.../.../....

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak KİMYA Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Murat YOLCU

Kimya Anabilim Dalı Başkan Vekili

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Yrd. Doç. Dr. Hakan BEKTAŞ

Yrd. Doç. Dr. Cengiz MUTLU

ÖZET

İLK DEFA SENTEZLENEN 1,2,4-TRİAZOL SCHİFF BAZI BİLEŞİKLERİNİN ANTIOKSİDAN, ANTI-ELASTAZ VE ANTI-TİROZİNAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

EŞ, SİBEL

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

AĞUSTOS 2013, 92 sayfa

Antioksidan, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bulunan savunma mekanizmasıdır. Serbest radikalleri nötralize etmek için kullanılırlar. Antioksidan aktivitesinin varlığı vücutta meydana gelebilecek çeşitli hastalıklara karşı savunma mekanizmasının var olduğunu gösterir.

Elastaz, akciğerde, damarda, lenflerde ve deride bulunan ve bağ dokunun önemli bir proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazdır. Anti-elastaz aktivitesi ciltte meydana gelen çeşitli hastalıkların oluşumunu engellemekte etkilidir.

Tirozinaz, bir oksijen oksidoredüktazdır. Tirozin ve dihidoksifenil alanine karşı spesifiktir. Bakır içeren bir enzimdir. Fenollerini gidermede üstün yeteneği

vardır. Anti-tirozinaz aktivitesi cildin, saçın ve gözün pigmentasyonunda etkilidir. Bitkilerde ve böceklerde melanin tabakası oluşturur.

Bu çalışmada ilk defa sentezlenen 1,2,4-Triazol Schiff bazı bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri, elastaz ve tirozinaz enzimi üzerine inhibitör etkileri spektrofotometrik olarak incelendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda 1,2,4-Triazol Schiff bazı bileşiklerinden **6** ve özellikle **8** bileşiklerinin antioksidan aktivite değerleri diğer bileşiklere oranla daha yüksek bulundu. Enzim inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde ise **1** bileşiğinin elastaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği ($IC_{50}=0,201\pm0,005699 \mu M$), anti-tirozinaz aktivite tayini sonucunda ise en yüksek **1** nolu bileşiğin ($IC_{50}=0,2747\pm0,008697 \mu M$) tirozinaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği bulundu.

Anahtar Kelimeler: 1,2,4-Triazol Schiff Bazı, Antioksidan, Enzim İnhibisyonu, Elastaz, Tirozinaz.

ABSTRACT

EŞ, SİBEL

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

AUGUST, 92 pages

Antioxidant is a defence mechanism in the human body preventing the occurrence of oxygen types and the damage generated by them. They are used for neutralizing free radicals. The presence of antioxidants activity indicates the presence of the defense mechanism against the various diseases in the human body.

Elastase in lungs, vein walls, lymphs and skin is a group of serine protease and it has the feature of discrimination of elastin which is an important protein of connective tissue. Anti-elastase activity is effective for preventing the occurrence of various diseases in skin.

Tyrosinase is an oxygen oxidoreductase. It is specific for tyrosine and dihydroxyphenil alanine. It is a copper containing enzyme. It has the superior ability to remove phenols. Anti-tyrosinase activity is effective for pigmentation of skin, hair and eye. It produces melanine layers on plants and insects.

In this study, activities of for the first time synthesized Schiff base compounds containing of 1,2,4-triazole, inhibitor effects on elastase and tyrosinase enzyme are investigated spectrophotometrically.

As the result of the study, antioxidant activity level of the compounds **6** and especially **8** which are Schiff base compounds containing of 1,2,4-Triazole are found higher extent to other compounds. It is also found that **1** compound inhibited the elastase enzyme at the highest rate ($IC_{50}=0,201\pm0,005699 \mu\text{M}$) and **1** compound ($IC_{50}=0,2747\pm0,008697 \mu\text{M}$) inhibited the tyrosinase enzyme at the highest rate when effects of enzyme inhibition are investigated.

Key Words: 1,2,4-Triazole Schiff Base, Antioxidant, Enzyme Inhibition, Elastase, Tyrosinase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca ve öncesinde yardımlarını benden hiç esirgemeyen arkadaşım Yasemin SAĞKAL'a, desteklerinden dolayı Rıdvan İLGÜN'e ve Nurşen DERE'ye, çevirilerde yardımlarını esirgemeyen Selvihan KIR'a ve Dr. Saygın Dinçer'e ve de her zaman yanımda olduğunu bildiğim Mehmet Ali KIR'a çok teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu proje, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Biriminin **FEN-BAP-C-220413-18** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller.....	1
1.1.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	2
1.1.2. Endojen Kaynaklar.....	3
1.1.2.1. Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri.....	3
1.1.2.2. Mikrozomal Elektron Transport Zinciri.....	3
1.1.2.3. Proteinler.....	3
1.1.2.4. Araşidonik Asid Döngüsünün Aktivasyonu.....	3
1.1.2.5. Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar.....	4
1.1.2.6. Fagositik Hücreler.....	4
1.1.2.7. Peroksizomlar.....	4
1.1.2.8. Plazma Membranı.....	4
1.1.2.9. Transizyon Metalleri.....	5

1.1.3. Eksojen Kaynaklar.....	5
1.1.3.1. İlaçlar.....	5
1.1.3.2. Metal İyonları.....	6
1.1.3.3. Kirleticiler.....	6
1.1.3.4. Radyasyon.....	6
1.1.4. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları.....	6
1.1.5. Serbest Radikal Türleri.....	8
1.1.6. Reaktif Oksijen Türleri.....	9
1.1.7. Hücredeki Reaktif Oksijen Kaynakları.....	11
1.1.7.1. Biyolojik Kaynaklar.....	11
1.1.7.2. Solunumsal Patlama.....	11
1.1.7.3. Radyasyon ve Çevresel Ajanlar.....	12
1.1.7.4. Antineoplastik Ajanlar.....	12
1.1.7.5. Stres.....	12
1.1.8. İntrasellüler Kaynaklar.....	13
1.1.9. Serbest Radikallerin Etkileri.....	13
1.1.9.1. Oksidatif Stres.....	14
1.1.9.2. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	16
1.1.9.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	18
1.1.9.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	19
1.1.9.5. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	20
1.2. Antioksidanlar.....	21

1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	22
1.2.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar.....	23
1.2.3. Enzimatik Savunma.....	24
1.2.3.1. Süperoksid Dismutaz (SOD).....	24
1.2.3.2. Mangansüperoksid Dismutaz.....	25
1.2.3.3. Cu/Zn Süperoksid Dismutaz.....	25
1.2.3.4. Ekstrasellüler Süperoksid Dismutaz.....	25
1.2.3.5. Nikel Süperoksid Dismutaz.....	25
1.2.3.6. Katalaz.....	26
1.2.3.7. Glutasyon Peroksidaz (GP _x).....	26
1.2.3.8. Glutasyon-S-Transferaz (GST).....	26
1.2.3.9. Glutasyon Redüktaz.....	27
1.2.4. Non-Enzimatik Antioksidan Savunma.....	27
1.2.4.1. Tokoferoller ve Tokotrienoller (E Vitamini).....	27
1.2.4.2. Askorbik Asid (C Vitamini).....	28
1.2.4.3. Karotinoidler.....	28
1.2.4.4. Polifenoller.....	30
1.2.4.5. Flavonoidler.....	30
1.3. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	31
1.3.1. Enzim İnhibisyonu.....	33
1.3.2. Tersinir Enzim İnhibisyonu.....	33
1.3.2.1. Kompetitif Enzim İnhibisyonu.....	33

1.3.2.2 Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	34
1.3.2.3. Unkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	35
1.3.3. Tersinmez Enzim İnhibisyonu.....	35
1.4. Elastaz Enzimi.....	35
1.5. Tirozinaz Enzimi.....	38
2. MATERYAL VE METOD.....	41
2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	41
2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
2.3. Deneylerde Kullanılan Organik Maddeler.....	42
2.3.1. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşikleri.....	42
2.3.2. Organik Maddelerin Hazırlanışı.....	44
2.4. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Tayini.....	44
2.5. Demir İndirgeme Gücü Tayini.....	44
2.6. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini.....	45
2.7. CUPRAC Yöntemiyle Radikal Giderme Aktivitesi Tayini.....	45
2.8. Anti-Elastaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	46
2.9. Anti-Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	46
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
3.1. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları.....	48
3.2. Demir İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları.....	50
3.3. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları.....	52
3.4. CUPRAC Yöntemiye Radikal Giderme Aktivitesi Tayini.....	54

3.5. Anti-Elastaz Enzim Aktivitesinin Sonuçları.....	56
3.6. Anti-Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Sonuçları.....	58
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	22
Tablo 1.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar.....	23
Tablo 3.1. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin DPPH Radikal Giderme Aktivitesinin Sonuçları.....	48
Tablo 3.2. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Demir İndirgeme Gücü Aktivitesinin Sonuçları.....	50
Tablo 3.3. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin ABTS Radikal Giderme Aktivitesinin Sonuçları.....	53
Tablo 3.4. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin CUPRAC Yöntemiyle Radikal Giderme Aktivitesinin Sonuçları.....	55
Tablo 3.5. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Anti-Elastaz Aktivitesinin Sonuçları.....	57
Tablo 3.6. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Anti-Tirozinaz Aktivitesinin Sonuçları.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması.....	6
Şekil 1.2. Moleküler Oksijen.....	9
Şekil 1.3. Oksijenin Suya İndirgenmesi ve Diğer Oksijen Türlerinin Oluşumu.....	10
Şekil 1.4. Nötrofil Membranı.....	11
Şekil 1.5. Lipid Peroksidasyonu.....	14
Şekil 1.6. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri.....	15
Şekil 1.7. Lipid Peroksidasyonu Parçalanma Ürünleri.....	17
Şekil 1.8. Protein ve Peptid Bağı Kırılması.....	18
Şekil 1.9. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	19
Şekil 1.10. Süperoksid Dismutazın Hidrojen Perokside Dönüşümü.....	24
Şekil 1.11. Katalaz Aktivitesi.....	26
Şekil 1.12. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi.....	28
Şekil 1.13. α -Tokoferol.....	28
Şekil 1.14. Tokotrienollerin Genel Yapısı.....	28
Şekil 1.15. C Vitamini Kimyasal Yapısı.....	28
Şekil 1.16. β -Karoten, Likopen, Lutein ve Zeaksantin Kimyasal Yapısı.....	30
Şekil 1.17. Temel Flavonoid Yapısı.....	31
Şekil 1.18. Enzim Substrat İlişkisi.....	32
Şekil 1.19. Kompetitif Enzim İnhibisyonu.....	34
Şekil 1.20. Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	34

Şekil 1.21. Unkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	35
Şekil 1.22. Tropokollojen Üçlü Heliks Yapısı.....	37
Şekil 1.23. Elastin Fibrilleri.....	37
Şekil 1.24. Tirozinaz.....	39

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
μmol	Mikromol
mM	Milimolar
μg/mL	Mikrogram / Mililitre
kDa	Kilo Dalton
K _m	Michaelis-Menten Sabiti
mg/mL	Miligram / Mililitre
μg	Mikrogram
M	Molar
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre

1. GİRİŞ

1.1. SERBEST RADİKALLER

Atom, nötron ve protonlardan oluşan bir çekirdek ile bu çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan meydana gelir. Atomlardaki elektronlar, orbital olarak bilinen belirli enerji seviyelerinde bulunurlar. Her bir orbital, zıt spinli en çok iki elektron tutabilir. Bu şekilde stabil olan atomlar, stabilitelerini koruyabilmek ya da daha stabil hale gelebilmek için yörüngelerindeki elektron sayılarını tamamlarlar. Serbest radikaller dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom, iyon veya moleküller olarak tanımlanabilirler [1]. Serbest radikalın eşleşmemiş elektronu bulunduğu atom veya grubun üzerinde ya da yanında bir nokta (.) ile gösterilir [2, 3]. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için radikallerin reaktivitesi çok yüksektir [4]. Serbest radikaller, kısa ömürlüdürler ve elektriksiz olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler [5, 6]. Serbest radikaller kimyasal olarak kararsız yapıdadırlar ve stabil hale geçebilmek için eşleşmemiş elektronlarını paylaşmak üzere diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler. Serbest radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme devam eder. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir [5]. Oksijenin önemi genel olarak serbest oksijen radikalleri, kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasının ortak elektronlardan birini alarak bölünmesi, elektron eklenmesi ya da elektron kaybolması ile meydana gelirken, biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi sonucu oluşur [7]. Oksijen kullanan her organizmada, gerçekleşen reaksiyonların bir sonucu olarak serbest radikaller üretilmektedir. Hem oksijen kaynaklı serbest radikaller (ROT) hem de azot kaynaklı serbest radikaller (RAT), biyolojik sistemlerde çift taraflı etkilidir, yani hem yararlı etkileri hem de zararlı etkileri vardır. Serbest radikaller, yüksek konsantrasyonlarda oluştukları takdirde, membran lipidleri, protein ve nükleik asitlerin yıkımına yol açabilecek şekilde zararlı olabilmektedirler. Bu etkileri de antioksidan enzimlere ek olarak non-enzimatik antioksidan sistemler sayesinde dengelenmektedir [8, 9].

Oksijenin radyasyona maruz bırakılan hayvan ve bakteri hücre kültürlerindeki radyasyon hasarını arttırdığı saptanmıştır [10]. Moleküler oksijenin oksidasyon yeteneği nispeten az olmasına rağmen süperoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerinin aktivitesi çok daha yüksektir. Yüksek radikal konsantrasyonunda, bu reaktif türlerini uzaklaştıracak antioksidan sistemleri yetersiz kalmakta ve özellikle doymamış yağ asitleri oksidasyona uğramaktadır. Dolayısıyla yüksek lipid içeriğine sahip olan sinir ve membran dokuları yüksek oksijen konsantrasyonunda kolayca oksidatif hasara uğramaktadır [11]. Dengenin serbest radikaller lehine bozulmasına oksidatif stres denilmektedir.

1.1.1. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

Moleküler oksijen, elektron konfigürasyonu dolayısıyla reaktif değildir. Oksijen elektron vererek veya enerjiyle aktive olur. Ancak oksijen molekülüne enerji ya da elektron sağlanmasından sonra bu sınırlama ortadan kalkar ve reaktif türlerin oluşması kendiliğinden gerçekleşir. Geçiş metal iyonları (Fe^{2+} , Cu^{2+}) gibi elektron donörleri ile bu reaksiyonlar gerçekleşir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu enzimatik ve nonenzimatik olabilir.

ROT'lar, aynı zamanda kloroplastlarda, mitokondride ve plazma membranındaki elektron transport zincirinde yan ürünler olarak da meydana gelebilirler [12].

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyonla adenzotriphosfat (ATP) üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken birtakım tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Serbest radikal kaynakları biyolojik, hücre içi sıvısı veya toksik maddeler olabilir. Bu kaynaklar endojen ve eksojen olmak üzere iki genel başlık altında sınıflandırılabilir.

1.1.2. Endojen Kaynaklar

1.1.2.1. Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri

Mitokondri, hücre solunumunun gerçekleştiği organeldir. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijenin %95'i suya indirgenirken %1-5 kadarı süperoksit yapımında kullanılır. Bunun nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır [13, 14].

1.1.2.2. Mikrozoal Elektron Transport Zinciri

Endoplazmik retikulumda ve nükleer membranlarda birçok P₄₅₀ ve flavin mono oksijenaz (FMO) enzim sistemleri bulunur. Bu enzim sistemleri doymamış yağ asitlerini ve organizma için yabancı olan maddeleri okside ederek serbest radikal oluştururlar [15].

1.1.2.3. Proteinler

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arginin, glisin gibi çok sayıda amino asid bakiyesinden veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonil türevleri oluşur. Ayrıca serbest radikaller proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olurlar [16].

1.1.2.4. Araşidonik Asid Döngüsünün Aktivasyonu

Araşidonik asid döngüsü reaktif oksijen türlerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Fagositik hücrelerin uyarılması ile fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asid salınımına neden olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile serbest radikal ürünler açığa çıkar [17].

1.1.2.5. Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar (Travma, İskemi, Reperfüzyon)

Metabolizmada her an serbest radikal üretimi vardır. Ancak üretilen bu serbest radikaller endojen ve eksojen antioksidan sistemler tarafından elimine edilir ve bir denge oluşur. Eğer denge serbest radikaller lehine bozulacak olursa buna oksidatif stres adı verilir. Travma, çoğu zaman kinetik, termal veya kimyasal enerjinin dokulara transferi ile yapısal hasar oluşturmasından kaynaklanır. Normal homeostatik mekanizmaların kaybına, fizyolojik gereksinimlerin artmasına ve anormalleşmesine neden olur.

1.1.2.6. Fagositik Hücreler

Fagositik hücreler, enfeksiyona karşı vücudun hücresel cevabını başlatan hücrelerdir. Bu hücreler: nötrofiller, monositler ve makrofajlar, eozinofiller, lenfositler, endotelial hücrelerdir. Fagositik hücreler, fagositoz sırasında bakterileri öldürmek için hidrojen peroksit veya hipokloröz asit meydana getirirler.

1.1.2.7. Peroksizomlar

Oksidazların yüksek derişimlerde bulunmalarından dolayı hücresel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapılar; D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-alfa-hidroksi asit oksidaz ve açil CoA (koenzim A) oksidaz olup, bunlardan oldukça fazla miktarda bulunurlar [18].

1.1.2.8. Plazma Membranı

İntrasellüler olarak ortaya çıkan serbest radikaller, hücrenin diğer bölümleriyle reaksiyona girebilmek için ya plazma membranını geçmek durumundadırlar ya da toksik reaksiyonları membranda başlatmalıdırlar. Membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler, gliserol ve steroller, okside olabilen amino asit içeren membran proteinleri, serbest radikal hasarına karşı duyarlıdırlar. Serbest radikaller tarafından başlatılan lipid

peroksidasyonu veya yapı proteinlerinin oksidasyonu, membran iyon geçirgenliğinin bozulmasına, sekresyon fonksiyonlarında kayıplara ve hücre içi metabolik olayların inhibisyonuna neden olabilir.

Plazma membranında bulunan lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde bulunan NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin kaynaklarıdır. Fagositoz esnasında, oksijen tüketimi artışı ile oksijenden süperoksid dolayısıyla hidrojen peroksid açığa çıkışı da artar. Bu nedenle fagositik hücrelerin plazma membranları NADPH oksidazın aracılık ettiği serbest radikal üretiminde önemli bir kaynaktır. Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı olan enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asidin biyolojik olarak etkili ürünlere (prostaglandinler, lökotrienler, tromboksanlar) dönüşümü sırasında serbest radikaller meydana gelir [17].

1.1.2.9. Transizyon Metalleri

Bakır ve demir gibi geçiş metalleri oksido-redüksiyon reaksiyonlarında rol alırlar. DNA (Deoksiribonükleik asid), protein ve lipidlere elektron taşıyarak oksidatif hasarı hızlandırır. Hücre lizisi sonucu hücre içinde ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanan demir ile yapısında bakır bulunan seruloplazmin proteinlerinin yıkımıyla demir ve bakır serbest hale geçer. Bunun sonucunda çevre dokulara salınan Fe ve Cu katalizör işlevi görerek oksidatif hasarı artırır [15]. Metal iyonları aynı zamanda lipid peroksidlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize eder. Böylece radikal zararını artırır.

1.1.3. Eksojen Kaynaklar

1.1.3.1. İlaçlar

Herbisitler, pestisitler, parasetamol, aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klosapin, 3,4-metilendioksi

metamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antidepresanlar ve troglitazon serbest radikal oluşumuna yol açan ilaçlardır [19].

1.1.3.2. Metal İyonları

Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom ve civa iyonları serbest radikal oluşumuna neden olurlar [19].

1.1.3.3. Kirleticiler

Asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbonmonoksit, nitrik oksid, azot dioksit, silika, bazı çözücüler, toksinler, hipoklorid, kükürt dioksit, parakuat, dikuat, plumbagin ve juglone gibi kirleticiler serbest radikal kaynaklarındandır [19].

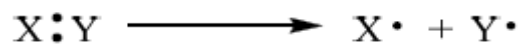
1.1.3.4. Radyasyon

Ultraviyole ışık, X ışınları ve gama ışınları da radikal oluşumuna neden olurlar [19].

1.1.4. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUM MEKANİZMALARI

Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücrede koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur [20]:

- a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır.



Şekil 1.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması [5]

- b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin, askorbik asit ve tokoferol gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.
- c) Normal bir molekülde tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi oluşturur.

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler. Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri 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 katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [5].

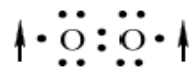
1.1.5. SERBEST RADİKAL TÜRLERİ

Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Reaktif Türleri
Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Oksijen Türleri
Singlet Oksijen (O_2^{\downarrow})	Ozon (O_3)
Süperoksit Radikali (O_2^{\bullet})	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksi Radikali (HO^{\bullet})	Organik Peroksitler ($ROOH$)
Alkoksil Radikali (RO^{\bullet})	Peroksinitrit Radikali ($ONOO^{\bullet}$)
Peroksil Radikali (ROO^{\bullet})	Peroksinitrik asit ($ONOOH$)
Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\bullet})	Peroksonitrat (O_2NOO^{\bullet})
Karbonat Radikali (CO_3^{\bullet})	Peroksomono karbonat ($HOOCO_2^{\bullet}$)
Karbondioksit Radikali (CO_2^{\bullet})	Hipobromik asit ($HOBr$)
	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Reaktif Klorür Türleri	Reaktif Klorür Türleri
Klor radikali (Cl^{\bullet})	Hipoklorik Asit ($HOCl$) Klor gazı (Cl_2)
	Nitril klorit (NO_2Cl) Brom klorür ($BrCl$)
	Kloraminler Klordioksit (ClO_2)
Reaktif Brom Türleri	Reaktif Brom Türleri
Brom radikali (Br^{\bullet})	Hipobromik Asit ($HOBr$)
	Brom gazı (Br_2)
	Brom klorür ($BrCl$)
Reaktif Azot Türleri	Reaktif Azot Türleri
Azot Dioksit (NO_2^{\bullet})	Nitrik asit (HNO_3) Peroksinitrat ($OONOO^{\bullet}$)
Nitrat Radikali (NO_3^{\bullet})	Nitrosil katyonu (NO^+) Nitril klorit ($ClNO_2$)
Nitrik Oksit (NO^{\bullet})	Nitrosil anyonu (NO^-) Peroksinitrit ($OONO^{\bullet}$)
Diazot Trioksit ($N_2O_3^{\bullet}$)	Nitronyum katyonu (NO^{2+}) Dinitrojen trioksit (N_2O_3)
	Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4)
	Alkil peroksinitritler ($ROONO$)
	Alkil peroksinitratlar (RO_2NO_2)
	Peroksiasetil nitrat ($CH_3C(O)O_2NO_2$)
	Peroksinitrik asit ($ONOOH$)

1.1.6. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, radikal olan ve olmayan oksijen merkezli türler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Radikal olanlar süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$), hidroksi radikali ($\cdot OH$), alkoksi radikali ($RO\cdot$) ve peroksi ($ROO\cdot$) radikalidir. Radikal olmayanlar ise singlet oksijen (O_2^1) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2). Diğer reaktif türler ise nitrik oksit ($NO\cdot$), nitrik dioksit ($NO_2\cdot$) ve peroksinitrit ($OONO\cdot$) gibi azot bileşikleridir. Singlet oksijen ve hidrojen peroksit gibi biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri, radikal olmasalar bile serbest radikallerle ilintilendirilmiştir. Serbest radikal, atomik veya moleküler orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerir. Serbest radikaller genellikle stabil olmayan, yüksek reaktivite gösteren, enerji yüklü moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri veya serbest radikaller prooksidatif enzim sistemleri, lipid peroksidasyonu, irradyasyon, enflamasyon, sigara içilmesi, hava kirlenmeler ve glikoksidasyon sonucu oluşabilir [20, 21].

Moleküler oksijen (O_2), iki kovalent bağ yapmasına rağmen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. Dış orbitallerinde bulunan iki elektron, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken molekül minimum enerji seviyesindedir [22]. Serbest radikal tanımına göre oksijen bir diradikal olarak değerlendirilir. Diradikal oksijen, spin kısıtlanmasından dolayı radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer [23].

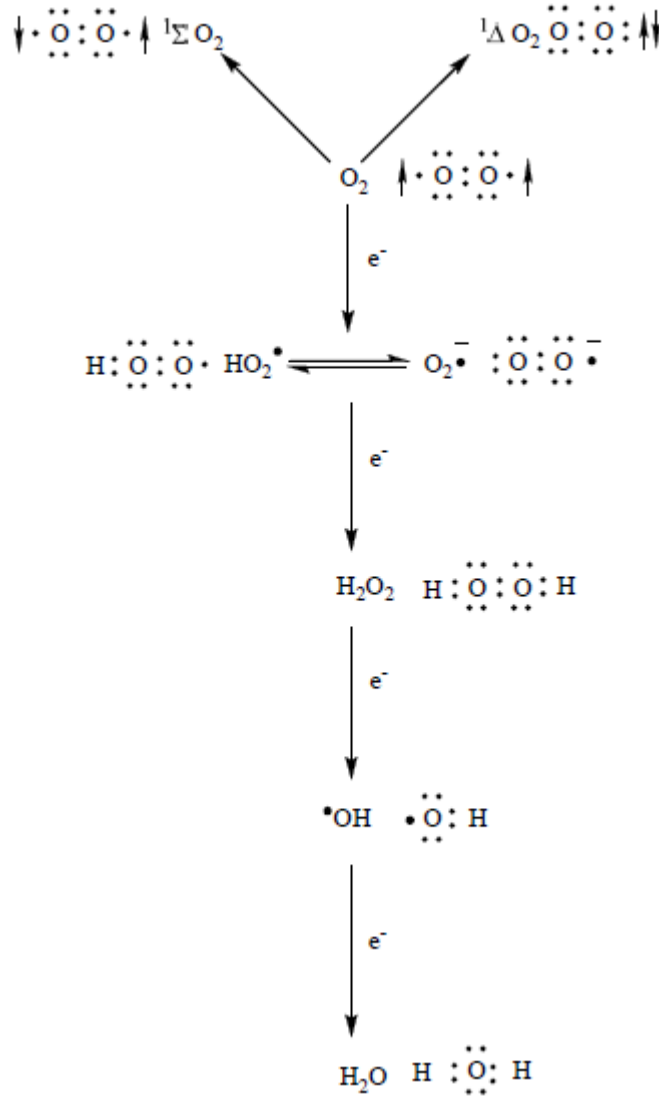


Moleküler O₂

Şekil 1.2. Moleküler Oksijen [23]

Organizmada pekçok oksidaz ve oksijenazın aktif merkezlerinde bulunan geçiş metalleri (Cu^{+2} , Fe^{+3} gibi) vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektron transferi suretiyle oksijenin spin kısıtlanması aşılabilir. Spin kısıtlanmasını aşmanın diğer bir yolu, enerji absorpsiyonu ile oksijenin uyarılmış hale geçmesidir [24]. Bunun sonucu singlet oksijen oluşur.

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. Bunlar arasında süperoksit radikali, hidroksil radikali ve radikal olmayan hidrojen peroksit reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinirler.



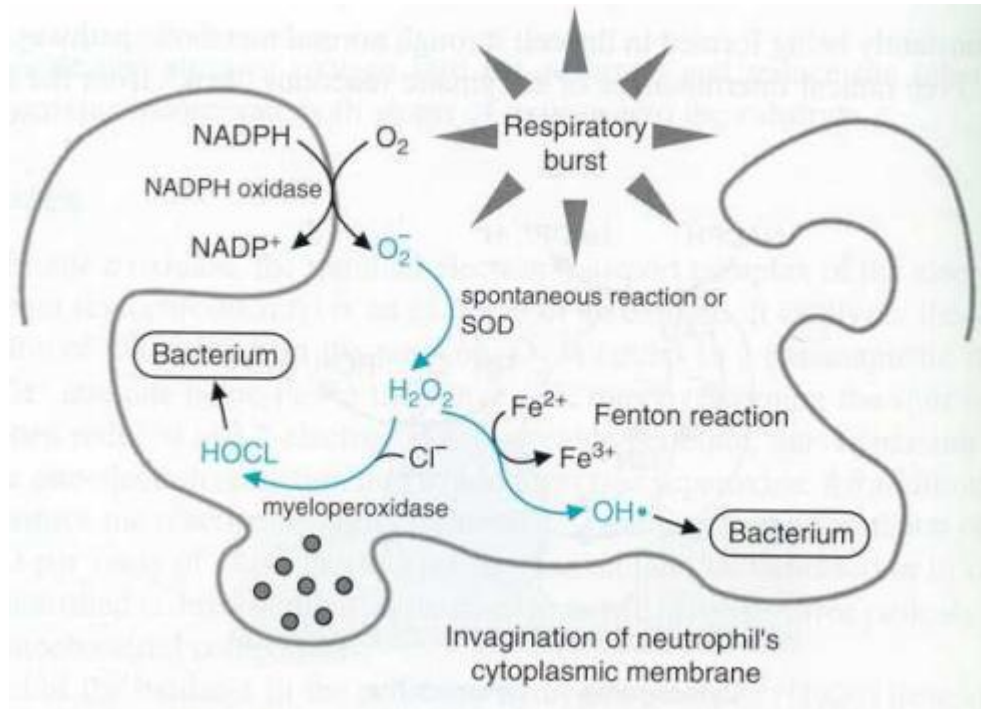
Şekil.1.3. Oksijenin Suyu İndirgenmesi ve Diğer Oksijen Türlerinin Oluşumu [24]

1.1.7. Hücredeki Reaktif Oksijen Kaynakları

1.1.7.1. Biyolojik Kaynakları

1.1.7.2. Solunumsal Patlama

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasını sağlayan ve enfeksiyona karşı vücudun hücrel cevabını başlatan hücrelerdir. Fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizma, bakteri bu ürünlerin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar.



Şekil.1.4. Nötrofil Membranı [70]

1.1.7.3. Radyasyon ve Çevresel Ajanlar

Hava kirliliği, pestisitler, sigara dumanı, çözücüler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar serbest radikal oluşumuna neden olurlar.

1.1.7.4. Antineoplastik Ajanlar

Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicin, adrioxmicine bunlardandır. Antikarsinojen bir ajan olan doxorubicin hücrenin DNA replikasyonunu inhibe eder. Bu sırada H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ oluşumuna ve sonuçta lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar [25, 26].

1.1.7.5. Stres

Sinirsel uyarılar katekolaminlerin sentezinde artış yapar [27]. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogeneziindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir [5].

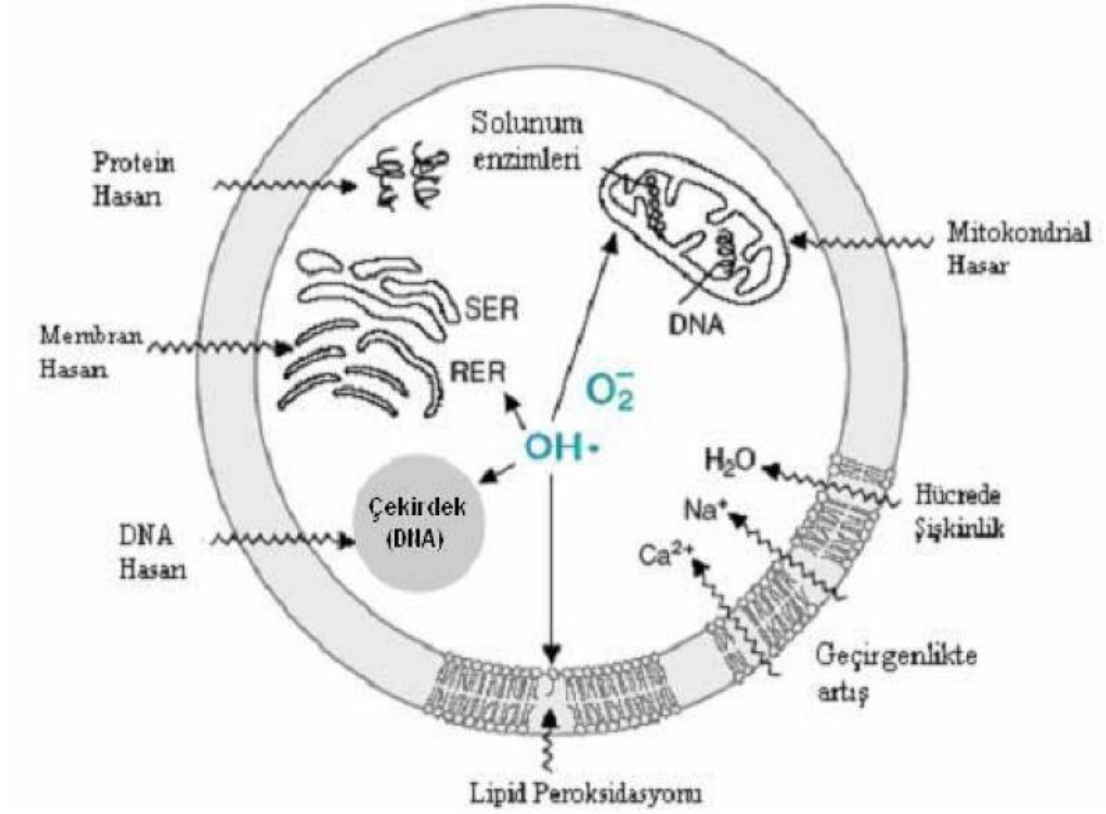
1.1.8. İntrasellüler Kaynaklar

- a) Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zincirinden sızıntıdır. Hücrelerde kullanılan oksijenin büyük bir kısmı (yaklaşık %95) mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri ile dört elektron alarak suya indirgenir. Bu sistemde olan elektron sızıntısı sonucu oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikalini üretebilir [28].
- b) Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.
- c) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, katekolaminler, tetrahidrofolatlar, flavinler gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikali kaynağıdır.

- d) Birçok enzimin (ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi) katalitik döngüsü sırasında H_2O_2 ve O_2^- ortaya çıkar [27].
- e) Özellikle demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda oksidoredüksiyon reaksiyonlarında yer alırlar. Bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizörler olarak iş görürler. Demir ve bakır özellikle tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve O_2^- den $\cdot OH$ sentezini katalizler.
- f) Toksik maddeler çeşitli etkilerle hücrede serbest radikal üretimini arttırmalar; toksinin kendisi bir serbest radikaldir, toksin bir serbest radikale metabolize olabilir veya toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.
- g) Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Araşidonik asit, membran yapısında bulunan, önemli fizyolojik fonksiyonları olan eikozanoidler ailesinin sentezinde başlangıç maddesi olan 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asididir. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu plazma membranındaki araşidonik asit serbestleşir ve enzimatik oksidasyonla çeşitli serbest radikal ana ürünleri meydana gelir [5].

1.1.9. Serbest Radikallerin Etkileri

Güçlü reaktif özelliğe sahip olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşebilirler. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyon başlatır.



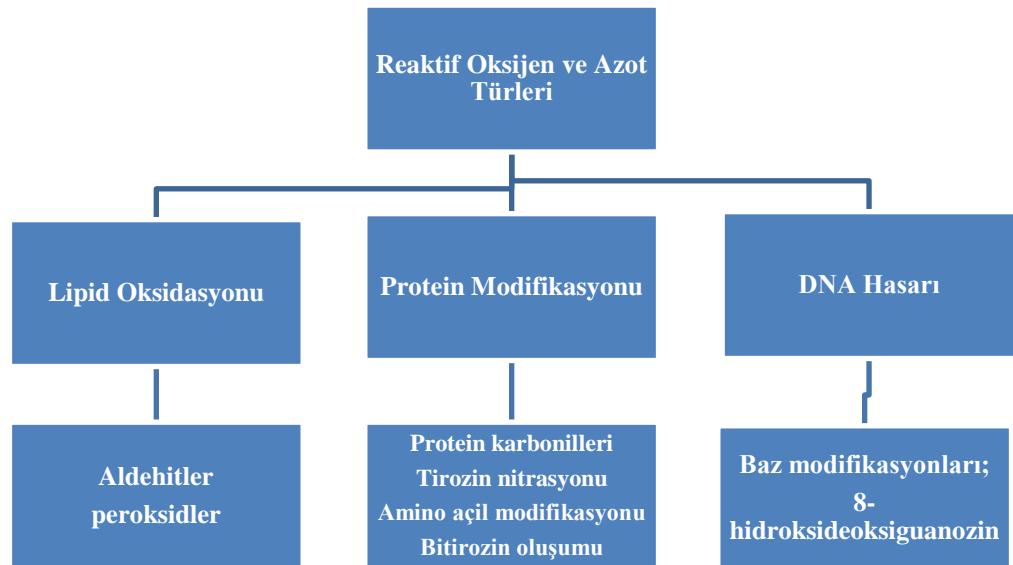
Şekil 1.5. Lipid Peroksidasyonu [25]

1.1.9.1. OKSİDATİF STRES

Organizmada sürekli reaktif oksijen ve azot türleri (ROT ve RAT) üretilmekte, buna karşılık antioksidan sistem tarafından istenilmeyen bu etkiler giderilmektedir. Bu durum bir denge halinde süreklilik arz eder. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması durumu ise “Oksidatif Stres” olarak değerlendirilir. Oksidatif stres durumunda reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarında artış olur ve dolayısıyla bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere metabolizmadaki birçok sistem olumsuz etkilenir [39]. Olumsuz etkilenen bu sistemler, diğer periferik sistemleri de etkilerler. Bu durum zincirleme olarak, radikalik zincir reaksiyonu sonlanıncaya kadar antioksidan sistem tarafından prosesin bir yerinde devam eder. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olurlar [29].

Yüksek konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri hücre yapıları, nükleik asitler, lipidler ve proteinlerdeki hasarın önemli bir işaretçisi olabilirler. Hidroksil radikalının DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği ve purin ve pirimidin bazlarına ve aynı zamanda deoksiriboz iskelete de zarar verdiği bilinmektedir [30]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak baz hasarları gösterilmektedir. Cu^{2+} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en fazla ölçülen baz hasarı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir (8-OHdG). 8-OHdG, oksidatif DNA baz hasarının bir biogöstergesi olarak kabul edilmektedir [31]. Oksidatif hasar sonucu genetik materyalin kalıcı hasarı, mutajenez, karsinojeniz ve yaşlanmanın ilk adımıdır.

Metal indüksiyonlu ROT'lar, yalnızca DNA'ya değil oksidasyona son derece duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitleri ve fosfolipid kalıntıları gibi diğer hücrel komponentlere de saldırırlar [32]. Lipid peroksidasyonunun majör aldehit ürünün malondialdehitten (MDA) çok 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)' dir. MDA, bakteri ve memeli hücrelerinde ve sıçanlarda karsinojenik özellik gösteren bir maddedir. HNE zayıf mutajenik özellik gösterir, fakat lipid peroksidasyonunun ana toksik ürünüdür.



Şekil 1.6. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri [29]

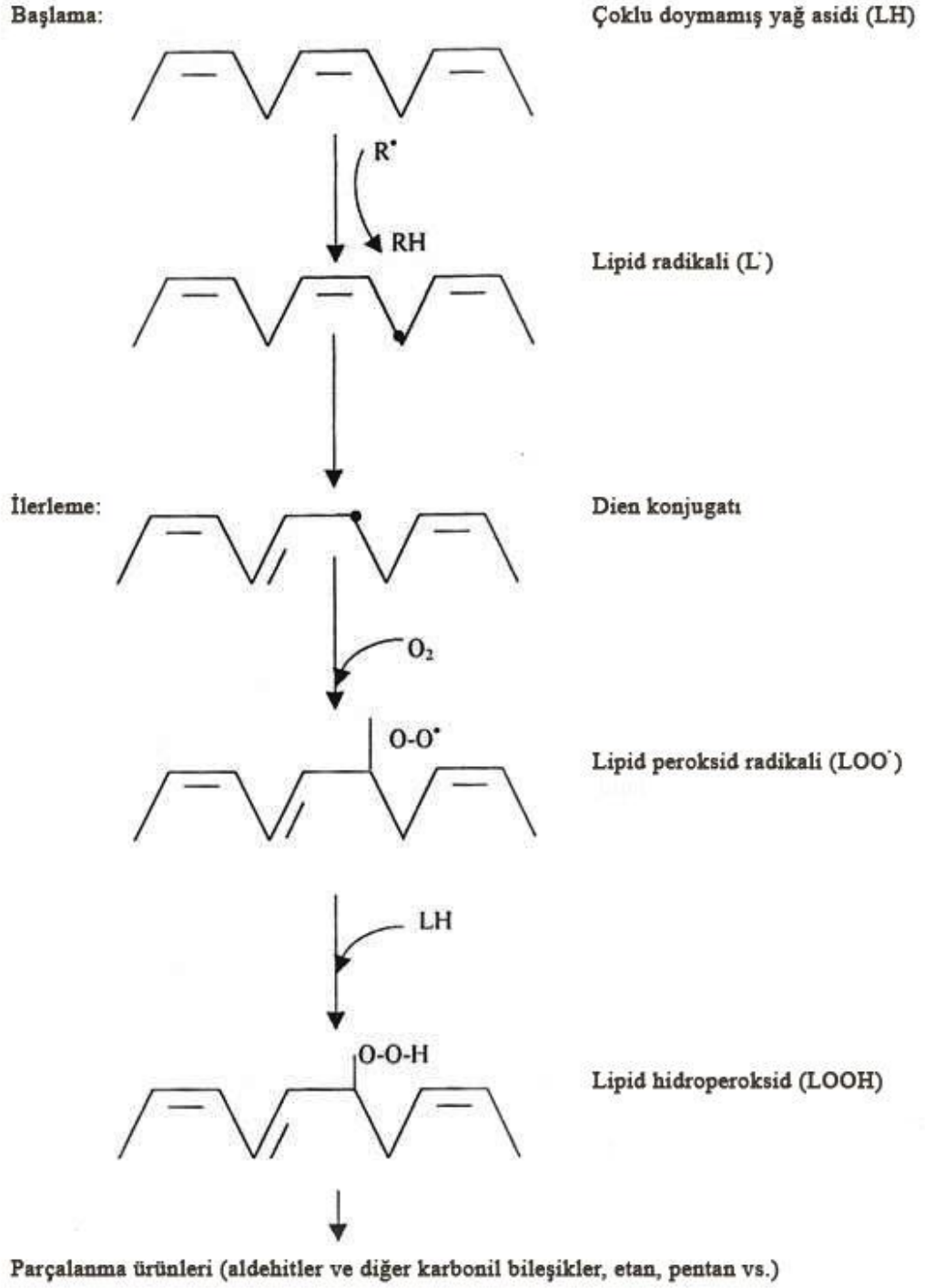
1.1.9.2. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki ve gıdalardaki kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller etkisi ile oksidatif yıkımı nonenzimatik lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle $\cdot\text{OH}$ radikalinin, membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerindeki (PUFA) konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar (radikalik reaksiyonun başlama aşaması). Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali ($\text{L}\cdot$) niteliği kazanır. Molekül içi bir düzenleme ile daha kararlı olan konjuge dienler oluşur. Aerobik şartlarda, konjuge dienin moleküler oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksil radikalleri ($\text{LOO}\cdot$) oluşur. $\text{LOO}\cdot$ oluşumu önemlidir, çünkü membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin ($\text{L}\cdot$) oluşumuna yol açar. Kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlere (LOOH) dönüşür. Ayrıca membran proteinlerine de saldırabilir. Böylece reaksiyon otokatalitik olarak devam eder. Bu lipid peroksidasyonunun ilerleme aşamasıdır [24].

Lipid peroksidasyonu lipid peroksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile sona erer (sonlanma basamağı). Yıkıldıklarında, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir veya ilk atak bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu; lipid peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilen MDA oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısına direk ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirek olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır [33].

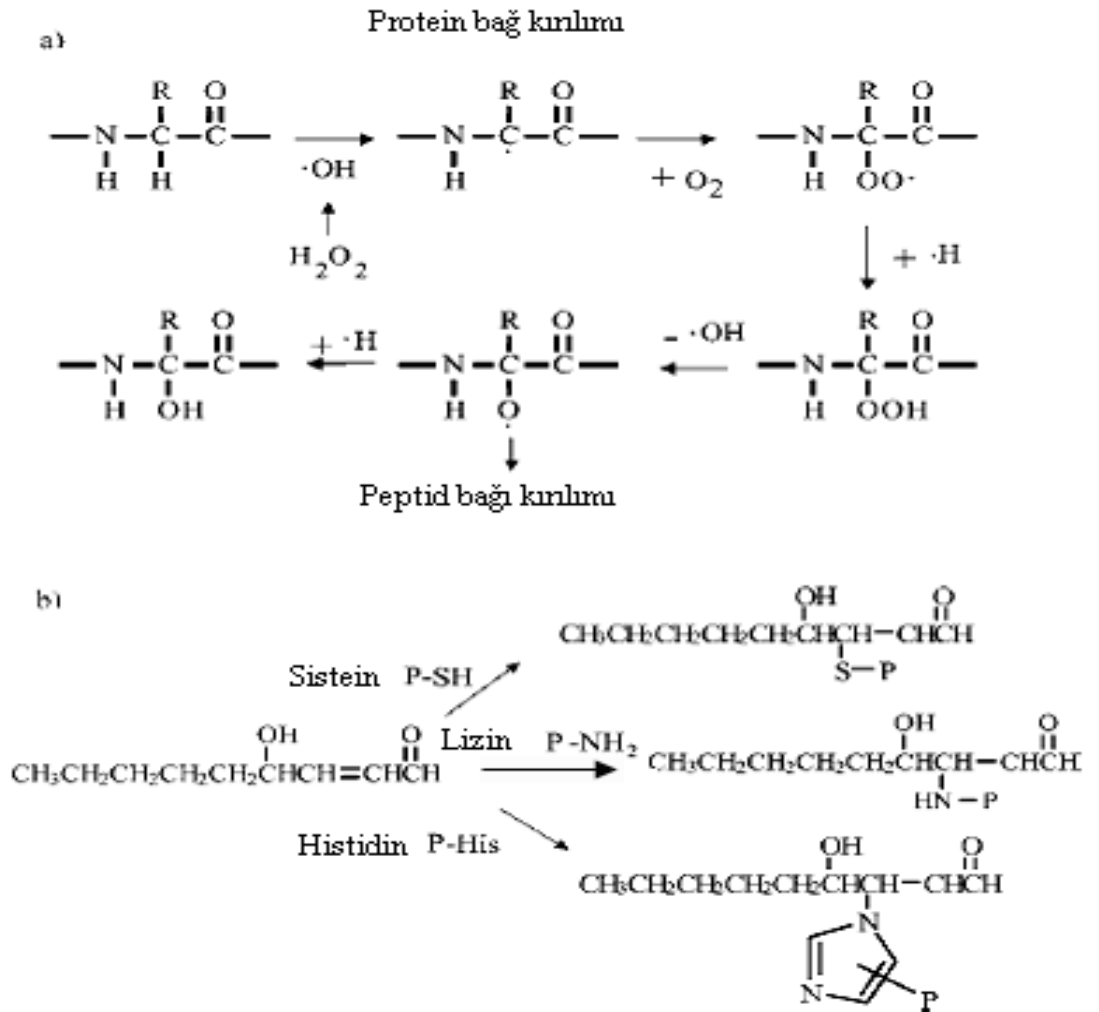
Hücre membranındaki ve intrasellüler membranlardaki lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hepsiyle uyarılabilir ve redoks katalisti olarak görev yapan geçiş metallerinin varlığında artar.



Şekil.1.7. Lipid Peroksidasyonu Parçalanma Ürünleri [33]

1.1.9.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

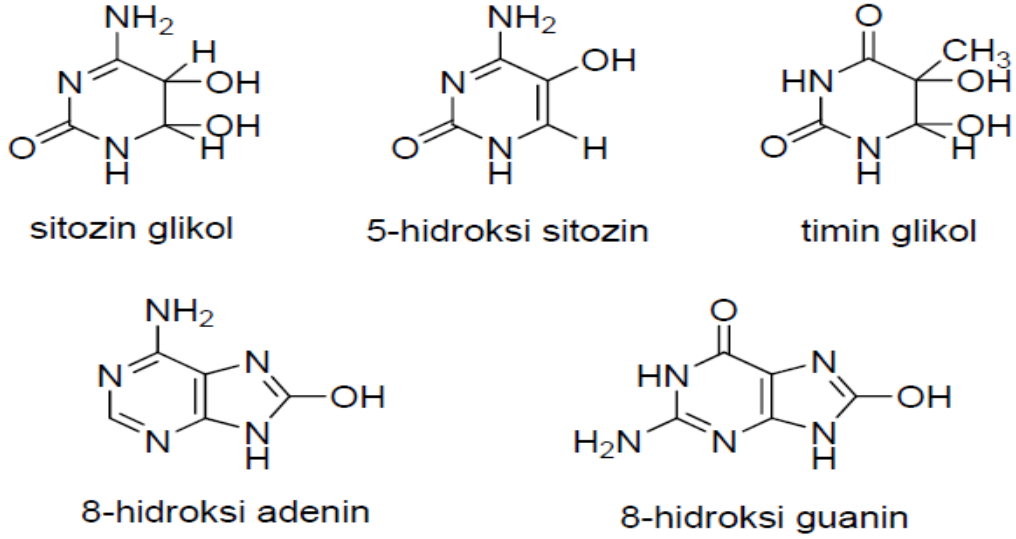
Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır, ancak proteinin aminoasit içeriğine göre radikalik hasardan etkilenme derecesi değişir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir [34]. Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobulin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{+2}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, bunun sonucunda oksijen taşımayan methemoglobin oluşur [27].



Şekil 1.8. Protein ve Peptid Bağı Kırılımı [27]

1.1.9.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri

DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir hedefdir. İyonize edici radyasyonla oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yolaçabilirler. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar [28]. DNA hasarı onarılmazsa hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.



Şekil 1.9. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri [28]

1.1.9.5. Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen süperoksitler ve okzalaldehitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar. Okzalaldehitler ayrıca DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar.

Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunmaktadır. Romatoid artrit gibi enflamatuar eklem hastalıklarında hiyalüronik asidin oluşan serbest radikal tarafından parçalandığı gösterilmiştir [35, 36].

Organizmada normal metabolizma sırasında ve patolojik proseslerde serbest radikaller üretilir. Bu serbest radikaller hücrel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldığı için, ROT üretimi antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Ancak bazen serbest radikallere metabolize olan toksinler, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, kötü beslenme sonucu diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Hücrel savunma mekanizmaları vasıtasıyla ortadan kaldırıldıktan daha fazla ROT oluştuğunda “oksidatif stres” durumu ortaya çıkar. Oksidatif stres “oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve hücre hasarına yol açması” olarak tanımlanır. Oksidatif stresin, ROT’ların neden olduğu hücre hasarları olmak üzere birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit [37], iskemi/reperfüzyon hasarı [38, 39], arteroskleroz, yaşlanma [40], diabetes mellitus, Alzheimer hastalığı; Parkinson hastalığı [41, 42] sigara kullanımı ve hava kirliliğinin neden olduğu rahatsızlıklar ve KOAH [43] gibi akciğer hastalıkları; çeşitli kanser türleri; felç; hipertansiyon; romatoid artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar; alerji; astım; septik şok; inflamasyon; akut pankreatit; yaşlanmaya bağlı moleküler hastalıklar ve katarakt [44, 28, 24] gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir. Ancak serbest radikallerin hastalıklar üzerindeki önemi ve rolü incelenirken, serbest radikal

oluşumunun hastalığın nedeni mi, yoksa sonucu mu olduğunun ayırımına varılmasının önemi vurgulanmaktadır.

1.2. Antioksidanlar

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve ekzergonik kaynaklı, çok çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplazmin gibi) ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan çeşitli antioksidan fitonutrientlerdir.

“Antioksidan” terimi uluslararası kabul edilmiş herhangi bir tanım ile sınırlandırılmamıştır. Gıdalardaki antioksidanlar “yağlar gibi kolaylıkla okside olabilen materyallerin oksidasyonunu önleyebilen veya geciktirebilen küçük miktardaki maddeler” olarak tanımlanmıştır. Lipidlerin yanı sıra protein, DNA ve karbohidrat gibi okside olabilen diğer tüm bileşikleri de içeren diğer bir tanım okside olabilen substratlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratlarının oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler” şeklindedir [45]. Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir [46, 47]:

a) ROT oluşmasını engelleyen sistemler: Demir ve bakır iyonlarını bağlayan metal şelatörleri, mitokondride doğal olarak oluşan ROT’ları indirgeyen mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi.

b) ROT’ları yakalayıp nötralize eden antioksidanlar: Flavonoidler, α -tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit, β -karoten, indirgenmiş glutatyon, mukus gibi. Bu tür antioksidanlar radikalik zincir reaksiyonunun başlamasını inhibe eder veya zincir reaksiyonunun ilerlemesine engel olarak radikalik reaksiyonu sona erdirirler.

c) Oluşan radikalleri detoksifiye eden sistemler: ROT'ları daha az toksik ürünlere dönüştüren enzim sistemleridir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir. Doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirdiği [5] gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar [47] şeklinde sınıflandırmalar da mevcuttur. Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca elemanlar ise; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ve suda ve yağda çözünen radikal tutuculardır [48].

Tablo 1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Enzimler	Radikal Yağda çözünenler	Tutucular Suda çözünenler	Metala iyonlarını bağlayan proteinler
Süperoksit dismutaz	E vitamini	C vitamin	Ferritin (Fe)
Katalaz	B-karoten	Glutatyon	Transferrin (Fe)
Glutatyon Peroksidaz	Bilirubin	Ürikasit	Laktoferrin (Fe)
Glutatyon Redüktaz	Ubikinon	Sistein	Albumin (Cu)
Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	Melatonin		Miyogloblin (Fe)
Glutatyon S Transferaz	Flavonidler	Mannitol	Seuloplazmin (Cu)
	Lipoik Asit		

1.2.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

Antioksidanlar kaynaklarına göre sınıflandırıldıklarında endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlardan endojen antioksidanlar ise enzimatik ve nonenzimatik olarak iki grupta incelenir.

Tablo 1.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

ENDOJEN	EKSOJEN
<i>Enzimatik</i>	Albumin
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	Aneztezikler
Glutasyon Redüktaz (GSH-R)	Asetil Sistein
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	Besinlere Eklenenler
Hidroperoksidaz	-BHA (Bütillenmiş Hidroksil Anilin)
Katalaz (CAT)	-BHT (Bütillenmiş Hidroksil Toluen)
Peroksidaz	- Etoksiguin
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz (Solunum zinciri son enzimi)	- Fe Süperoksid Dismutaz (SOD)
Süperoksid Dismutaz (SOD)	- Propil Gallat
<i>Nonenzimatik</i>	- Sodyum Benzoat
Albumin	Desferroksamin (Fe tutucu)
Askorbik asid (C vitamini)	DMSO (Dimetil Sülfoksit)
Alfa- Tokoferol (E vitamini)	Ebselen
Beta-Karoten	Flavonoidler
Bilirubin	Kalsiyum Kanal Blokerleri
Ferritin	Ksantin Oksidaz İnhibitörleri
Glutasyon	- Allopürinol
Haptogloblin	- Folik asid
Hemoglobin	-Oksipürinal
Laktoferrin	- Pterin Aldehit
Melatonin	Mannitol
	Probukol

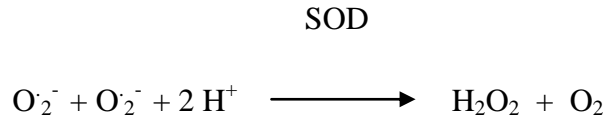
Retinoik asid	Rekombinant
Seruloplazmin	Antioksidan Enzimler (r-SOD)
Sistein	Serüloplazmin
Transferrin	Steroid Yapıda Olmayan Antienflamatuarlar
Ubikinol	Troloks
Ürat	Taurin

1.2.3. Enzimatik Savunma

Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikli etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar SOD, katalaz, GP_X ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir.

1.2.3.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1), reaktifliği yüksek olan süperoksid serbest radikalini daha sonra katalaz ve GP_X tarafından yok edilebilsin diye daha az reaktif olan hidrojen perokside dönüştürür.



Şekil 1.10. Süperoksid Dismutazın Hidrojen Perokside Dönüşümü [50]

SOD'ın başka bir görevi ise dehidratazları (dihidroksi asid dehidrataz, akonitaz, 6-fosfoglukano dehidrataz ve Fumaraz A ve B) süperoksid serbest radikalinden kaynaklanan inaktivasyona karşı korumaktır [49].

SOD'lar kofaktörlerine göre dinükleer Cu, Zn içeren ve mononükleer Mn, Fe ve Ni içerenler olmak üzere dört sınıfa ayrılmıştır [50]. Cu/Zn-SOD ağırlıklı olarak ökaryotların sitosollerinde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde, Mn-SOD ökaryot mitokondrisinde ve prokaryotlarda, Fe-SOD ise prokaryotlarda bulunur [51].

1.2.3.2. Mangan Süperoksid Dismutaz

Mn-SOD, her bir altbiriminde bir mangan atomu içeren homotetramer (96 kDa) bir moleküldür. Süperoksidin iki aşamalı bozunması esnasında önce Mn^{+3} , Mn^{+2} 'ye, sonra tekrar Mn^{+2} 'de Mn^{+3} 'e dönüşür. Mitokondrideki solunum zinciri oksijen radikallerinin başlıca kaynağıdır. Mn-SOD süperoksid radikalini çıkarmada görev yapan nükleer olarak kodlanmış primer bir antioksidandır [52]. Hücrel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır.

1.2.3.3. Cu/Zn Süperoksid Dismutaz

Cu-Zn SOD, 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein altbirimi içerir ve her bir altbirimde Cu ve Zn atomları bulunur [53, 54].

1.2.3.4. Ekstrasellüler Süperoksid Dismutaz

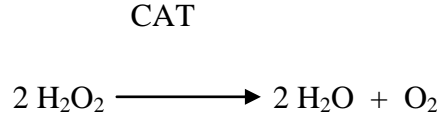
Ekstrasellüler SOD, tetramerik yapıda, Cu ve Zn içeren bir glikoproteindir. Heparin ve heparan sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlara yüksek afinitesi vardır. Dokularda ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak, plazma, lenf ve sinovial sıvılardaki SOD aktivitesinin önemli bir kısmını oluşturur [55].

1.2.3.5. Nikel Süperoksid Dismutaz

Ni-SOD, *Streptomyces sp.* ve *Streptomyces coelicolor*'un sitosolik fraksiyonlarından saflaştırılmıştır. Herbiri 13.4 kDa'luk dört alt birimden oluşmuştur. Amino asit kompozisyonu Fe-SOD, Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD'dan farklılık gösterir [56].

1.2.3.6. Katalaz

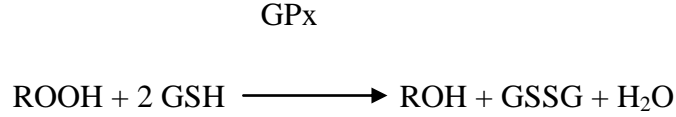
Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6), 60 kDa'luk 4 altbirimden oluşan HEM grubu içeren tetramerik bir enzimdir. Bu nedenle, her bir molekulunde 4 ferriprotoporfirin içerir ve molekul ağırlığı 240 kDa'dur. Katalaz bilinen en etkin enzimlerdendir [57]. Peroksizomlarda lokalizedir ve SOD'un oluşturduğu H₂O₂'i, katalaz peroksidazlarla beraber su ve molekuler oksijene parçalar. Katalaz aktivitesi eritrosit, böbrek ve karaciğerde yoğundur [58].



Şekil 1.11. Katalaz Aktivitesi [57]

1.2.3.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.19), selenyum içeren ve çeşitli hidroperoksidlerin glutasyon ile indirgenmesini katalizleyerek memelileri oksidatif strese karşı koruyan bir enzimdir.



Şekil 1.12. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi [57]

GPx'in H₂O₂'e karřı K_m'i katalaza göre daha dűřuktur. Dűřuk konsantrasyonlarda H₂O₂'i glutasyon peroksidaz parçalar, yűksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite gösterir.

1.2.3.8. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-transferazlar (GST) (EC 2.5.1.18), detoksifikasyon enzimlerinin önemli bir sınıfıdır. GST'lar bir tripeptid olan glutasyonun lipofilik bileşiklerin elektrofilik merkezlerine konjugasyonunu katalizleyerek, çözünürlüğünün artmasına ve hücreden salgılanmasına yardım eder. Oksidatif stres esnasında, makromoleküllerin *in vivo* yıkılma ürünleri olarak oluşan reaktif doymamış karboniller, reaktif DNA bazları, epoksidler ve organik hidroperoksidler gibi endojen substratları da içeren geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. GST'ler dokuları oksidatif hasarlara ve oksidatif strese karşı korumada hayati önem taşırlar.

1.2.3.9. Glutasyon Redüktaz

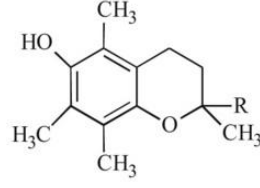
Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7), yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 alt birimden oluşan bir dimerdir. Her bir altünite NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve arayüz alan olmak üzere 3 yapısal alan içerir. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında elektronlar sıklıkla NADPH'tan FAD'a transfer edilir [58]. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve majör kaynağı pentoz fosfat yoludur [59].

1.2.4. Non-Enzimatik Antioksidan Savunma

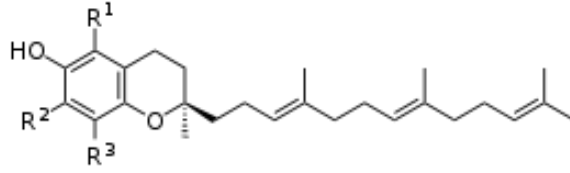
Non enzimatik antioksidan savunmada esansiyel mikronutrient bileşiklerin önemli payı vardır. Askorbat (C vitamini), suda çözünen önemli bir antioksidandır. İndirgeyici gücü radikal ve radikal olmayan redoks reaksiyonlarında kullanılır.

1.2.4.1. Tokoferoller ve Tokotrienoller (E vitamini)

Tokoferoller bir kroman halkası ve uzun doymuş bir fitil zincirinden oluşurlar. Biyolojik membranların doğal bileşenlerindedirler. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidirler. Tokoferoller membranda çoklu doymamış yağ asitlerini koruyabilir ve düz kas hücreleri çoğalmasını ve protein kinaz C aktivitesini inhibe edebilirler.



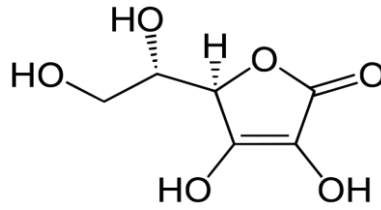
Şekil 1.13. α -Tokoferol [59]



Şekil 1.14. Tokotrienollerin Genel Yapısı [59]

1.2.4.2. Askorbik Asid (C Vitamini)

C vitamini veya L-askorbik asid suda çözünebilir ve birçok fizyolojik şartlarda indirgenmiş halde bulunur. Hücre dışı sıvılarda en önemli antioksidandır [60] ve antioksidan özelliğinin yanı sıra birçok hücre sel aktiviteye sahiptir. C vitaminin süperoksidi, hidrojen peroksidi, hipokloriti, hidroksi radikalini, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni etkin bir şekilde yakalayabildiği görülmüştür.

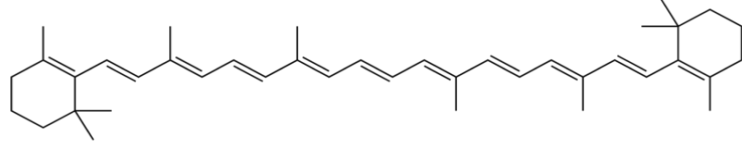


Şekil 1.15. C Vitamininin Kimyasal Yapısı [60]

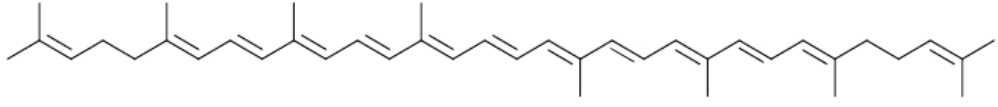
1.2.4.3. Karotinoidler

Karotinoidler bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen, hayvanlarca sentezlenemeyen doğal pigmentlerdir. Karotinoidler tetraterpenoidlerin

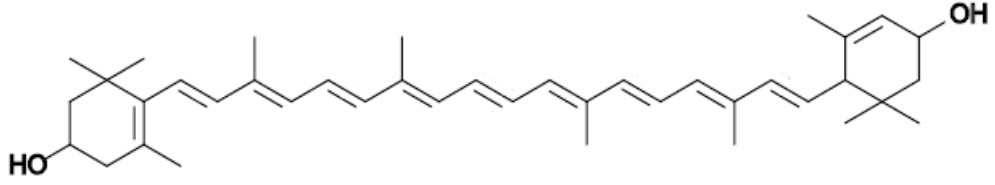
bir grubudur. İki sınıf karotinoid vardır; karotenler ve ksantofiller. Karotenler hidrokarbon karotinoidlerdir, ksantofillerse hidroksil, metoksil, karboksil, keto veya epoksi grupları şeklinde oksijen içerirler. Likopen ve β -karoten tipik karotenlerdir. Yeşil yapraklardaki lutein ve mısırdaki zeaksantin ise ksantofildirler.



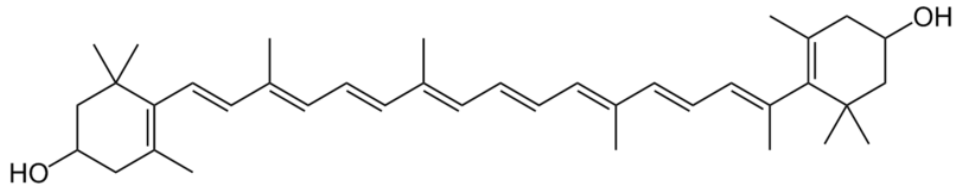
β -Karoten



Likopen



Lutein



Zeaksantin

Şekil 1.16. β -Karoten, Likopen, Lutein ve Zeaksantin'in Kimyasal Yapısı [63]

Karotinoidlerin arteroskleroz, katarakt, yaşa bağlı kas dejenerasyonları ve multiple skleroz gibi çeşitli radikal kaynaklı hastalıkları önlediği bildirilmiştir.

Karotinoidlerin antioksidan aktivitelerinin peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutmalarından kaynaklanmaktadır [61]. Likopen, doğal karotinoidler arasında en etkili singlet oksijen tutucularındandır [62]. β -karoten özellikle düşük oksijenden kaynaklı gerilimlerde peroksil radikali tutucusudur. β -karoten, α -tokoferolden daha düşük antioksidan aktiviteye sahiptir.

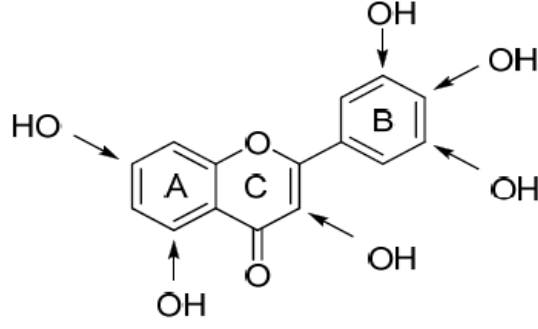
Karotinoidler renkli meyve ve sebzelerde bulunmaktadırlar. Şeftali, havuç, bal kabağı ve patates α ve β -karoten içerir. Domates, kavun ve greyfurt ise likopen kaynağıdır [63].

1.2.4.4. Polifenoller

Bitkilerde, fenolik bileşikler veya polifenollerin 8000'den fazla türü bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan, antimutajenik ve serbest radikal giderme etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda yüksek oranlarda fenolik bileşiklerin tüketilmesinin kardiyovasküler hastalıkları ve belli kanser türleri riskini azalttığını göstermiştir [64].

1.2.4.5. Flavonoidler

Bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenolik bileşiklerdir. Günümüzde bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid bilinmektedir. Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavononlar, antosiyaninler, kateşinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin O_2^- , lipid alkoksil ($RO\cdot$), lipid peroksil ($ROO\cdot$) ve $NO\cdot$ Radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama, α -tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katıldığı da bildirilmiştir [65, 66].



Şekil1.17. Temel Flavonoid Yapısı [65]

Flavonoid ve fenolik antioksidanlar anomerik hidroksil grubundan lipid radikallerine bir hidrojen atomu vererek lipid oksidasyonunu engeller. Bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde -OH grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 5-OH, 3-OH ve 4-OH grupları olması antioksidan aktivite üzerinde etkilidir [67, 68].

1.3. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ

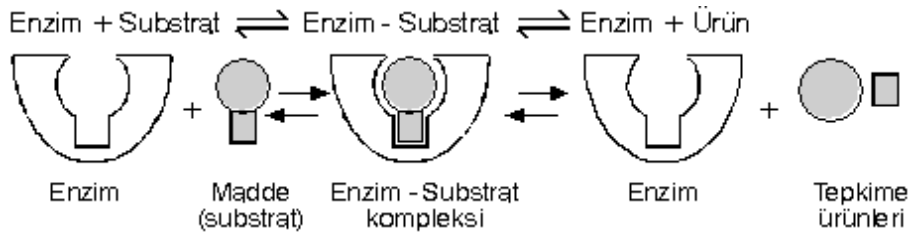
Enzimler, hücre çoğalması, enerjinin veya besinlerin çevreden alınması ve enerjinin dönüşümü, metabolitlerin taşınması ve kısaca metabolizma olarak tanımlanan bütün hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan biyokatalizörlerdir [69]; biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır [70].

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik şartlarda sentez edilmektedir. Fakat aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları şart değildir. Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimlerin peptid zincirleri halindeki temel yapı elemanları amino asitlerden oluşur ve kendilerine özgü üç boyutlu yapıya sahiptir. Bu üç boyutlu tersiyer yapıları bu biyomoleküllere, bağlanacakları ve değişime uğratacakları substrat moleküllerini seçme özgünlüğü kazandırmaktadır.

Enzimler oldukça yüksek düzeylerde reaksiyon hızları gösterirler. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları katalizlenmemiş reaksiyonlara göre genellikle 10^6 -

10^{12} kat daha büyüktür. Enzimler çoğunlukla fizyolojik pH değerlerinde, 100°C 'nin altındaki sıcaklıklarda ve atmosferik basınçlarda biyokimyasal reaksiyonları katalizler.

Enzimler değişime uğrattıkları substratlarına karşı çeşitli düzeylerde özgünlük gösterir. Bir enzim, sade tek bir substrat üzerinde rol oynadığında ve sadece tek bir reaksiyonu katalizlediğinde “tam spesifiklik” gösterir. Yani aktif bölgeye yerleşebilecek tek bir türden substrat moleküllerine bağlanabilir. Bazı enzimler genel bir fonksiyonel gruba sahip olan bir sınıf substrat üzerinde rol oynayabilirler ki bu, “grup spesifikliğı” olarak ifade edilir. Bazı enzimler ise belirli bir türden kimyasal bağlara karşı özgündürler, buna da “bağ spesifikliğı” denir. Enzimler hücredeki reaksiyonlarla yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonların %100 verimle sonuçlanmasını sağlarlar [71]. Enzimler reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirselerde, reaksiyon tamamlandığında tekrar kendi orijinal hallerine geri dönerler [72].



Şekil 1.18. Enzim Substrat İlişkisi [72]

Enzimler, kimyasal reaksiyonların normalden en az milyon defa daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. Katalizlenmemiş bir reaksiyonun dengeye varması yavaş yavaş olmasına rağmen enzimler varlığında denge birkaç saniyede sağlanır.

1.3.1. ENZİM İNHİBİSYONU

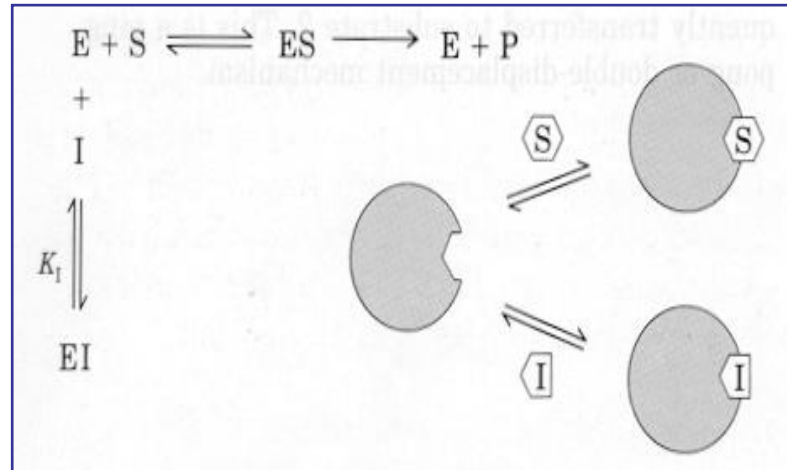
Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de “inhibitör” denir. Enzim inhibitörleri, enzim aktivitesini azaltan ya da

yok eden maddelerdir [73]. İnhibitörler genellikle küçük moleköl ağırlıklarına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzim inhibisyonu başlıca iki şekilde meydana gelir.

1.3.2. Tersinir (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu

1.3.2.1. Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu

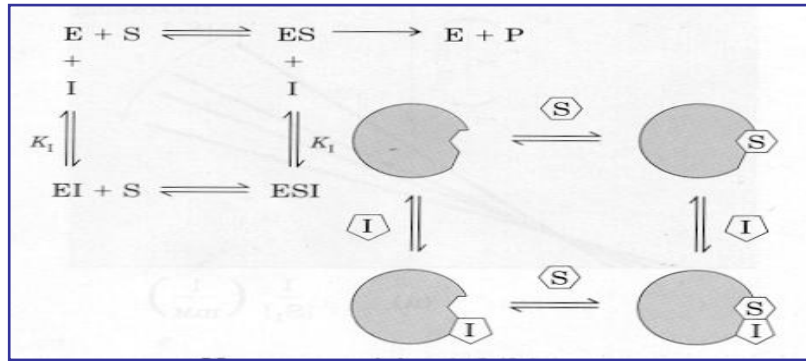
Yarışmalı inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi enzime tersinir bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir. Yarışmalı enzim inhibisyonunda bir kompetitif inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışır. Enzimin aktif bölgesine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez. İnhibitör aktif bölgeyi işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. İnhibitör madde, enzimin substrata olan ilgisini azaltır. Enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşturmak üzere enzim ile tersinir olarak birleşir. Buna bir örnek olarak süksinat dehidrojenazın malonik asitle inhibisyonu örnek verilebilir. Süksinik asit, sitrik asit siklusu sırasında süksinat dehidrojenaz ile çok kolaylıkla fumarik aside dönüşebilir. Fakat ortamda malonik asidin bulunması formül yapı benzerliğinden dolayı bu dönüşümü yavaşlatır [73].



Şekil 1.19. Kompetitif Enzim İnhibisyonu [70]

1.3.2.2. Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu

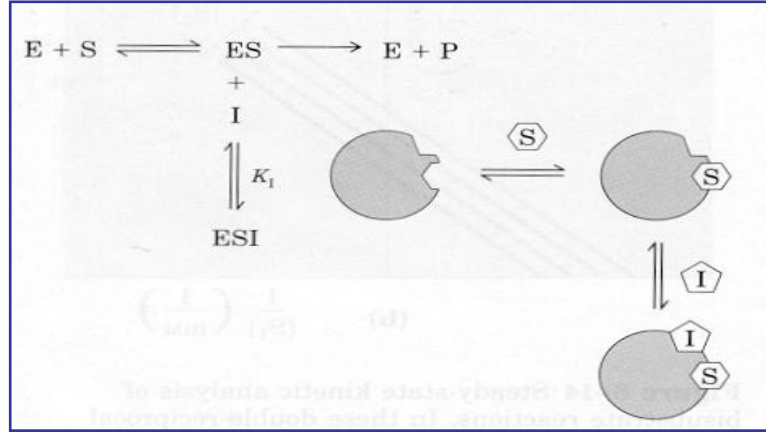
Yarışmasız enzim inhibisyonunun substratın konsantrasyonu ile ilişkisi yoktur. Yarışmasız enzim inhibisyonunda hem substrat hem de inhibitör madde aynı zamanda enzime bağlanmaktadır. Enzime yarışmasız inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasını bloke etmez. İnhibitörün enzimin aktif yeri dışında bir yere bağlanması ile o enzimin moleküllerinin substratla reaksiyona girme hızında bir azalma meydana gelir. Yarışmasız inhibisyonun en sık görülen şekli, inhibitörün enzimin yapısında bulunan fonksiyonel gruplarla, bu grupların yapısını bozmadan tersinir bir şekilde birleşmesi halidir.



Şekil 1.20. Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu [70]

1.3.2.3. Unkompetitif (Yarı Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu

Bu enzim inhibisyonunda inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde unkompetitif inhibitör yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra substratın enzime bağlı olduğu aktif merkezden başka enzimin aktif bölgesine tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder.



Şekil 1.21. Unkompetitif Enzim İnhibisyonu [70]

1.3.3. Tersinmez (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu

Tersinmez enzim inhibisyonu, tersinmez inhibitörün enzim üzerine bulunan ve aktive için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla tersinmez olarak birleşmesi sonucu meydana gelir. Bu tip inhibisyonlarda aktif bölgeye kovalent olarak bağlanan inhibitör, enzim yapısını bozduğu için geri dönüşüm olmamaktadır. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli rol oynayan asetil kolinesteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna örnektir.

1.4. ELASTAZ ENZİMİ

Elastazlar, bağ dokunun önemli proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazlardır. Serin proteazlar katalitik mekanizmaları ayrıntılı bir şekilde bilinen proteolitik enzimlerdir. Aktif bölgelerindeki serin (Ser) biriminden dolayı bu adla bilinirler ve çoğunlukla akciğerlerde, damarlarda, lenflerde ve deride dağılmış durumdadırlar [74, 75].

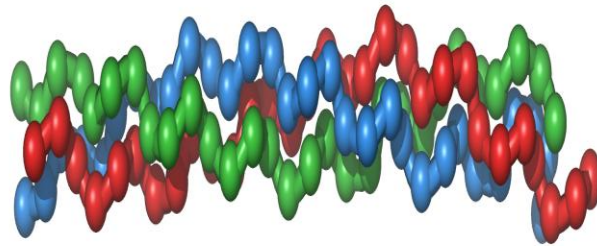
Bağ doku, nispeten az sayıda canlı hücrenin ekstrasellüler matriks denen bir ortam içine dağılmasıyla oluşmuş dokudur. Bağ doku, deri, tendonlar, ligamentler, kıkırdak ve kemikte yaygın olarak bulunur. Bağ dokunun başlıca görevi, diğer dokulara destek olmaktır ki bu görevini ekstrasellüler matrikste yer alan kollojen ve elastin gibi fibriler proteinlerle yerine getirir [76]. Bağ doku galaktoz ve mannoz içerir. Bağ dokunun önemli bazı proteinleri, kollojen, elastin, fibronektin, laminin ve

proteoglikanlardır [76]. Kollojen tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptid alt biriminden oluşan bükümlenmiş kangal olan üçlü sarmaldır.

Kollojenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, deride ve tendonlarda birbirlerine paralel demetler halinde; akciğerlerde düzensiz bir şekilde; korneada ortogonal tabakalar halinde; kıkırdakta gevşek ağ yapısında; kemik ve dişlerde fosfat kristalleri içinde matriks oluşturacak şekilde yerleşirler.

Kollojen bulunduğu dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur ve dokuya gerilme direnci salar. Kollojen kanın pıhtılaşmasında etkilidir. Kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollojen lifleri ağı zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter. Kollojen yaraların iyileşmesinde rol oynar.

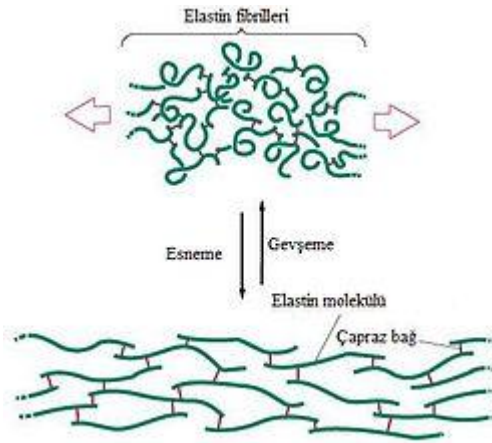
Kollojen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdağı, 9:1 oranında elastin alarak tendonları, kendinin 4 katından çok hidrate kalsiyum fosfat alarak kemikleri oluşturur; deride ise kendisi kadar dermatan sülfat ve 9:1 oranında elastinle birlikte [76].



Şekil 1.22. Tropokollojen Üçlü Heliks Yapısı [77]

Elastin fibroplast hücreleri tarafından üretilen yapısal bir proteindir. Elastik bağ dokunun en önemli fibriler skleroproteinidir. Elastin proteininde iki bölüm vardır:

1. **Hidrofobik Bölüm:** Molekülün esneklik özelliğinden sorumludur.
2. **Alfa-Heliksidal Bölüm:** Bol miktarda çapraz bağların oluşumunu sağlayan lizin ve alanin amino asitlerini içerir [78].



Şekil.1.23. Elastin Fibrilleri [76]

Elastinin molekül ağırlığı yaklaşık 68 kDa'dır ve yaklaşık 750 amino asit kalıntısından oluşur. Bunların en başında alanin, prolin ve glisin gibi hidrofobik amino asitler bulunur. Bu yüzden de elastinin diğer bir özelliği hidrofobik ve fibriller protein olmasıdır. Daha az miktarda olmasına rağmen lizin aminoasiti, proteinin yapısında büyük önem taşımaktadır.

Elastin yıkımı, elastaz vasıtasıyla gerçekleşir. Pankreastan salgılanan proelastaz tripsin ile aktive edilerek elastaza çevrilir. Elastaz, özellikle elastin için proteolitik bir proteazdır; valin ile alanin gibi alifatik yan zincirli amino asitlerin karboksil ucundan molekülü parçalar; desmozin ve izodesmozin içeren çapraz bağlı peptitler oluşturur. Elastin, pepsin ile yavaş hidroliz olur; ancak tripsin ve kimotripsin ile parçalanmaz [76].

Elastin proteininin bozulması veya yokluğu bazı hastalıklara yol açar. Williams Sendromunda eksik olan 25 genden biri elastindir ve bu sendromda görülen bağ doku

kardiyovasküler bozukluklara neden olur. Alfa₁-antitripsin eksikliği, elastinin proteazlar tarafından yıkımına ve akciğer anfizemine yol açar. Marfan Sendromu fibrillin geni FBN1'deki bir mutasyondan kaynaklanır, bunun sonucu meydana gelen bir enflamasyon reaksiyonunda elastin molekülleri proteolize uğrar [78].

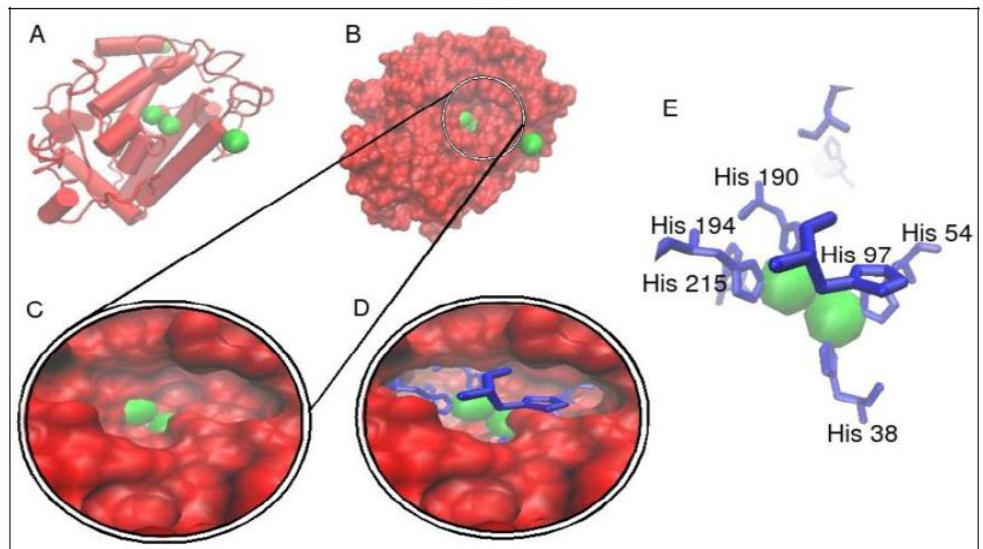
1.5. TİROZİNAZ ENZİMİ

Tirozinaz enziminin (EC 1.14.18.1) sistematik adı; 1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktazdır. Tirozinaz aynı zamanda polifenol oksidaz, fenolaz, katekol oksidaz, kresoz ve katekolaz olarak da bilinir. Tirozinaz ilk olarak 1856 yılında Schobenbein tarafından mantar içinde keşfedilmiştir [79, 80].

Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliğı nedeniyle verilmiştir.

Tirozinaz bakır içeren bir enzimdir. Tirozinazın aktif merkezinde her biri üç histidin amino asidi grubuna bağlanmış iki bakır atomu bulunmaktadır. Aktif merkezdeki iki bakır atomu iki tane oksijen atomu ile etkileşim halindedir.

Şekil 1.24.'de tirozinaz enziminin yapısı değişik açılardan gösterilmektedir. Bakır atomları yeşil renkte, molekül yüzeyi kırmızı renkte, aktif merkezdeki bakır atomları ile koordine olmuş histidin amino asitleri mavi çizgi şeklinde belirtilmiştir



Şekil 1.24. Tirozinaz [81]

Tirozinaz, nötral tampon ve oda sıcaklığında oldukça karardır. $pH > 8$, $pH < 5$ ve yüksek sıcaklıkta kararsızdır. Tirozinaz enzimi, fenollerini gidermedeki üstün yeteneği ile son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Tirozinaz enzimi fenol dönüşümünü, $pH: 7$ 'de etkin bir şekilde katalizler [81].

Tirozinaz birçok bitki dokusunda, bazı mantarlarda, üzüm, şeftali, ayva, elma, pancar, patates, ıspanak gibi meyve ve sebzelerde ayrıca böcek ve insanların da dahil olduğu bazı yüksek yapılı canlılarda bulunur. Yüksek yapılı bitkilerde enzim, bitki de böcek ve mikroorganizma ataklarına olanak tanımayan ve kurumayı önleyici bir melanin tabakası oluşturur. Tirozinaz böceklerde dış iskeletin sertleşmesine yardımcı olurken, öte yandan mikroorganizmalara karşı, onları sentezlediği melanin içerisine hapsederek koruma sağladığı ileri sürülmüştür. İnsanlarda ise tirozinaz cildin, saçın ve gözün pigmentasyonundan sorumludur [82, 83].

Gerek arıtım gerekse gıda, sağlık ve kozmetik endüstrisinde olsun tirozinazın günümüzde birçok uygulama alanı vardır. Tirozinaz, meyve ve sebzelerin işlenmesinin ardından enzimatik kararmaya ve buna bağlı olarak maddi kayıplara yol açması nedeniyle, ilk olarak gıda sektörüne yönelik araştırmalar yapan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu alandaki araştırmacılar hasat ve işleme sonrası enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek için birçok araştırma yapmışlardır.

Çoğu tarımsal kökenli gıda maddesi tirozinaz içeriği nedeniyle enzimatik kararmaya maruz kalır ve bunun sonucunda ürünün kalitesi düşer. Özellikle meyve ve sebzelerin işleme sürecinde O_2 temasına neden olabilecek herhangi bir durum, tirozinaz aktivitesine bağlı olarak kararmaya yol açmakta ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle, gıda sektörü için çeşitli inhibitörler kullanarak tirozinaz enziminin aktivitesinin kontrolü ve buna bağlı olarak enzimatik kararmanın önlenmesi oldukça önemlidir. Tirozinaz aktivitesini inhibe etme yeteneğine sahip birçok bileşik bilinmesine karşın, bu inhibitörlerin enzimatik kararmayı kontrol edebilme yetenekleri inhibitör, substrat ve O_2 konsantrasyonuna, pH 'a, sıcaklığa ve enzimin kaynağına bağlı olarak farklılık gösterir. Tirozinaz, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil-ditiyokarbamat, tropolon, 2-merkaptobenzotiyazol gibi

çeşitli ajanlar tarafından inhibe edilebilmektedir. Ayrıca, tuzlarda dahil olmak üzere, bazı inorganik iyonlar da tirozinazı inhibe edebilmekle birlikte; NaCl hariç bu bileşiklerin birçoğu toksik olduklarından, kullanımları sınırlıdır. Taze soyulmuş sebze ve meyvelerin kararmasını önlemek için kullanışlı olan NaCl, düşük konsantrasyonlarda zayıf bir inhibitördür [84, 85].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su Cihazı	: Nüve-NS-108
Etüv	: Binder
pH Metre	: Butech
UV-VIS Spektrofotometre	: T80+PG Instruments
Terazi	: Shimadzu AUx220
Hassas Terazi	: Sartorius
Ultrasonikasyon	: Selecta
Su Banyosu	: Memmert
Otomatik Pipetler	: Brand Pipetleri

2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Triazol bileşkerinin çözmek için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) (MERCK) kullanıldı. Deneylerde tampon çözelti olarak fosfat tamponu, hidroksimetil aminometan (Tris) (MERCK) ve hidroklorik asit (HCl) (MERCK) yine çözeltilerde kullanılmak üzere Metanol (MERCK) kullanıldı. Deneylerde substrat olarak N-süksinil-ala-ala-ala-p-nitroanilit (STANA) (SİGMA) ve L-Tirozin; aktivitesi tayin edilecek enzimler olarak ise elastaz (SİGMA) ve tirozinaz (SİGMA) kullanıldı.

2.3. Deneylerde Kullanılan Organik Maddeler

Bu çalışmada, Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı'nda Yrd.Doç.Dr. Hakan BEKTAŞ tarafından ilk defa sentezlenen 1,2,4-Triazol Schiff Bazı bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri, yanı sıra anti-elastaz ve anti-tirozinaz aktiviteleri incelendi.

Deneylerde kullanılan bileşiklerin adları ise şöyledir:

1→1,2-di-[3-fenil-5-siklopropil-4-(2-oksi-benzilidenamino)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-etan

2→1,2-di-[3-fenil-5-siklopropil-4-(2-oksi-benzilamino)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-etan

3→1,4-di-[3-fenil-5-siklopropil-4-(2-oksi-benzilidenamino)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-bütan

4→3-fenil-5-siklopropil-4-(p-bromofenilidenamino)-4H-1,2,4-triazol

5→1,4-di-[3-fenil-5-siklopropil-4-(2-oksi-benzilamino)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-bütan

6→3-fenil-5-siklopropil-4-(p-bromofenilamino)-4H-1,2,4-triazol

7→3-fenil-5-siklopropil-4-(2,4-diklorofenilidenamino)-4H-1,2,4-triazol

8→4-Amino-3-fenil-5-siklopropil-4H-1,2,4-triazol

9→ Etil siklopropionat benzoilhidrazon

10→3-fenil-5-siklopropil-4-(2,4-diklorofenilamino)-4H-1,2,4-triazol.

2.3.1. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşikleri

1880'li yıllarda tarafından bilim dünyasına tanıtılmış ve bu konuyla ilgili çalışmalar günümüze kadar yoğun bir şekilde süregelmiştir. Beş üyeli bir halkada üç azot atomu içeren sistem "triazosiklopentadien" veya kısaca "triazol" olarak bilinir.

Heteroatomların halkadaki durumlarına göre; 1,2,3-(visinal triazol) 1,2,4-(asimetrik, asim-triazol) ve 1,3,4-(simetrik, sim-triazol) olmak üzere birbirine izomer üç triazol halkası mevcuttur [86].

1,2,4-triazol renksiz kokusuz ve kristal yapılu bir bileşiktir. 120°C’de erir ve 260°C’de kaynar, zayıf bazik karakter gösterir.

Triazol çekirdeği içeren herhangi bir doğal bileşiğe rastlanmamıştır. Ancak triazol yapısı pek çok doğal bileşiğin yapısında bulunan ve bazı önemli fizyolojik olaylarda rol oynayan (histamin, histidin, B12 vitamini gibi) maddelerin yapısında bulunan imidazolün bir izoesteri sayılabilir. Buna çarpıcı bir örnek vermek gerekirse, histamindeki imidazol halkası yerine biyoizoester olarak triazol çekirdeğinin getirilmesiyle elde edilen bileşik de histamine benzer etkiler gözlenmiştir [87]. Diğer önemli bir örnek de, önemli antifungal ilaç grubunu oluşturan 1-süstitüe imidazol türevinde imidazol yerine triazol’ün getirilmesiyle yine etkili antifungal bileşiklerin elde edilmesidir [88]. Flukonazol tedavide kullanılmakta olan önemli anti fungal bir ilaçtır.

Literatürde 1,2,4-triazol halka sisteminin biyolojik aktivitesi üzerine çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda bu halka sisteminin mikroorganizmalara karşı önleyici [89], ateş düşürücü [90], ağrı kesici [91], hipertansiyon önleyici [92] ve virüs enfeksiyonlarına karşı dirençli [93] olmak üzere birçok biyolojik aktivite özellikleri olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber 1,2,4-triazoller ve bunların türevlerinin antikonvülsan, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar ve antibakteriyel özellikler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle 1,2,4-triazol halkası içeren çeşitli bileşikler iyi birer ilaç olarak bilinir. Örneğin; varazole, letrozole, anostrozole gibi non-steroidal ilaçlar kanser tedavisinde kullanılırken fluconazole antimikrobial bir ilaç olarak kullanılır. Ayrıca son yıllarda 1,2,4-triazol türevleri ve bunların indirgenmiş bazı schiff bazı türevlerinin de farmakolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir [94].

- **SHİFF BAZI**

Bu bileşikler, ilk defa 1864 yılında Hugo Schiff tarafından sentezlendiğinden Schiff bazları olarak anılmaktadırlar. Koordinasyon kimyasında sık karşılaşılan ligandlardır. Bu ligandlar, karbonil bileşiklerinin, özellikle aldehit ve ketonların, primer aminler ile kondenzasyonu ile oluşurlar. İmino grubunun (C=N) karbon veya azot atomlarına bağlanan R grupları alkil, aril substituentleri veya hidrojen atomu olabilir.

Schiff bazları literatürlerde karşımıza değişik adlarla çıkabilirler. İminler, azometinler, aldiminler, ketiminler, Schiff bazı bileşiklerini belirtmek için kullanılan diğer isimlerdir.

2.3.2. Triazollerin Hazırlanışı

Sentezlenen triazol Schiff bazı bileşiklerinin DMSO'teki stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden belirli oranlarda seyreltmeler yapılarak antioksidan, anti-elastaz ve anti-tirozinaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

2.4. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Tayini

Bileşiklerin DPPH radikal giderme aktivitesi, Brand-Williams ve arkadaşları [95] tarafından geliştirilen metoda göre 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi. DPPH'nin metanoldeki 20 mg/L çözeltisi günlük olarak hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 1,5 mL alındı ve üzerine her bir örnekten 0,75 mL ilave edildi. Standartlar da aynı şekilde işlem uygulandı. 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra köre karşı 517 nm'de absorbanslar okundu ve aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

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

A_0 = Kontrol absorbans değeri

A_1 = Örnek veya standardın absorbans değeri

2.5. Demir İndirgeme Gücü Tayini

Bileşiklerin indirgeme gücü tayini Oyaizu [96] metoduna göre yapıldı. pH'ı 6,6 olan 0,2 M fosfat tamponu ortamında %1'lik potasyum ferrisiyanür eklenerek su banyosunda 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) ilave edilip 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çözeltinin üst fazından alınıp, % 0,1'lik FeCl₃ ilave edilecek ve 700 nm'de absorbanslar köre

karşı okundu (Standartlara da aynı işlemler uygulandı). Sonuç absorbans konsantrasyon grafiği ve tablosu olarak yorumlandı.

2.6. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini

Bileşiklerin ABTS giderme aktivitesi Aruoma ve arkadaşları [97] tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi. 7,4 mM ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid) ve 2,6 mM potasyum persülfatın sudaki çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Bu karışımdan 1 mL alınacak üzerine 60 mL metanol ilave edildi. Bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okundu. Hazırlanan metanollü ABTS çözeltisinden 2850 µL alınır, üzerine 150 µL örnek veya standart çözeltilerinden ilave edildi. 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

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

A_0 = Kontrol absorbans değeri

A_1 = Örnek veya standardın absorbans değeri

2.7. CUPRAC Yöntemiyle Serbest Radikal Giderme Aktivitesinin Ölçülmesi

Bileşiklerin CUPRAC tayini, Özyürek ve arkadaşlarının [98] geliştirdiği metoda göre yapılacaktır. Önce 250 µL sulu Cu (II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış 250 µL neokuproin çözeltisi ve 250 µL sulu amonyum asetat tamponu (pH'ı 7,0) eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra üzerine tayin edilecek örnek ve standart çözelti ilave edildi. Bunu takip eden 30 dakika sonunda, içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbansları ölçüldü. Sonuç, absorbans konsantrasyon tablosu olarak yorumlandı.

2.8. Anti-Elastaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Elastaz inhibitörü etkisi, Ji-young ve arkadaşlarının [99] metodundan yararlanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Çalışmamızda örneklerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (DMSO'te) hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,05'er mL alındı. Üzerine elastaz enziminden 0,05 mL ilave edildi. Daha sonra 0,9 mL Tris-HCl tamponundan (pH: 7,8; 0,2 M) ilave edildi. Kontrol çözeltisi olarak 0,1 mL enzim çözeltisi ve üzerine 0,9 mL Tris-HCl karışımı ilave edildi. Hazırlanan bu karışım 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Örnek tüpleri ve kontrol çözeltilerinin üzerine inkübasyondan sonra 0,05 mL N-süksinil-(Ala)₃-nitroanilide (STANA) çözeltisi ilave edilecek ve 30 dakika 37°C inkübe edildi. 410 nm'de köre karşı absorbens değerleri okunup % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülde absorbens değerleri yerine konularak hesaplandı.

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

A_0 = Kontrol absorbens değeri

A_1 = Örnek absorbens değeri

2.9. Anti-Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan triazol bileşikleri, Vanni ve arkadaşlarının anti-tirozinaz aktivite yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı [100]. Fosfat tamponu (pH: 6,0) ortamında L-tirozin substratı kullanılarak 490 nm'de okunan absorbens değerlerinden % inhibisyon değerleri, aşağıdaki formülde absorbens değerleri yerine konularak hesaplandı.

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

A_0 = Kontrol absorbens değeri

A_1 = Örnek absorbens değeri

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada ilk defa sentezlenen 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri, anti elastaz ve anti tirozinaz aktiviteleri incelendi.

3.1. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin DPPH radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve BHA, BHT, Trolox ve Rutin ile serbest radikal giderme aktiviteleri karşılaştırıldı. Bu değerler Tablo 3.1’de verildi. DPPH serbest radikal giderme aktivitesinin **6** ve **8** bileşiklerinde en yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3.1. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyo n (µg/mL)	% İnhibisyon Değerleri*	IC ₅₀ Değerleri (µM)*
1	1000	8,09±0,40	33,182±46,93
	2000	8,26±0,35	
	3000	8,53±0,08	
	4000	8,59±1,10	
2	1000	9,81±3,19	6677,47±77,17
	2000	23,23±1,12	
	3000	35,91±0,43	
	4000	45,91±0,26	
3	1000	2,11±0,94	2028,30±25,276
	2000	2,61±0,24	
	3000	8,86±0,36	
	4000		

		6,56±2,36	
4	1000	3,52±0,55	1739,16±18452,54
	2000	2,96±0,39	
	3000	2,18±1,18	
	4000	4,97±1,18	
5	1000	0,56±0,16	76716,69±1008,64
	2000	1,00±0,31	
	3000	1,89±0,31	
	4000	3,50±0,39	
6	1000	7,59±1,26	11055,29±110,213
	2000	17,08±4,26	
	3000	29,58±0,79	
	4000	52,62±0,39	
7	1000	0,44±0,31	9299,64±6527,359
	2000	0,44±0,16	
	3000	0,50±0,08	
	4000	0,89±0,31	
8	1000	40,37±0,24	11221,25±980,001
	2000	42,95±2,93	
	3000	59,29±5,46	
	4000	67,17±0,08	
9	1000	0,44±0,16	57266,957±6571,6
	2000	0,67±0,15	
	3000	0,33±0,31	
	4000	0,83±0,08	
10	1000	0,33±0,31	3502,71±21418,54
	2000	1,72±0,39	
	3000	1,94±1,02	
	4000	6,36±4,75	
BHA	10	33,35±3,23	162,275±25,44
	20	45,71±0,83	
	30	56,10±2,12	

	40	61,35±1,73	
BHT	10	19,90±1,69	179,973±1,832
	20	29,70±2,26	
	30	38,70±2,26	
	40	51,65±2,05	
TROLOX	10	29,00±1,69	107,871±6,663
	20	38,40±3,81	
	30	51,85±2,05	
	40	69,70±0,70	
RUTİN	10	30,50±2,54	551,965±159,24
	20	42,00±0,42	
	30	52,45±1,62	
	40	59,95±1,76	

* Standart sapma.

3.2. Demir İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları

1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Demir İndirgeme Gücü konsantrasyona karşı absorbands tablosu olarak değerlendirildi ve BHA, BHT, Trolox ve Rutin ile serbest radikal giderme aktiviteleri karşılaştırıldı. Bu değerler Tablo 3.2.'de verildi. Demir indirgeme gücü radikal giderme aktivitesinin **8** örneğinde en yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3.2. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Demir İndirgeme Gücü Aktiviteleri Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans Değerleri*
1	1000	0,04±0,001
	2000	0,04±0,002
	3000	0,05±0,001
	4000	0,06±0,004

2	1000	0,03±0,005
	2000	0,04±0,001
	3000	0,05±0,001
	4000	0,06±0,003
3	1000	0,03±0,004
	2000	0,04±0,002
	3000	0,05±0,002
	4000	0,05±0,001
4	1000	0,04±0,004
	2000	0,04±0,004
	3000	0,05±0,002
	4000	0,06±0,001
5	1000	0,03±0,002
	2000	0,04±0,003
	3000	0,05±0,003
	4000	0,05±0,005
6	1000	0,06±0,002
	2000	0,06±0,006
	3000	0,08±0,007
	4000	0,08±0,002
7	1000	0,04±0,002
	2000	0,04±0,002
	3000	0,05±0,001
	4000	0,05±0,001
8	1000	0,32±0,021
	2000	0,59±0,016
	3000	0,74±0,032
	4000	0,87±0,002
9	1000	0,12±0,013
	2000	0,14±0,002
	3000	0,16±0,004
	4000	0,20±0,043

10	1000	0,05±0,004
	2000	0,05±0,006
	3000	0,06±0,001
	4000	0,06±0,001
BHA	250	0,89±0,020
	500	1,05±0,078
	750	1,33±0,058
	1000	1,47±0,0523
BHT	250	0,72±0,004
	500	0,81±0,028
	750	1,10±0,007
	1000	1,32±0,019
TROLOX	250	0,47±0,064
	500	0,68±0,007
	750	0,89±0,021
	1000	1,00±0,011
RUTİN	250	0,59±0,004
	500	0,71±0,018
	750	0,84±0,035
	1000	1,12±0,046

*Standart sapma

3.3. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

1,2,4-triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin ABTS radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve BHA, BHT, Trolox ve Rutin ile serbest radikal giderme aktiviteleri karşılaştırıldı. Bu değerler ve IC₅₀ değerleri Tablo 3.3.'de verildi. Demir indirgeme gücü radikal giderme aktivitesinin **8** örneğinde en yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3.3. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin ABTS Radikal Giderme Aktiviteleri Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon Değerleri*	IC ₅₀ Değerleri (µM)*
1	1000	15,79±0,71	24018,91±6830,185
	2000	20,43±0,20	
	3000	22,21±0,91	
	4000	25,07±1,11	
2	1000	0,34±0,09	11586,21±95,04223
	2000	6,55±1,85	
	3000	20,25±0,55	
	4000	25,50±0,70	
4	1000	19,71±2,42	64632,16±24777,64
	2000	22,57±1,21	
	3000	24,21±0,30	
	4000	26,71±0,20	
5	1000	1,97±1,20	38224,89±933,9749
	2000	3,36±0,91	
	3000	5,64±0,51	
	4000	9,29±0,81	
6	1000	0,97±0,98	48065,04±53,66526
	2000	3,32±0,57	
	3000	6,83±1,34	
	4000	11,68±1,28	

7	1000	23,82±2,46	15079,36±2132,43
	2000	22,92±0,39	
	3000	27,71±4,42	
	4000	28,69±4,61	
8	1000	32,99±1,88	6480,25±65,12453
	2000	78,96±2,46	
	3000	92,22±1,57	
	4000	94,17±0,79	
9	1000	9,722±2,16	40949,57±678,4548
	2000	12,083±5,50	
	3000	17,57±3,44	
	4000	26,53±0,40	
10	1000	26,60±2,85	8104,05±408,7219
	2000	22,85±6,97	
	3000	53,96±5,79	
	4000	72,36±4,52	
BHA	25	42,80±2,62	199,184±3,962
	50	55,20±2,12	
	75	88,70±0,42	
	100	97,95±0,35	
BHT	25	45,90±3,25	144,833±10,326
	50	58,05±1,90	
	75	84,15±2,89	
	100	91,25±1,62	
TROLOX	25	21,35±1,48	262,501±0,240
	50	41,50±1,69	
	75	59,50±1,13	
	100	69,35±1,20	
RUTİN	25	40,00±1,83	62,8315±2,493
	50	50,80±0,28	
	75	77,95±1,90	
	100	88,35±0,21	

3.4. CUPRAC Yöntemiyle Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin CUPRAC metoduyla radikal giderme aktiviteleri konsantrasyona karşı absorpsiyon olarak değerlendirildi ve BHA ile serbest radikal giderme aktiviteleri karşılaştırıldı. Bu değerler Tablo 3.7.'de verildi. CUPRAC yöntemiyle radikal giderme aktivitesinin **8** bileşiğinde en yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3.4. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin CUPRAC Yöntemiyle Radikal Giderme Aktiviteleri Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans*
1	1000	0,13±0,003
	2000	0,19±0,009
	3000	0,32±0,062
	4000	0,38±0,001
2	1000	0,24±0,019
	2000	0,33±0,090
	3000	0,58±0,024
	4000	0,68±0,004
4	1000	0,12±0,061
	2000	0,10±0,021
	3000	0,15±0,004
	4000	0,26±0,090
5	1000	0,16±0,011
	2000	0,23±0,020
	3000	0,24±0,006
	4000	0,26±0,001
6	1000	0,48±0,007
	2000	0,53±0,007
	3000	0,70±0,009
	4000	0,76±0,012

7	1000	0,13±0,021
	2000	0,13±0,021
	3000	0,27±0,042
	4000	0,42±0,066
8	1000	0,81±0,001
	2000	0,81±0,003
	3000	0,81±0,007
	4000	0,82±0,006
9	1000	0,15±0,001
	2000	0,52±0,069
	3000	0,29±0,003
	4000	0,32±0,148
10	1000	0,27±0,024
	2000	0,26±0,004
	3000	0,35±0,488
	4000	0,48±0,066
BHT	250	0,63±0,001
	500	0,69±0,074
	750	0,80±0,073
	1000	0,86±0,004

*Standart sapma.

3.5. Anti-Elastaz Enzim Aktivite Sonuçları

1,2,4-triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin anti-elastaz enzim aktiviteleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.5. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Anti-Elastaz Aktiviteleri Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Değerleri*	IC ₅₀ Değerleri (µM)*
1	0,0001	28,49±1,78	0,201±0,005699
	0,001	31,64±3,38	
	0,01	38,28±1,60	
	0,1	45,69±0,54	
2	0,0001	26,13±1,40	0,29541±0,0047716
	0,001	34,02±3,08	
	0,01	37,96±1,08	
	0,1	41,31±1,15	
4	0,0001	23,32±3,10	0,60956±0,047899
	0,001	29,63±2,11	
	0,01	34,42±2,55	
	0,1	37,76±0,71	
5	0,0001	2,30±0,23	1,341085±0,100105
	0,001	4,25±0,94	
	0,01	5,94±0,44	
	0,1	8,94±0,11	
6	0,0001	2,21±0,36	2,783845±0,445428
	0,001	3,30±0,91	
	0,01	4,51±0,58	
	0,1	7,67±0,41	

7	0,0001	15,89±2,08	2,38581±0,21845
	0,001	16,99±2,49	
	0,01	19,55±2,80	
	0,1	20,96±1,79	
8	0,0001	7,10±1,75	1,5757±0,082661
	0,001	13,61±3,35	
	0,01	16,26±1,41	
	0,1	23,59±0,95	
9	0,0001	8,68±0,66	3,52773±1,340179
	0,001	10,74±0,87	
	0,01	12,66±0,15	
	0,1	15,49±1,84	
10	0,0001	9,97±0,49	1,4448±0,208215
	0,001	11,65±0,57	
	0,01	14,93±0,95	
	0,1	19,04±0,85	

*Standart sapma.

3.6. Anti-Tirozinaz Enzim Aktivitesinin Sonuçları

1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin anti-etirozinaz enzim aktiviteleleri % inhibisyon olarak değerlendirildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo 3.6' da verildi. En yüksek inhibisyon **1** bileşiğinde görüldü.

Tablo 3.6. 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Anti-Tirozinaz Aktiviteleri Sonuçları

Bileşikler	Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon Değerleri*	IC₅₀ Değerleri (µM)*
1	0,0001	0,67±0,54	0,2747±0,008697
	0,001	12,36±1,59	
	0,01	17,11±1,42	
	0,1	31,82±0,81	
2	0,0001	0,08±0,10	0,46255±0,025244
	0,001	11,08±2,61	
	0,01	13,77±3,56	
	0,1	21,49±1,92	
4	0,0001	4,62±0,727	0,41515±0,009829
	0,001	10,06±1,632	
	0,01	17,34±1,532	
	0,1	35,57±0,908	
5	0,0001	1,11±0,584	0,5575±0,083863
	0,001	4,52±0,977	
	0,01	11,08±0,398	
	0,1	16,73±1,971	
6	0,0001	2,44±0,985	1,15325±0,011667
	0,001	9,18±1,310	
	0,01	11,90±2,886	
	0,1	17,00±1,085	
7	0,0001	10,29±2,722	0,4449±0,272095
	0,001	18,41±0,212	
	0,01	21,19±1,361	
	0,1	29,79±1,482	
8	0,0001	13,92±1,059	1,4615±0,44972
	0,001	17,76±0,716	
	0,01	23,32±1,421	
	0,1	28,89±3,599	

9	0,0001	3,05±0,479	1,6981±0,284964
	0,001	11,67±2,191	
	0,01	16,62±1,418	
	0,1	19,65±0,981	
10	0,0001	3,18±0,665	0,89415±0,049285
	0,001	11,36±1,678	
	0,01	15,92±2,389	
	0,1	21,63±0,579	

*Standart sapma.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız molekül ağırlıkları düşük ve aynı zamanda reaktif olan atom grubu veya moleküller olarak tanımlanır. Aşırı oksidatif stres, sellüler antioksidan-oksidan dengeyi bozar [101].

Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından süpürülmesi mümkündür. Son zamanlarda yaygın olarak antioksidan aktiviteye sahip maddelerin terapötik ajan gelişimi ele alınmaktadır. E ve C vitaminleri, flavonoidler, β -karoten, ubikinon, lipoik asit, indirgenmiş glutatyon gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler enzimatik olmayan antioksidan sistemlerdir [102]. In vitro ve in vivo çalışmalarında özellikle C ve E vitamini eser elementler ve mineraller gibi mikro besin maddelerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri tanımlanmıştır.

Bazı hastalıkların önlenmesinde toplumların gıda alışkanlıklarının önemli rolü olduğu gözlenmiştir. Bu konuda yapılan bilimsel bir çalışmada, gıda olarak kullanılan bazı ürünlerin sağlık üzerine yararlı etkileri olduğunu doğrulanmıştır. Bunun sonucu olarak gıda olarak kullanılan bazı ürünlerin bir kısmı besin desteği olarak tıbbi amaçlarla pazarlanmaya başlanmıştır. Küreselleşen dünyada insanların ve toplumların uzayan yaşam süresinin yanı sıra nitelikli yaşam sürme ihtiyacı ön plana çıkmıştır [103].

Yaşam formlarının pek çoğu için esansiyel bir molekül olan oksijenin yaşayan dokular için toksik etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Oksijenin toksik etkisi, oksidasyon tepkime sonucu oluşan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinden kaynaklanmaktadır. Yapısında eşleşmemiş elektron içeren ve son derece reaktif olan bu moleküller, başka moleküllerle reaksiyona girerek onların yapısını bozmaktadır. Fazla miktarda serbest radikal oluşumu membran lipidleri, hücresel proteinler, DNA ve enzimlerin oksidasyonuna neden olarak yıkıcı ve öldürücü hücresel etkilere neden olmaktadır. 35 yaş üstü insanlarda görülen patolojileri %95' i serbest radikal oluşumu ve birikimiyle ilgilidir [104].

Nüfusu hızla artmakta olan dünyada endüstrileşmenin yol açtığı başlıca sorunlardan biri de endüstriyel atıklardır. Bunların yanı sıra insan ve hayvan kaynaklı atıklar da dünyamız için büyüklüğü giderek artan bir sorun oluşturmaktadır. Son yirmi yıl içerisinde atıkların artımında enzimlerin kullanımına yönelik oldukça dikkate değer çalışmalar yürütülmüştür.

Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan maddelerdir. Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Deri ve cilt, insanlar ve hayvanların vücut ve doku tabakalarından oluşan bir örtü sistemi organıdır. Cilt bizi dışarıya karşı koruyan bir bariyerdir. Aynı zamanda vücut ısısını ve su dengesini korur, çeşitli maddelerin ter yoluyla vücuttan atılımını gerçekleştirir [105]. Deri yaşlanması, yaşla birlikte deride oluşan yapısal ve moleküler değişiklikler, genel durum ve tamir işleyişinin ilerleyen bir şekilde azalması ve bozulmasıdır. Deri yaşlanması içsel ve dışsal nedenlere bağlı olarak ikiye ayrılır. İçsel yaşlanma genetik olarak programlanmış, kaçınılmaz doğal bir süreçtir. Çevresel faktörlerin etkisiyle daha hızlı seyredebilir. Dışsal deri yaşlanmasında ise kas kaybı ve elastisite kaybı gözlenir. Fotoyaşlanma olarak da adlandırılan bu yaşlanma daha çok UV ışınlarına maruz kalma sonucunda deride gözlenen kronolojik yaşlanma belirtilerinin abartılmış şeklidir [106].

Güneş ışınları gibi UV ışınlarına maruz kalmak, sigara içmek ve çevre kirliliği gibi çevresel faktörler ve doğal yaşlanma süreci serbest oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Elastaz ve katepsin G gibi nötrofillerden salınan proteazlar enflamasyon aktivasyonunu daha da artırır [107].

Tirozinaz enzimi melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayinde güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden

faýdalanılması gündeme gelmiştir. Memelilerde tirozinazın aktif biçimi melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda yer alır.

Gerek tarım gerekse gıda, sağlık ve kozmetik endüstrisinde olsun tirozinazın günümüzde birçok uygulama alanı vardır. Tirozinaz, meyve sebzelerin işlenmesinin ardından enzimatik kararmaya buna bağlı olarak maddi kayıplara yol açması nedeniyle ilk olara gıda sektörüne yönelik araştırmalar yapan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu alanlardaki araştırmacılar hasat ve işletme sonrası enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek için birçok araştırma yapmışlardır.

Bu çalışmada ilk kez sentezlenmiş olan 1,2,4-triazol Schiff bazı bileşiklerinin antioksidan, anti-elastaz ve anti-tirozinaz aktiviteleri incelendi. Bileşiklerin antioksidan aktiviteleri; DPPH radikal giderme tayini sonucunda en yüksek 6 ve 8 nolu bileşikte, demir indirgeme gücü tayini sonucunda en yüksek 8 nolu bileşikte, ABTS radikal giderme tayini sonucu en yüksek 8 nolu bileşikte ($IC_{50}=6480,25\pm65,13 \mu M$), CUPRAC yöntemiyle radikal giderme tayini sonucunda en yüksek 8 nolu bileşikte olduğu tespit edildi. Enzim aktiviteleri ise; Anti-elastaz aktivite tayini sonucunda en yüksek 1 nolu bileşikte ($IC_{50}=0,201\pm0,01 \mu M$), anti-tirozinaz aktivite tayini sonucunda ise en yüksek 1 nolu bileşikte ($IC_{50}=0,2747\pm0,01 \mu M$) olduğu görüldü.

KAYNAKLAR

1. Ardoin, S. P., Sundry, S. J. 2006. Update on Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Current Opinion in Rheumatology*. 18: 221-226.
2. Halliwell, B. 1991. Reactive Oxygen Species in Living Systems. *The American Journal of Medicine*. 91: 14-21.
3. Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Doelman, C. J. A. 1991. Oxidant and Antioxidant State of the Art. *The American Journal of Medicine*. 91: 2-12.
4. Türe, T. 1998. Akut Miyokard İnfarktüsünde SOD ve GSHP_x Enzimleri ile E ve C Vitaminlerinin Düzeyleri. T. C Sağlık Bakanlığı İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İzmir.
5. Akkuş, I. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*, 5. Sağlık Dizisi 38: 4.
6. Çevrim, E. 2000. Sigara İçenlerde Antioksidan Enzimler, Ferritin ve Hemoglobin Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya pp. 38-40.
7. Goodyear-Brunch, C., Pierce, J. D. 2002. Oxidative Stress in Critically III Patient. *American Journal of Critical Care*. 11: 543-551.
8. Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Tomii, T., Kaneko, T., Linuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., Kondo, M. 1993. Role of Active Oxygen, Lipid Peroxidation and Antioxidants in the Pathogenesis of Gastric Mucosal Injury Induced by Indomethacin in Rats. *Gut*. 34: 732-737.

9. Kise, Y., Yoshimura, S., Akieda, K., Umezawa, K., Okada, K., Yoshitake, N., Shiramizu, H., Yamamoto, I., Inokuchi, S. 2004. Acute Oral Selenium Intoxication with Ten Times the Lethal Dose Resulting in Deep Gastric Ulcer. *The Journal of Emergency Medicine*. 26: 183-187.
10. Gutteridge, J. M.C. 1989. Iron and Oxygen: A Biologically Damaging Mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Supplement*. 361: 78-85.
11. Sohal, R. S. 2002. Role of Oxidative Stress and Protein Oxidation in the Aging Process. *Free Radical Biology and Medicine*. 33: 37-44.
12. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review, *Annals of Botany*. 91: 179-194.
13. Kılınç K., Kılınç, A. 2002. Oksijen Toksisitesinin Araç Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 33: 110-118.
14. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. 543.
15. Hasani, A. 1999. Sıçanlarda Kafa Travması Sonrası Artan Serbest Oksijen Radikalleri Üzerine Sevofluranın Etkisi. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İstanbul pp.23-24.
16. Çakatay, U., Telci A. 2000. Oksidatif Protein Hasarı ve Saptanmasında Kullanılan Markerlar. *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 63: 314-317.
17. Çelik, S. 2001. APS ile Opere Edilen Tavşanların Kan ve Karaciğer Dokularındaki Serbest Oksijen Radikallerin Antioksidan Enzim Düzeylerinin Tayini. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya pp. 34-35.

18. Kavas, G. 1989. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri*. 9: 1-8.
19. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A. 2004. Pesticides and Oxidative Stress: A Review, *Medical Science and Monitoring*. 10: 141-147.
20. Halliwell, B. 1997. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. *Nutrition Reviews*. 55: 544-549.
21. Stief, T. W. 2003. The Physiology and Pharmacology of Singlet Oxygen. *Medical Hypothesis*. 60: 567-572.
22. Lee, J. D.. 1991. Concise Inorganic Chemistry. 4th ed. *Chapman&Hall*. New York.
23. Altınışık, M. 2009. Enzimler. Adana Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>. Web adresinden 12 Haziran 2013 tarihinde edinilmiştir.
24. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. *In: Methods in Enzymology*. 186: 1-85.
25. Winternbourn C. C., Gutteridge J. M. C., Halliwell, B. 1985. Doxorubicin-Dependent Lipid Peroxidation at Low Partial Pressures of O₂. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*. 1: 43-49.
26. Weijl, N. I., Cleton F. J., Osanto, S. 1997. Free Radicals and Antioxidants in Chemotherapy-Induced Toxicity. *Cancer Treatment Reviews*. 23: 209-240.
27. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P.A., Rodwell, V. W. 1996. *Harper'in Biyokimyası*. pp. 978-975-953-311-3. Barış Kitabevi. İstanbul.

28. Halliwell, B. 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*. 52: 253-265.
29. Moldovan, L., Moldovan, N. I. 2004. Oxygen Free Radicals and Redox Biology of Organalles. *Histochemical and Cell Biology*. 122: 395-412.
30. Hallilwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. *Oxford University Press*. 2: 1059-1094.
31. Aruoma, O. I. 1998. Free Radicals Oxdative Stress and Antioxidants in Human Health an Disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society*.75: 199-212.
32. Siems, W. G., Grune, T., Esterbauer, H. 1995. 4-Hydroxynonenal Formation During Ischemia and Reperfusion of Rat Small-Instestine. *Life Sciences*. 57: 758-789.
33. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık. Ankara pp. 665-674.
34. Van Der Vlient, A., O'neill, C. A., Halliwell, B., Cross, C., Kaur, H. 1994. Aromatic Hydroxylation and Phenylalanine and Tyrosine by Peroxynitrite. *FEBS Letters*. 339: 89-92.
35. Hawkins, C. L., Davies M. J. 1998. Degradation of Hyaluronic acid, Poly-and Mono-saccharides and model compounds by Hypochlorite: Evidence for Radical Intermediates and Fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine*. 24: 1396-1410.
36. Mc Neil, J. D., Wiebkin O. W., Betts, W. H., Chleland, L. G. 1985. Depolymerisation Products of Hyaluronic Acid After Expose to Oxygen Derived Free Radicals. *Annals of the Rheumatic Disease*. 44: 780-789.

37. Dađlı, Ü., Bal, M., Yücel, D., Ülker, A., Över, H., vd. 1997. The Role of Reactive Oxygen Metabolites in Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 3: 260-264.
38. Cruthirds, D. L., Novak, L., Akhi, K. M., Sanders, P. W., Thompsan, J. A.2003. Mitochondrial Targets of Oxidative Stress During Renal Ischemia/Reperfusion. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 412: 27-33.
39. Taşçı, I., Yavuz, N., Caner, M., Göksel, S., Yılmaz, O. 1995. Karaciğer Sıcak İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Dimetilsülfoksi (DMSO), Allopurinol ve Deferoksamin'in Etkileri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi*. 9:198-202.
40. Hipkiss, A.R. 2007. Biological Aspects of Ageing. *Psychiatry*. 6: 476-479.
41. Dauer, W., Przedborski, S. 2003. Parkinson's Disease: Mechanism and Models. *Neuron*. 39: 889-909.
42. Mosley, R. L., Benner, E. J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M. D. 2006. Neuroinflammation Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clinical Neuroscience Research*. 6: 261-281.
43. Bowler, R. P., Barnes, P. J., Crapo, J. D. 2004. The Role of Oxidative Stres in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 1: 255-277.
44. Anderson, R. A., 2007. Prescribing Antioxidants. Chapter 103, pp.1083-2094. *In Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders.
45. Becker, E. M., Nissen, L.S., Skibsted, L. H., 2004. Antioxidant Evaluation Protocols: Food Quality or Health Effects. *European Food Resarch and Techonology*. 10.107/s00217-004-1012-4.
46. Rice-Evans, C. 1999. Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. *In: Antioxidant Food Supplements in Human Health*. pp. 239-253.

47. Seven, A., Candan, G. 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 27: 41-50.
48. Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 10: 1-4.
49. Benov, L., Fridovich, I. 1998. Growth an Iron Enriched Medium Partially Compensates for the Lack of Manganase Iron Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 10313-10316.
50. Whittaker, M., Whittaker, J. W. 1998. A Glutamate Bridge is Essential for Dimer Stability and Metal Selectivity in Manganase Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 22188-22193.
51. Raha, S., Robinson, B. H. 2000. Mitochondria Oxygen Free Radicals Disease and Aging. *Trends in Biochemistry Sciences*. 25: 502-508.
52. Guan, Y., Hickey, M. J. Borgstahl, G. E., Halliwell, R. A., Lepock, J. R., O'Connor D., Hsieh, Y., Nick, H. S., Silverman, D. N., Tainer, J. A. 1998. Crystal Structure of Y734F Mutant Human Mitochondrial Manganase Superoxide Dismutase and the Functional Role of Tyrosine 34. *Biochemistry*. 37: 4722-4730.
53. Kinnula, V. L., Paakko, P., Soini, Y. 2004. Antioxidant Enzymes and Redox Regulatig Thiol Proteins in Malignancies of Human Lung. *FEBS*. 569: 1-6.
54. Kinnula, V. L., Crapo, J. D. 2004. Superoxide Dismutases in Malignant Cells and Human Tumors. *Free Radical Biology and Medicine*. 36: 718-744.
55. Adachi, T., Wang, X. L. 1998. Association of Extracellular-Superoxide Dismutase phenotype with the Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Polymorphism. *FEBS Letters*. 433: 166-168.

56. Youn, H., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, C. Y., Kang, S. O. 1996. A novel Nickel Containing Superoxide Dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochemistry* 318: 889-896.
57. Memişoğulları, R. 2006. Diyabette Serbest Radikaller ve Antioksidanlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 3: 30-39.
58. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., Mecocci, C. 2005. Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 39: 841-852.
59. Özkan, A., Fışkın, K. 2004. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidan Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 14: 52-60.
60. Stocker, R., Frei, B. 1991. Endogenous Antioxidant Defense in Human Blood Plasma. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *London, Academic Press*. 213-243.
61. Stahl, W., Sies, H. 1996. Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 336: 1-9.
62. Krinsky, N. I. 1998. Overview of Lycopene Carotenoids and Disease Prevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 218: 95-07.
63. Lessin, W. J., Catigani, G. I., Schwartz, S. J. Quantification of Cis-Trans Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 3728-3732.
64. Rice Evans, K. 1999. Screening of Phenolic and Flavonoids for Antioxidant Activity. Antioxidant Food Supplements in Human Health. *Academic Press. London* pp. 24.

65. Miller, N. J., Luiz-Larrea, M. B. 2002. Flavonoids and Other Plant Phenols in the Diet: Their Significance as Antioxidants. *Journal of Nutritional and Enviromental Medicine*. 12: 39-51.
66. Ross, J. A., Kasum C. M. 2002. Dietary Flavonoids: Bioavaibility, Metabolic Effects and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19-34.
67. Cotella, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., Gaydou, M. 1996. Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 35-43.
68. Çimen, M. B. Y. 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 19: 296-304.
69. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Kitap Satış Bürosu, Trabzon.
70. Altınışik, M. 2009. *Enzimler*. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>. Web adresinden 9 Mayıs 2013 tarihinde edinilmiştir.
71. Tüzün, C. 1997. *Biyokimya Üçüncü Baskı*. pp. 124-125, Palme Yayınları, Ankara.
72. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Ersoz, A., Dikmen, N., Menten, G. and Özgünen, T. 1993. *Harper'ın Biokimyası*. pp. 978-975-953-311-3, Barış Kitabevi.
73. Bingöl, G. 1977. *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi, Ankara pp. 73.

74. Bode, W., Meyer, E. and Powers, J. C. 1989. Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity and Mechanism-Based Inhibitors. *Biochemistry* 28: 1951-63.
75. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. 2001. The Role of Elastases Secreted by Fibroblast in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity. *Photochemistry and Photobiology* 74: 283-290.
76. Altınışık, M. 2011. *Dokular*, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-23.pdf>. Web adresinden 13 Haziran 2013 tarihinde edinilmiştir.
77. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kollajen>. Web adresinden 28 Nisan 2013 tarihinde edinilmiştir.
78. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Elastin>. Web adresinden 28 Nisan 2013 tarihinde edinilmiştir.
79. Whitaker, J. R., 1994. Principles of Enzymology Fort he Food Sciences 2nd ed. *Marcel Dekker*. 543: 2-4.
80. Wong-Dominic W. S., 1995. Food Enzymes Structure end Mechanism 1st ed. *Chapman & Hall*. 271-272.
81. Ikehata, K. 2000. Characterization of Tyrosinase for the Treatment of Aqueousphenols. *Canada Bioresource Technology*. 74: 191-199.
82. Sherman, T. O., Vaughn, K. C., Duke, S. O. 1991. A Limited Survey of the Phylogenetic Distribution of Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry*. 30: 2499-2506.
83. Sugumaran, M. 1990. Defense Molecules 1st. ed. *Wiley-Liss*. New York. 47-62.

84. Mayer, A. M., Harel, E. 1979. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
85. Zawistowski, J., Biliaderis, C. G., Eskin, N. A. 1991. Oxidative Enzymes in Foods 3rd ed. *Elsevier Applied Science*. London and New York pp. 217-273.
86. Shawmi, A. S., Parhangi, C., J. 1980. Bazı 2(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin sentezi [Synthesis of some compounds including 2(4H-[1,2,4]triazole-3-yl-sulfanyl)-acetamit]. *Heterocyclic Chemistry* pp.17833.
87. Kuzmeierkiewioz, W., Foks, H., Baranowski, M.,1985. 3,5-Disubstituted Derivatives of 1,2,4- Triazole Synthesis and Hypotensive Activity. *Sciences Pharma*. 53: 133.
88. Shah, M. H., Mhasalkar., M. Y., Patki, V. M., Deliwala, C. V., and Sheth, U. K. 1969. New 1,2,4 (H) Triazole Derivatives as Diuretic Agents. *Journal of Pharma Sciences*.58: 1398.
89. Holla, B. S., Gonsalves, R., Shenoy, S. 1998. Studies on Some N-Bridged Heterocycles Derved from Bis-[4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole-3-yl] Alkanes. *II Farmaco* 53: 574-578.
90. Tozkoparan, B., Gökhan, N., Aktay, G., Yeşilada, E., Ertan, M. 2000. Design and Synthesis of Some Azole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents.*Journal of Medicine Chemistry*. 34: 743-750.
91. Turan-Zitouni, G., Kaplancikli, Z. A., Erol, K., Kiliç, F .S. 1999. Synthesis and Triazolo- Thiadiazines. *II Farmaco* 54: 218-223

92. Emilson, H., Salender, H., and Guarder, S. 1985. Handbook of Sports Medicine and Science The Paralympic Athlete. *Journal of Medicine Chemistry*. 21: 333-338.
93. Kristanida, M., Mouroutsou, A., Marakos, D., Pouli, N., and Papakonstantinou, S., Pannecogue, C., De Clerea, E. 2002. Synthesis and Evaluation of Antitubercular, Anti-Fungal Activity of Some Bovel İmidazo [2, 1-b]-1,3,4-Thiadiazole Derivatives. *II Farmaco* 57: 2533.
94. Yehia, A. Ibrahim., Elwahy, Ahmed. H. and Elkareish, Gamal M. M. 1994. Synthesis of New Tetrabenzo Nitrogen-Oxygen Macrocycles Containing Two Amide Groups *Journal of Chemical Resarchs*. 11: 414-415.
95. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel Wissenschaftund Technologie*. 28: 25-30.
96. Oyaizu, M., 1986. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
97. Aruoama, O. I., 1998. Free Radicals, Oxidative Stres and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75: 99-212.
98. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, R., 2009. Measurement of Xantine Oxidase Inhibiton Activity of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*. 636: 42-50.

99. Ji-Young M., Eun-Young Y., Gwanpil S., Nam H. L., Chang-Gu H., 2010. Screening of Elastase and Tyrosinase Inhibitory Activity from Jeju Island Plants. *EurAsian Journal of BioSciences*. 4: 41-53.
100. Vanni A., Gastaldi D., Giunata G., Kinetic Investigations on the Double Enzymatic Activity of the Tyrosinase Mushroom.1990. *Annali di Chimica*. 80: 35-60.
101. <http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr50892.html>. Web adresinden 07 Nisan 2013 tarihinde edinilmiştir.
102. Cornelli, U. 2010. Treatment of Alzheimer's Disease with A Cholinesterase Inhibitor Combined with Antioxidants. *Neurodegenerative Disease* 7: 193-202.
103. Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willet, WC., Philips, K. M., Jacobs, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The Total Antioxidant Content of More than 3100 Foods, Beverages, Spices, Herbs and Supplements Used Worldwide. *Nutrition Journal* 9: 1-11.
104. Stefanovic, O., Comic L., Stanojevic, D. and Solujic-Sukdolak, S. 2009. Antibacterial Activity of Aegopodium podagraria L. Extracts and Interaction Between Extracts and Antibiotics. *Turkish Journal of Biology* 33: 145-150.
105. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Deri>. Web adresinden 07 Nisan 2013 tarihinde edinilmiştir.
106. <http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr50891.html>. Web adresinden 07 Nisan 2013 tarihinde edinilmiştir.
107. <http://www.dermoday.com/dosyalar/1234889587.pdf>. Web adresinden 29 Mayıs 2013 tarihinde edinilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

19.12.1988 tarihinde Rize'nin Çayeli İlçesi'nde doğdu. İlkokul öğreniminin bir kısmını Zeki Bilge İlköğretim Okulu'nda (Trabzon), bir kısmını 9 Mart İlköğretim Okulu'nda (Rize), lise öğrenimi ise Ayancık Lisesi'nde (Sinop) tamamladı. 2007 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nün 2010-2011 Bahar Dönemini Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamlayarak 2011 yılında mezun oldu.