

**FLORESAN ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI SENTETİK
BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hacer BORA

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Gökhan SADİ

Eylül-2019

**T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FLORESAN ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HACER BORA**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez DanıŐmanı: Doç. Dr. Gökhan Sadi

KARAMAN 2019

TEZ ONAYI

Hacer BORA tarafından hazırlanan “**Floresan özellik gösteren bazı sentetik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

(Doç. Dr. Gökhan SADI)

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Doç. Dr. Gökhan SADI

İmza:



Tez Savunma Tarihi:04/09/2019

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Kamil ARI

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Hacer BORA



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLORESAN ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hacer BORA

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gökhan Sadi

Eylül, 2019, 74 sayfa

Bu çalışmada yeni sentezlenen karbonat iyonu sensörü DHMC, Hg²⁺ ve Fe³⁺ sensörü APICP ve tiyol grubu sensörü PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin antioksidan enzimler üzerine etkileri ve canlı hücre sistemlerinde çeşitli iyonların ve fonksiyonel grupların tanımlanmasında kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. İncelenen üç bileşik içerisinde antioksidan özellikleri en yüksek olan bileşiğin DHMC olduğu, DPPH radikal süpürücü etkiler ve toplam antioksidan kapasite sonuçlarından anlaşılmaktadır. APICP bileşiğinin toplam antioksidan kapasitesinin DHMC bileşiği ile benzerlik gösterdiği, PDI/Arg molekülünün ise yüksek ölçüde indirgeme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Antimikrobiyel etkilerinin incelendiği çalışmalarda DHMC bileşiğinin test edilen mikroorganizmaların hepsi üzerinde kuvvetli etkisi olduğu, APICP bileşiğinin ise *S.aureus*, *B.subtilis* ve *Salmonella* gibi mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen enzim kinetiği çalışmaları, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin CAT enzimini karışık inhibisyon mekanizmasıyla doz bağımlı bir şekilde baskıladığını göstermiştir. Ayrıca, DHMC ve APICP bileşiklerinin CDNB bağımlı GST enzim aktivitesinde birer yarışmalı inhibitör, PDI/Arg bileşiğinin ise yarışmasız (non-competatif) inhibitör olduğu belirlenmiştir. İncelenen bileşiklerin hepsi, bütün konsantrasyonlarında GSH bağımlı GST aktivitesi için Vmax değerini azaltırken, görece GSH Km değerini arttırmıştır. Bu sonuçlar üç bileşiğin de GSH bağımlı GST aktivitesini karışık tip yarışmasız inhibisyon mekanizması (uncompetatif) ile baskıladığını göstermektedir. HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmalarında PDI/Arg bileşiğinin oldukça yüksek sitotoksik etki (HepG2 için IC₅₀: 0,307 mM; MCF-7 için IC₅₀: 0,016 mM) gösterdiği bulunmuştur. Çalışma kapsamında ayrıca biyosensör olarak kullanılacak bileşiklerin hücre içerisindeki çeşitli iyonların ve fonksiyonel grupların *in vivo* tayininde kullanılabilme potansiyelleri floresan hücre görüntüleme çalışmalarıyla ilk defa ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Kumarin, Perilen, Antioksidan, Antimikrobiyal, Sitotoksikite, Floresan görüntüleme.

ABSTRACT

MsThesis

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME SYNTHETIC COMPOUNDS HAVING FLUORESCENT PROPERTIES

Hacer BORA

Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Gökhan SADI

September, 2019, 74 pages

In this study, antioxidant, antibacterial and cytotoxic properties of newly synthesized carbonate ion sensor DHMC, Hg²⁺ and Fe³⁺ sensors and thiol group sensors PDI/Arg compounds were investigated. In addition, the effects of these compounds on antioxidant enzymes and their utility in the identification of various ions and functional groups in living cell systems were determined. DHMC has the highest antioxidant properties among the three compounds examined according to DPPH radical scavenging and total antioxidant capacity results. The total antioxidant capacity of the APICP compound was found to be similar to that of the DHMC. Besides PDI/Arg molecule had a high reduction potential among the three compounds. In studies investigating antimicrobial effects, DHMC has a strong effect on all microorganisms tested, and APICP has an antibacterial effect on *S. aureus*, *B. subtilis* and *Salmonella*. Enzyme kinetics studies have shown that DHMC, APICP and PDI/Arg compounds suppress CAT enzyme in a dose-dependent manner with mixed inhibition mechanism. In addition, DHMC and APICP compounds were found to be competitive inhibitors of CDNB-dependent GST enzyme activity and PDI/Arg were non-competitive inhibitors. All of the compounds examined decreased V_{max} for GSH-dependent GST activity at all concentrations, while increasing relative K_m value for GSH. These results show that all three compounds suppress GSH-dependent GST activity by a mixed-type uncompetitive inhibition mechanism. Cytotoxicity studies on HepG2 and MCF-7 cells showed that the PDI/Arg compound exhibited a very high cytotoxic effect (IC₅₀: 0.330 mM for HepG2; IC₅₀: 0.016 mM for MCF-7). Additionally, the potential of the biosensor compounds for in vivo determination of various ions and functional groups in the cell has been revealed for the first time by fluorescent cell imaging studies.

Keywords: Biosensor, Coumarin, Perylene, Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity, Fluorescent imaging.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı benim için çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gökhan SADİ'ye tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında mikrobiyoloji alanındaki bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ'a ve her konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Buğrahan EMSEN'e teşekkürlerimi sunarım. Tezimde kullandığım kimyasal maddeleri sentezleyip deneylerimde kullanılmasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Prof. Dr. İbrahim YILMAZ ve Dr. Şükriye Nihan KARUK ELMAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bana her türlü yardım, bilgi ve desteği veren çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Aykut BOSTANCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince aynı laboratuvarı paylaştığım çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Esra Şumlu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en yakın arkadaşım, sırdaşım, en büyük destekçim, üzüntümü de mutluluğumu da hep benimle paylaşan ve her anımda yanımda olan canım ablam Gülsün BORA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca maddi manevi her türlü konuda yanımda olup hiç bir zaman desteğini esirgemeyen annem Emine BORA ve babam Ekrem BORA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmayı maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (116Z163 nolu proje) teşekkür ederim.

Hacer BORA
Karaman-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	<u>Sayfa</u> i
------------	-------------------

ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensörler.....	1
1.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	1
1.3. Kumarin.....	3
1.4. Perilen	4
1.5. Kumarin türevi bileşiklerin çeşitli iyonların belirlenmesinde biyosensör olarak kullanımları.....	6
1.5.1. Kumarin türevi 7,8-dihidroksi-3-(3-klorofenil) kumarin (DHMC) bileşiğinin karbonat sensörü olarak kullanımı.....	7
1.5.2. Kumarin türevi 2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine (APICP) bileşiğinin demir ve cıva sensörü olarak kullanımı.....	8
1.6. Biyolojik tiyol gruplarının belirlenmesinde PDI türevlerinin biyosensör olarak kullanımları.....	9
1.6.1. Arg konjuge Perilen dimit türevi PDI/Arg bileşiğinin biyolojik tiyollerin tayininde biyosensör olarak kullanımı.....	10
1.7. Serbest radikaller ve oksidatif stres.....	12
1.8. Antioksidanlar	13
1.8.1. Enzimatik antioksidanlar	13
1.8.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	14
1.9. Kanser	16
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	17
3. AMAÇ VE GEREKÇE	18
4. MATERYAL VE METOT	19
4.1. Kullanılan cihazlar	19
4.2. Kullanılan kimyasallar	20
4.3. Kullanılan PDI/Arg, APICP ve DHMC maddelerinin açık yapıları	20
4.4.1. DPPH serbest radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesi	22

4.4.2.	Toplam antioksidan kapasitenin (TAK) belirlenmesi.....	24
4.4.3.	İndirgeme gücü aktivitesinin belirlenmesi.....	25
4.5.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.....	25
4.5.1.	Disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel etkinliklerin belirlenmesi	25
4.5.2.	Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi	26
4.6.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan enzimler üzerine etkileri	27
4.6.1.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	27
4.6.2.	DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin karaciğer toplam Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi üzerine etkileri	28
4.7.	DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine <i>in vitro</i> sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	29
4.7.1.	Hücre kültürü çalışmaları.....	29
4.7.2.	XTT sitotoksik testi.....	30
4.8.	Floresan hücre görüntüleme çalışmaları	31
4.8.1.	DHMC için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları.....	31
4.8.2.	APICP için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları	32
4.8.3.	PDI/Arg için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları.....	32
4.9.	İstatistiksel Analiz.....	33
5.	BULGULAR	34
5.1.	APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin DPPH serbest radikal yakalama etkileri.....	34
5.2.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin ABTS radikali yakalama aktiviteleri: Toplam antioksidan kapasite belirlenmesi.....	35
5.3.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin indirgeme gücü.....	36
5.4.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antimikrobiyal etkileri	37
5.5.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	38
5.6.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer GST (CDNB) ve GST (GSH) enzim aktivitesi üzerine etkileri	44
5.7.	DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	54

5.8. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin floresan hücre (HepG2) görüntüleme çalışmaları.....	56
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ	74



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin Trolox eşdeğeri total antioksidan kapasitesi sonuçları. Her ölçüm en az dört kez alınmış olup veriler bu ölçümlerin ortalaması \pm standart hatası olarak ifade edilmiştir.	35
Çizelge 4.2. APICP, DHMC ve PDI/Arg maddelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyogram sonuçları (İZ: İnhibisyon zonu-mm). S1: Gentamicin, S2: Tetrasiklin	38
Çizelge 4.3. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enziminin kinetik parametreleri (V_{max} , K_m , IC_{50}) üzerine etkileri. ND: Tayin edilemedi.....	43
Çizelge 4.4. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer toplam GST (CDNB) enzimi kinetik parametreleri (V_{max} , K_m , IC_{50}) üzerine etkileri.	45
Çizelge 4.5. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer toplam GST (GSH) enzimi kinetik parametreleri (V_{max} , K_m , IC_{50}) üzerine etkileri.	50
Çizelge 4.6. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini gösteren IC_{50} değerleri (mM). CI: Güven aralığı.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Biyosensörlerin yapısı.	1
Şekil 1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması.	2
Şekil 1.3. Kumarinin yapısı	3
Şekil 1.4. Perilen molekülünün yapısı	4
Şekil 1.5. Perilen dimit (a) ve bazı türevlerinin (b-c) moleküler yapıları	5
Şekil 1.6. Karbonat floresan sensörü 7,8-dihidroksi-3- (3-klorofenil) kumarin (DHMC) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.7. DHMC bileşiğinin karbonat iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen değişimler	8
Şekil 1.8. Fe ³⁺ /Hg ²⁺ floresan sensörü 2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine (APICP) bileşiğinin kimyasal yapısı (a) ve bu bileşiğinin Fe ³⁺ /Hg ²⁺ iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen değişimler (b).....	9
Şekil 1.9. Biyolojik tiyollerin tayininde kullanılacak PDI/Arg molekülünün kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.10. PDI/Arg bileşiğinin Hg ²⁺ iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen sönmüleme (a) ve biyolojik tiyollerin (GSH, Cys ve Hcy) uygulamasıyla floresan ışımanın tekrar geri kazanılması (b).	11
Şekil 1.11. Glutatyonun (GSH) molekül şekli.....	15
Şekil 1.12. Tokoferolün genel yapısı.....	15
Şekil 1.13. Askorbik asitin genel yapısı	15
Şekil 3.1. Karbonat sensörü ve kumarin türevi DHMC bileşiğinin (7,8-dihydroxy-3-(3-methylphenyl) coumarin) açık yapısı.	20
Şekil 3.2. Fe ³⁺ ve Hg ²⁺ iyonları sensörü ve kumarin APICP bileşiğinin (2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine) açık yapısı.....	21
Şekil 3.3. Biyolojik tiyollerin sensörü ve perilen dimit türevi PDI/Arg bileşiğinin açık yapısı.....	22
Şekil 3.4. DPPH radikalinin difenil-pikrilhidrazine dönüşümü ve bu dönüşüm sonucunda meydana gelen renk değişimi.	23
Şekil 3.5. GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması.	28
Şekil 3.6. XTT'nin canlı hücrelerde enzimatik dönüşüm reaksiyonu.	31

Şekil 4.1. Gallik asit, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin DPPH radikal yakalama aktivitesi.....	34
Şekil 4.2. Gallik asit, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının indirgeme gücü grafikleri.....	37
Şekil 4.3. DHMC bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	40
Şekil 4.4. DHMC bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	40
Şekil 4.5. APICP bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	41
Şekil 4.6. APICP bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 4.7. PDI/Arg bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	42
Şekil 4.8. PDI/Arg bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	42
Şekil 4.9. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin katalaz enzimini baskılayıcı etkileri.....	43
Şekil 4.10. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	46
Şekil 4.11. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 4.12. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	47
Şekil 4.13. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 4.14. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	48
Şekil 4.15. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.16. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin toplam GST (CDNB) enzimini baskılayıcı etkileri.....	49

Şekil 4.17. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.	51
Şekil 4.18. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren. Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 4.19. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.	52
Şekil 4.20. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren. Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 4.21. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.	53
Şekil 4.22. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren. Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.23. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin GST(GSH) baskılayıcı etkileri.	54
Şekil 4.24. DHMC maddesinin farklı konsantrasyonlarda 48 saat sonundaki HepG2 ve MCF-7 hücre canlılıkları üzerine etkileri.	55
Şekil 4.25. DHMC ve sodyum karbonat ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve floresan görüntüleri.	56
Şekil 4.26. APICP ve Hg ²⁺ /Fe ³⁺ ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve floresan görüntüleri.	57
Şekil 4.27. Farklı bileşik uygulamaları altında HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve yeşil floresan görüntüleri. Tek başına HepG2 hücrelerinin parlak alan (a) ve floresan (b) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 µM PDI/Arg ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (c) ve floresan (d) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 µM PDI/Arg-Hg ²⁺ ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (e) ve floresan (f) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 µM NEM ile önceden inkübe edilmiş ve daha sonra 60 dakika boyunca 100 µM PDI/Arg-Hg ²⁺ ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (g) ve floresan (h) görüntüleri.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
mm	Milimetre
nm	Nanometre
g	Gram
μ	Mikro
cm	Santimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
%	Yüzde
μL	Mikrolitre
dH ₂ O	Distile su
β	Beta
V	Hacim
R.	Karbon merkezli radikaller
α	Alfa
γ	Gama
δ	Sigma
OH-	Hidroksil radikali
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
CO ₂	Karbondioksit

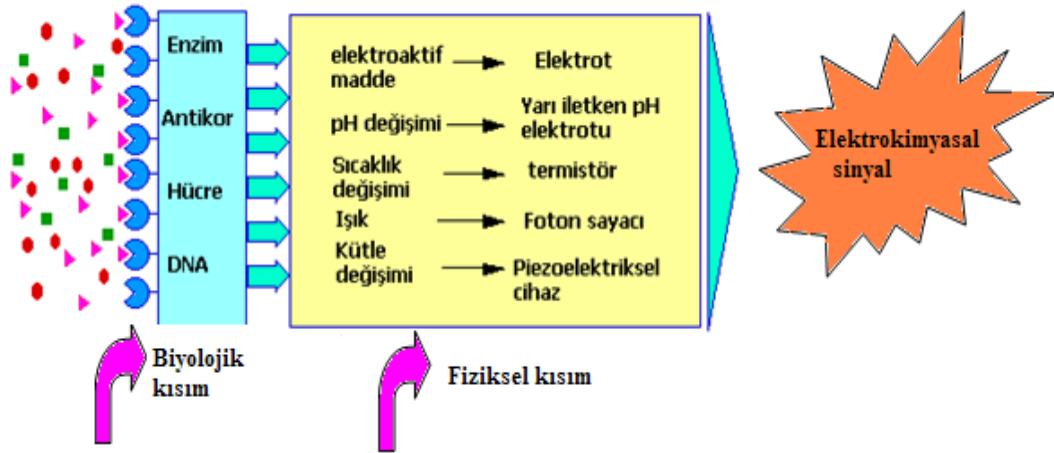
Kısaltma	Açıklama
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
TCA	Trikloroasetik asit
K₃Fe(CN)₆	Potasyum ferrisiyanür
SEM	Standart hata
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
LOOH	Lipid hidroperoksit
SOD	Süperoksit dismutaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat
CAT	Katalaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
UV	Ultraviyole
ATCC	Americantypeculturecollection
DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetalbovin serum
EC₅₀	Etkin konsantrasyon

IC₅₀	Etkin inhibitör konsantrasyon
PBS	Bufferphosphatesaline
DDM	Disk difüzyon metodu
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
NB	Nutrient broth
GA	Gallik asit
kDa	Kilodalton
rpm	Santrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı
pH	Asitlik derecesi
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitüsü
RH	Çoklu doymamış yağ asidi
XXT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2Tetrazolium 5-Carboxanilide
TAK	Toplam antioksidan kapasitesi
GST	Glutasyon S-transferaz
NEM	N-ethylmaleimide
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen

1.GİRİŞ

1.1.Biyosensörler

Biyosensörler,biyolojik bir bileşiği algılayan veya biyolojik bir bileşik kullanılarak bir maddenin kalitatif ve/veya kantitatif tanımlanmasını yapabilen sistemlerdir. Ayrıca Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafındankimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı termal, elektriksel ya da optik sinyallere dönüştüren bileşikler ve cihazlarolarak tanımlanmıştır (Şekil 1.1)(Kılıç, 2011).Son zamanlarda teknoloji gelişimi göz önünde bulundurulduğunda biyosensör tasarımları daha da hızlanarak gelişmeye ve ilerlemeye başlamıştır. Teknolojik ilerlemelerin sonucunda; biyomedikal uygulamalar, gıda güvenliği, tıp, çevre kirliliği, eczacılık, askeri uygulamalar gibi farklı birçok alanda biyosensörlerin kullanımı artmıştır (Tüylek, 2017). Canlıların buldukları alanların değişimini ayırt ederek bu alanlara cevap verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli bir temel oluşturmaktadır(Tarımeri, 2019). Biyosensörler, hassas, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz analizlerin yapılmasını oldukça kolay hale getirmesi açısından oldukça umut verici sistemler olarak öngörülmektedir(Fan ve ark., 2008).

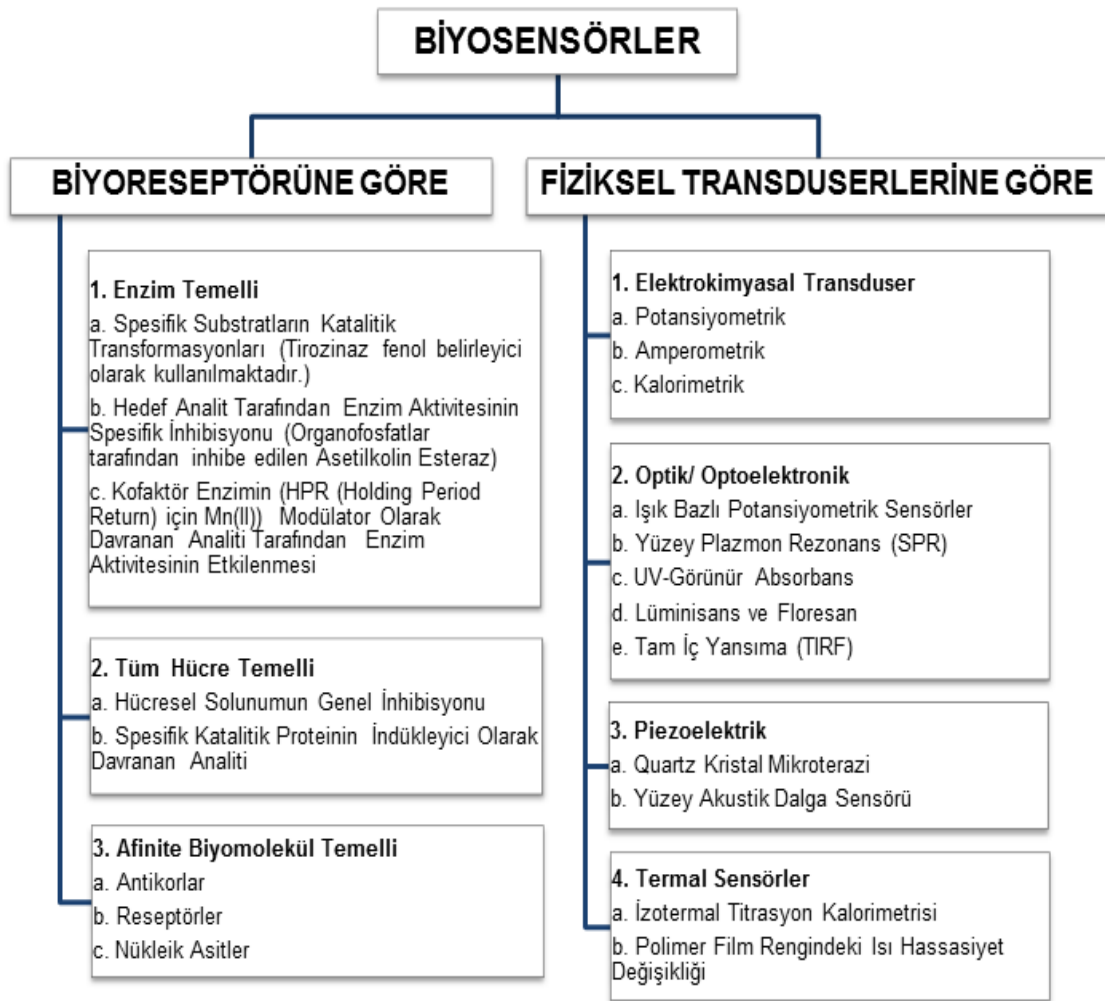


Şekil 1.1. Biyosensörlerin yapısı (Kılıç, 2011).

1.2.Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler basitçe iki bileşenli sistemlerden meydana gelmektedir. Biyosensörün birinci kısmı; biyoreseptör (ligand) olarak adlandırılır ve ligand, hedef molekülün

tutunduğu biyolojik bağlanma alanıdır. Biyosensörün ikinci kısmı ise hedef moleküle bağlanarak biyokimyasal/fizikokimyasal titreşimleri yaptığı ölçümle gözlenebilen ve bu titreşimleri elektronik sinyallere çeviren dönüştürücü (transduser)'dür. Ligand ve dönüştürücünün çeşidi ise biyosensörün hangi sınıfa ait olduğunu göstermektedir (Thakur ve Ragavan, 2013). Biyosensörler, çalışma prensipleri dikkate alınarak biyoreseptörü ve fiziksel transduserlerine göre iki farklı sınıfa ayrılmaktadır (şekil1.2) (Özoğlu, Ünal ve Altutaş, 2017).



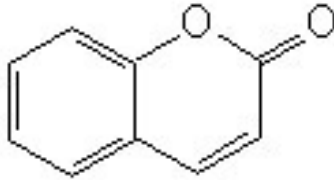
şekil 1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması.

Optik biyosensörler, etkileşim sonucunda meydana gelen absorplanan ya da açığa çıkan ışık şiddetinin ölçülmesi temeline dayanan, absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel prensipler çerçevesinde çalışan sistemlerdir (Tunç, 2017). Bu sistemler biyomedikal araştırmalar, sağlık hizmeti, tıbbi ürünler, çevre izlenmesi,

ulusal güvenlik ve savaş alanları gibi geniş uygulamalara sahip kuvvetli algılama ve analiz cihazlarıdır. Elektromanyetik parazitlerden etkilenmedikleri gibi uzaktan algılama da yapabilmektedirler. Bu bağlamda da tek bir cihazda çoklu algılama potansiyeline sahiptirler (Fan ve ark., 2008). Optik biyosensörlerin avantajları; çok hızlı olmaları, sinyalin elektriksel ya da manyetik parazitlere karşı dayanıklı olması ve güçlü bilgi içermesidir. Optik transduserler; absorban, floresan/fosforesans, kemilüminesans, reflektans, ışık saçılımı veya kırılma indisindeki değişimleri ölçebilmektedirler (Özoğlu ve ark., 2017). Optik biyosensör olarak sınıflandırılabilen floresans görüntüleme, canlı sistemlerdeki biyoaktif türlerde görüntü elde etmek ve antitümör ilaçların etkilerini izlemek gibi oldukça farklı kullanım alanlarına sahip biyosensör uygulamalarındandır.

1.3.Kumarin

Kumarin, “benzopiran-2-on” çekirdeğine sahip, kapalı ester yapısında olan ve hetero halkalı (Şekil 1.3) oksijen bileşiklerinin basit yapısal birimlerine verilen bir addır. Kumarinin IUPAC ismi *2H-kromen-2-on*’dur (Çamur, 2005)



Şekil 1.3. Kumarinin yapısı

Kumarin, vanilyaya benzeyen hoş ve güzel kokusuyla bilinen bir fitokimyasaldır (Goswami ve Hangirgekar, 2010). İlk defa 1822’de Vogel tarafından, Tonka baklası (Semen Tonca) ismi verilen drogtan elde edilmiştir (Smania, ve ark., 2008). Drog, Güney Amerika’da yetişen Fabaceae familyasından *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*) adlı ağacın kurutulmuş güzel kokulu tohumlarıdır. Tonka baklası, lavanta, tatlı yonca otu ve meyan kökü gibi çeşitli bitkilerde; çilek, kiraz, kayısı ve tarçın gibi birçok yiyeceklerde yaygın olarak bulunmaktadır (Mihaylov ve Trendafilova, 2006). Çimlenen yeni biçildiği zaman ortaya çıkan hoş kokunun sebebi de kumarindir. Ayrıca yapay aroma bileşeni olarak da kullanılmaktadır (Seifi, Rabori ve Sheibani, 2013). Pek çok kumarin türevinin hidroksil radikalleri, süperoksit radikalleri veya hipokloröz asit

gibi zararlı serbest radikalleri kapsayan prosesleri engelleyici özellikleri bulunmaktadır(Refat ve ark., 2009). Tıbbi olarak kumarin glikozitlerinin antibakteriyel, anti-fungal, anti-inflamatuvar, anti-tümör ve kan inceltici gibi farklı özelliklerinin de olduğu bulunmuştur(Goswami ve Hangirgekar, 2010; Kulkarni, Patil, ve Badami, 2009; Sma ve ark., 2008). Ayrıca optik parlaklık verici ajan olarak, floresans ve lazer boyar maddeleri olarak da kullanılmaktadırlar (Kulkarni, Patil ve Badami, 2009).

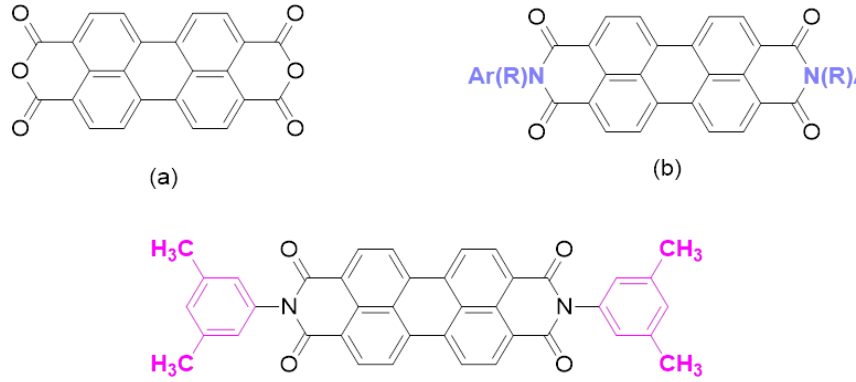
1.4.Perilen

Perilen, beş halkadan oluşarak $C_{20}H_{12}$ kapalı molekül formülüne sahip, kömür katranında doğal olarak bulunabilen polisiklik aromatik düzlemsel bir hidrokarbondur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4.Perilen molekülünün yapısı

Perilenler, 1913 yılında ilk kez Kardos(Kardos, 1913) tarafından sentezlenmiş olup boyar özellikleri ve yüksek derece foto-karalılıkları nedeniyle varil boyası olarak kullanılmaktadır(Lee ve ark., 1999). Perilen türevi bileşikler kırmızıdan mora, sarıdan kahverengiye-siyaha çok fazla renk ve maksimum derecede renk verme kabiliyetine sahiptirler. Özellikle Perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilik asit diimit türevleri (PDI) yüksek konjugasyon özelliğinde olan kromoforik boyalardır (Şekil 1.5).



Şekil1.5.Perilen diimide (a) ve bazı türevlerinin (b-c) moleküler yapıları(Karuk-Elmas, 2019).

PDI, donör bir çekirdeğe ve akseptör kabiliyeti olan karbonil gruplara sahiptir (Aleshinloye, Bodapati ve Icil, 2015). Birbirinden farklı PDI türevleri, imit bölgelere ve yan gruplara modifikasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Bu nedenle perilen türevlerinin her biri farklı fiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip olmaktadır. İmit gruplarına azot atomu modifikasyonu gerçekleştirilirse PDI'nin optik ve elektronik özellikleri değişmektedir. Bu durum PDI türevlerinin çözünürlüklerini etkilemekte, elektronik ve optik özelliklerinin yanında fotofiziksel değişikliklere de neden olmaktadır (Zhao ve ark., 2015). PDI türevleri ilk defa endüstriyel boyalarda kullanılmaya başlanmasına rağmen yüksek kuantum verimleri, kuvvetli absorpsiyon özellikleri, güçlü yarı iletkenlikleri, termal ve fotokararlı özellikleri nedeniyle günümüzde foto elektronik cihazlar, boya lazerleri, güneş pilleri, biyomalzemeler gibi pek çok alanda yer edinmiştir(Saeed ve ark., 2015; Yu ve ark., 2013).

Perilen türevlerinden en fazla kullanılan perilen diimide (PDI) (Şekil1.5), elektron alıcısı ve donör özelliklerinden dolayı oldukça popülerdir. Perilen diimide türevleri çeşitli kullanım alanları, yüksek fonksiyonel kuantum verimleri(Dinalp ve ark., 2011; Dubey ve ark., 2011)yüksek molar emme katsayısı(Refiker ve Icil, 2011), yüksek fotoğraf stabilitesi ve görünür ışık ışınması altında ısıl kararlılık, yüksek kimyasal kararlılıklarıyla (Huang, Barlow ve Marder, 2011) pek çok kullanım alanına sahiptir. Hem simetrik hem de asimetrik perilen diimide türevleri, boya hassaslaştırılmış güneş pillerinde(Cukurovali ve Kirbag, 2006), organik ışık yayan diyotlarda, sıvı kristal ekranlarda, boya lazerlerinde(Jin ve ark., 2009), fotokopi makinelerinde, fotovoltaiik

cihazlarda(Wang ve ark., 2011), pillerin şarj edilmesinde, floresan boyalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Şu ana kadar, literatürde Hg^{2+} ve Fe^{3+} (Tian ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2016) iyonlarını belirleyen bazı floresan sensörler tanımlanmıştır. Ancak bildiğimiz kadarıyla Hg^{2+} ve Fe^{3+} eşzamanlı tespiti için kumarin türevi bileşikler henüz bildirilmemiştir. Sağlık ve çevresel etkileri nedeniyle Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının eşzamanlı olarak belirlenmesi için hassas ve seçici bir sensör geliştirilmesi oldukça önem teşkil etmektedir.

1.5.Kumarin türevi bileşiklerin çeşitli iyonların belirlenmesinde biyosensör olarak kullanımları

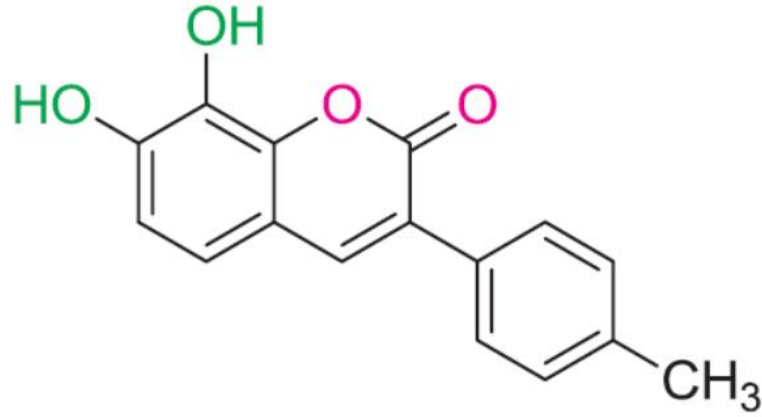
Karbonat iyonları gibi anyonların, Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının belirlenmesi için pek çok analitik yöntem geliştirilmiştir. Bildirilen bu yöntemler arasında, floresan moleküler algılama yöntemleri, yüksek hassasiyet, basitlik, düşük maliyetli, hızlı gerçek zamanlı izleme nedeniyle en fazla tercih edilenidir(Karuk-Elmas, 2019). Bu yöntemler floresan oluşturma (aç) ve floresan söndürme (kapat) olarak iki farklı şekilde sınıflandırılabilir. Kumarin ve perilen türevi bileşiklerin çeşitli anyon türlerinin, demir ve civa gibi ağır metallerin belirlenmesinde kullanıldıkları çalışmalar güncel araştırma konuları arasında yer almaktadır.

Çeşitli anyonlar arasında karbonat iyonları, özellikle jeolojik ve endüstriyel alanların, farklı dallarında yararlanılan önemli minerallerdendir(Chen ve ark., 2011; He, Liu ve Xin, 2015). Atmosferik karbon dioksit, su oluşturan karbonik asit ile reaksiyona girdikten sonra bikarbonat ya da karbonata dönüşür ve genellikle karbonatlar oluşur. Kalsiyum karbonat, toprak, tebeşir, kireçtaşı ve mermerin yapısında bulunan mineraller arasında yer almaktadır. Ayrıca plastik, yapıştırıcı ve kâğıt gibi çeşitli endüstriyel alanlarda genellikle tercih edilmektedir. Her ne kadar florür(Li ve ark., 2017), asetat(Ni ve ark., 2016) ve siyanid (Jeong ve ark., 2016)dahil olmak üzere kolorimetrik ve floresans algılamaya dayanan birden fazla anyon sensörü geliştirilse de, karbonat anyonunun florimetrik tespiti için yalnızca birkaç sensör mevcuttur. Literatürde karbonat anyonu için etkili reseptörlerin eksikliği görülmesi nedeniyle yeni karbonat floresan kemosensörleri geliştirmeye acil ihtiyaç duyulmaktadır. Kumarin türevleri, yüksek kuantum verimi, büyük ölçekli stok kayması ve fotoğraf kararlılığı

gibi mükemmel floresan özellikleri nedeniyle floresan sensörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Biswas ve ark., 2016).

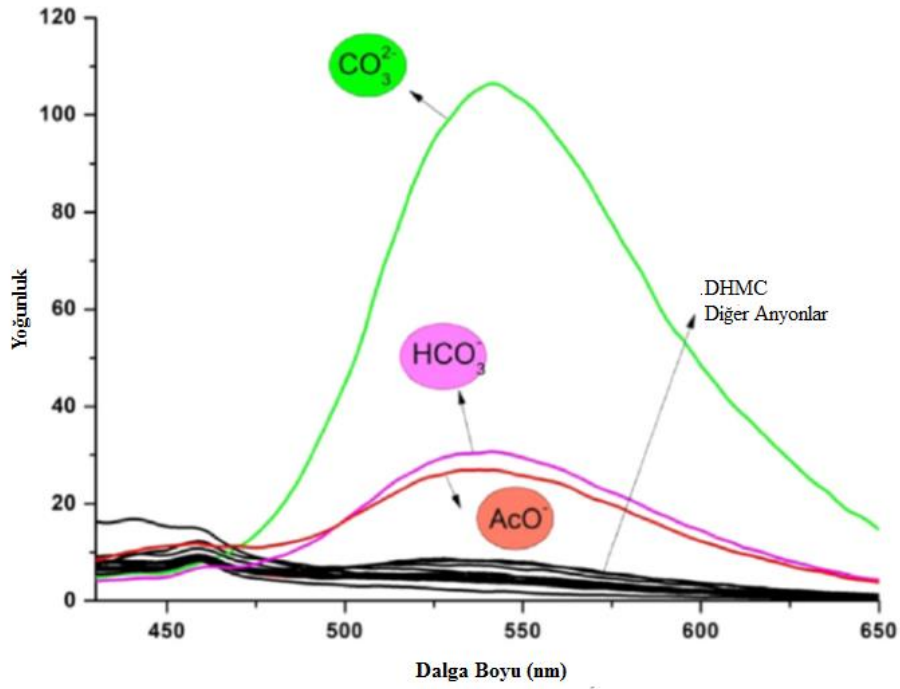
1.5.1. Kumarin türevi 7,8-dihidroksi-3-(3-klorofenil) kumarin (DHMC) bileşiğinin karbonat sensörü olarak kullanımı

Literatürde kumarin türevi floresan “aç-kapa” özeliğine sahip karbonat sensörü bildiğimiz kadarıyla henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırma ekibimiz tarafından karbonat iyonlarına duyarlı floresan “aç-kapa” özelliklerine sahip 7,8-dihidroksi-3-(3-klorofenil), yani kısaca DHMC olarak tanımladığımız bileşik Prof. Dr. İbrahim YILMAZ ve ekibi tarafından ilk defa sentezlenmiştir (Karuk Elmas ve ark., 2018). Yeni sentezlenen ve karbonat sensörü olarak kullanılan bu bileşiğin açık formülü Şekil 1.6’da gösterilmektedir.



Şekil1.6. Karbonat floresan sensörü 7,8-dihidroksi-3-(3-klorofenil) kumarin (DHMC) bileşiğinin kimyasal yapısı.

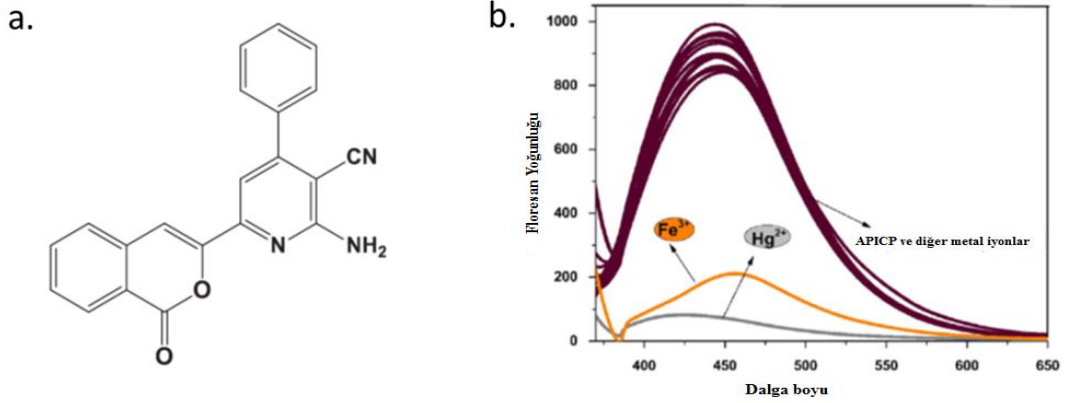
DHMC bileşiği 500-600 nm ekzitasyon dalga boyu aralığında floresan özellik göstermezken, CO_3^{2-} ve HCO_3^- gibi karbonat iyonlarının varlığında floresan ışımaya yapmaktadır. Bu nedenle karbonat iyonları için floresan “aç-kapa” sensörü olarak kullanılabilir (Şekil.1.7).



Şekil 1.7. DHMC bileşiğinin karbonat iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen değişimler(Karuk-Elmas, ve ark., 2018).

1.5.2. Kumarin türevi 2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine (APICP) bileşiğinin demir ve cıva sensörü olarak kullanımı

Demir ve Cıva metal iyonlarına duyarlı floresan “aç-kapa” özelliklerine sahip 2-amino-4-fenil-6-(izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine (APICP) bileşiği ilk defa Prof. Dr. İbrahim YILMAZ ve ekibi tarafından sentezlenmiştir (Karuk Elmas ve ark., 2019). Yeni sentezlenen ve Fe^{3+}/Hg^{2+} sensörü olarak kullanılan bu bileşiğin açık formülü Şekil 1.8a’da gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Fe^{3+}/Hg^{2+} floresan sensörü 2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine (APICP) bileşiğinin kimyasal yapısı (a) ve bu bileşiğinin Fe^{3+}/Hg^{2+} iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen değişimler (b) ($\lambda_{ex}=355$ nm, $\lambda_{em}=455$ nm)

Özgün olarak ekibimiz tarafından sentezlenen APICP bileşiği 355 nm eksitasyon ve 455 nm emisyon dalga boylarında kuvvetli floresan özelliğe sahip bir bileşiktir (Şekil 1.8b). Bu bileşiğin floresan özellikleri Fe^{3+}/Hg^{2+} iyonları varlığında yok olmaktadır. Bu nedenle APICP, Fe^{3+}/Hg^{2+} iyonları için floresan “aç-kapa” sensörü olarak kullanılabilir nitelikte bir bileşiktir.

1.6. Biyolojik tiyol gruplarının belirlenmesinde PDI türevlerinin biyosensör olarak kullanımları

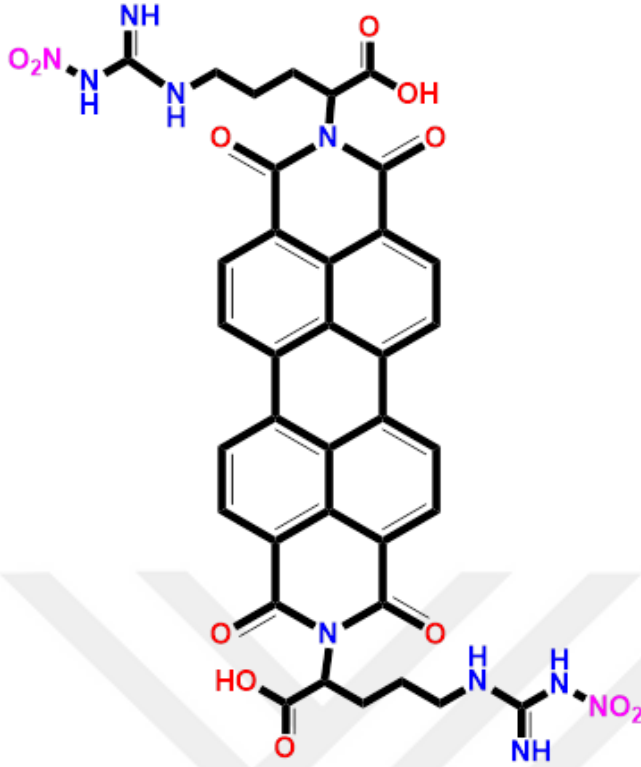
Sistein, homosistein ve glutatyon birçok hücrel ve fizyolojik süreçte önemli görevleri olan biyotiyoller içerisinde yer almaktadır. Yüksek sistein seviyeleri nörotoksisiteyle ilişkiliyken (Wang ve Cynader, 2001) düşük sistein seviyeleri ise büyüme geriliği, saç ve cilt problemleri, karaciğer hasarı, ödem ve kas zayıflığı gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır (Shahrokhian, 2001). Ayrıca, kan plazmasındaki homosistein seviyelerinin artmasının kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu, gebelik komplikasyonlarına sebep olduğu ve osteoporoz riskini arttırdığı da bilinmektedir (Refsum ve ark., 2004). Tiyollerin biyoloji ve farmakolojideki öneminden dolayı, tespit edilme yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki tiyollerin analizi için kullanılan klasik yöntemler karmaşık, pahalı ve ölçme süreci çok zaman almaktadır (Wei ve ark., 2013). Biyolojik sistemlerdeki, özellikle canlı hücrelerde ve dokularda, glutatyon, sistein ve homosistein gibi tiyol grupları içeren bileşiklerin,

duyarlı ve herhangi bir komplikasyon yapmayan yöntemlerle tespit edilmesi, birçok hastalığın teşhis ve tedavisini kolaylaştıracaktır. Bu sebeple biyolojik tiyolleribelirleyebilen yöntemlerin geliştirilmesi son derece önemlidir(Jiang ve ark., 2014).

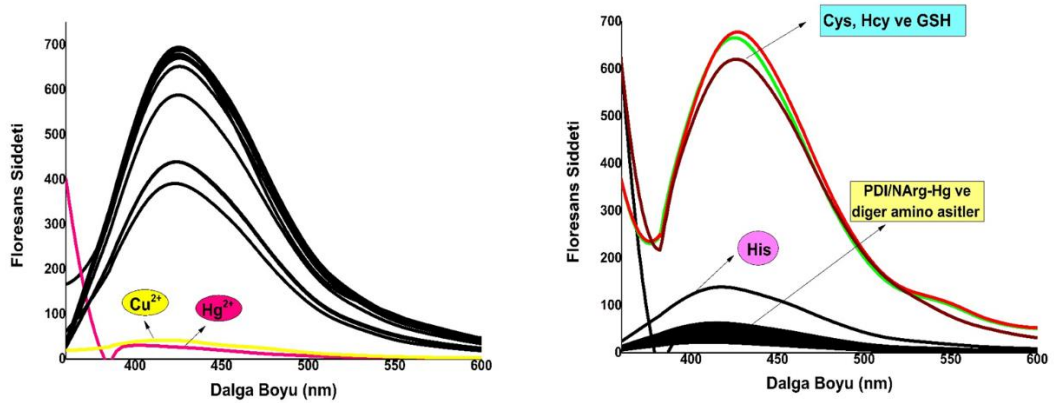
1.6.1.Arg konjuge Perilen dimit türevi PDI/Arg bileşiğinin biyolojik tiyollerin tayininde biyosensör olarak kullanımı

Biyolojik tiyollerin (glutasyon, sistein, homosistein) tespiti için kullanılacak floresan aç-kapa sensörlerinden birisi de Prof.Dr. İbrahim YILMAZ ve ekibi tarafından sentezlenen arjinin konjuge perilen diimit (PDI/Arg) bileşiğidir (Şekil 1.9). Bu bileşiğin sentezi daha önceden tanımlanan yöntemle (Karuk Elmas ve ark., 2018)gerçekleştirilmiştir.

PDI/Arg bileşiği ardışık olarak Hg^{2+} iyonlarını ve biyolojik tiyolleri (GSH, Cys ve Hcy) tanıyarak floresan karakteri değişen konjuge bir moleküldür. Bu bileşiğin 400-450 nm arasında floresan spektrumu, Hg^{2+} iyonları varlığında baskılanmaktadır. Ancak, biyolojik tiyollerin (GSH, Cys ve Hcy) varlığında Hg^{2+} tarafından sağlanan sönümlenme tekrar geri kazanılmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.9. Biyolojik tiyollerin tayininde kullanılacak PDI/Arg (2S,2'S)-2,2'-(1,3,8,10-tetraoxoantra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline 2,9(1H,3H,8H,10H)-diyl)bis(5-(3-nitroguanidino)pentanoic acid) molekülünün kimyasal yapısı.



Şekil 1.10. PDI/Arg bileşiğinin Hg^{2+} iyonları varlığında floresan spektrumunda meydana gelen sönmüleme (a) ve biyolojik tiyollerin (GSH, Cys ve Hcy) uygulamasıyla floresan ışımının tekrar geri kazanılması (b).

Civa ve biyotiyollerin sıralı olarak PDI/Arg tarafından tespiti geri dönüşümlüdür ve birçok döngüde tekrarlanabilmektedir. Ayrıca PDI/Arg birçok kez tekrar tekrar

kullanılabilmektedir. Sonuç olarak, bu kompleks sulu ortamdaki biyotiyollerin belirlenmesi için floresan aç-kapa kemosensörü olarak görev alabilen bir bileşiktir.

1.7.Serbest radikaller ve oksidatif stres

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi sonucu meydana gelmektedirler (Munne-Bosch ve Pinto, 2017). Serbest radikaller organik/inorganik moleküller şeklinde pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Hg^{+2} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olmasına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmezler (Wu, Kosten ve Zhang, 2013). Ancak, bu iyonlar reaksiyonları katalize etme yeteneklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda da önemli rol oynamaktadır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen molekülünden meydana gelen radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında önemli rol oynayan maddeler oksijenin, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Bajpai, Baek ve Kang, 2017). Biyolojik sistemlerde serbest radikaller endojen (organizma tarafından sentezlenen) metabolik olaylarla meydana geldiği gibi ekzojen olarak (dış kaynaklı) organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da meydana gelir. Vücutta mitokondrial elektron sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları ve otooksidasyon reaksiyonları endojen serbest radikaller kaynaklarıdır (Halliwell, 2011). Hava kirliliği, UV ışını, ağır metaller, sigara dumanı, gübre, radyasyon, aşırı fiziksel egzersiz, ilaç kullanımı, yaşlanma gibi eksojen kaynaklar da serbest radikal üretimini arttıran etmenlerdir (Ren ve ark., 2015; Wu ve ark., 2013). Neden oldukları zararlarından dolayı kalp-damar hastalıkları, yaşlılık hastalıkları, katarakt, kanser, bağışıklık sisteminde zayıflama, romatizmal hastalıklar, diyabet, Alzheimer ve sinir sistemi hastalıkları gibi pek çok hastalığa ya da hastalığın ikincil komplikasyonlarına neden olurlar (Birben ve ark., 2012).

Reaktif oksijen türleri (ROS) canlı hücreler tarafından normal hücresel metabolizma sonucu üretilmektedir (Birben ve ark., 2012; Niu ve ark., 2018). Düşük ve orta konsantrasyonlarda fizyolojik hücre işlemlerinde işlev görmekte, fakat yüksek konsantrasyonlarda lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenleri üzerinde olumsuz

değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Valko ve ark., 2006). Hücrel metabolizma esnasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulmasına oksidatif stres denilmektedir (Ansar ve ark., 2019). Oksidatif stres, kanser, nörolojik rahatsızlıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik/perfüzyon, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Huang ve Nan, 2019).

1.8. Antioksidanlar

İnsan vücudunda oksidatif strese karşı, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Serbest radikallerin hedefi olan yükseltgenen maddeye göre nispeten daha az miktarda bulunup bu maddelerin oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen veya yavaşlatan maddelere antioksidan savunma sistemleri ya da antioksidanlar denir (Han, Hashimoto ve Fukushima, 2016; Oliveira ve ark., 2016). Bu mekanizmalar; radikallerin veya başka bir ifade ile oksidantların biyolojik hedeflerle reaksiyona vermesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini engelleyerek oluşacak hasarı minimum seviyeye indirmeye çalışırlar (Wu ve ark., 2013). Doğal antioksidanlar; etki mekanizmalarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu antioksidanlardan enzimler ve küçük moleküler ağırlıklı olanlar vücutta üretilmektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise genellikle vücuda beslenme yoluyla dışarıdan alınmaktadır. Bu moleküllerin başında polifenoller gelse de vitaminler, karotenoidler, organosülfürlü bileşikler ve mineraller de enzimatik olmayan antioksidan sınıfında yer almaktadırlar. Serbest radikaller ve tarafından gelebilecek hasarları, antioksidan bileşiklerle birlikte antioksidan enzimler denetlenmektedir (Birben ve ark., 2012; Harsh ve ark., 2016; Mirto ve ark., 2017; Ren ve ark., 2015).

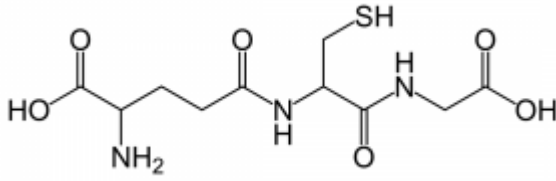
1.8.1. Enzimatik antioksidanlar

Endojen olarak üretilen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikallerinin katalitik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen ve lipid peroksidasyonu inhibe etme yeteneğine sahip bir enzimdir (Han ve ark., 2016;

Oliveira ve ark., 2016).Katalaz (CAT) enzimi ise karaciğer, böbrek, miyokard ve eritrositlerde yüksek miktarda olmasına rağmen hemen hemen tüm doku ve hücrelerde bulunmaktadır. Hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene indirgemektedir. SOD aktivitesinin CAT aktivitesi artmadan yükselmesi hidrojen peroksit birikerek OH· radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır (Hadwan ve Abed, 2016; Shen ve ark., 2015). Hidrojen peroksit ve büyük molekülü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinde görevli olan Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi, mitokondri, sitozol ve hücre zarlarında bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. GPx, çok fazla hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSGS, glutasyon disülfid) oksidasyonunu katalize ederek hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesini sağlar. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi ise GPx aracılığıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizler (Harris ve Regulation, 1992; Mathur, 2002). Glutasyon-S-transferazlar (GST) başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesi gösteren bir antioksidan savunma sistemidir (Harsh ve ark., 2016; Mitsuyoshi ve ark., 1999). Ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda önemli rol almaları ve başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GPx aktivitesi göstermeleri antioksidan savunma mekanizması açısından önemli görülmektedir (Ezemonye ve Tongo, 2010; Pugazhendhi ve ark., 2017).

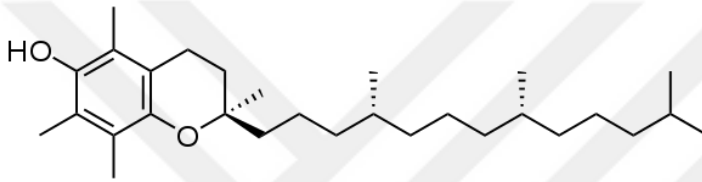
1.8.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Önemli bir antioksidan olan glutasyon (GSH); organizmanın bütün hücrelerinde bulunan glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlığına sahip bir tripeptitdir (Şekil 1.11) (Ezemonye ve Tongo, 2010; Heusler ve ark., 2019).Hücre içinde en çok sitozol, mitokondri ve çekirdekte bulunan glutasyonun, önemli bir kısmı indirgenmiş olarak az bir kısmı da okside glutatyon (GSSG) halinde bulunur (Apostolova ve Victor, 2015).Glutasyon, eritrositlerde hemoglobinin ve diğer proteinlerin tiyol gruplarını (-SH) indirgeyerek onları oksidasyona karşı korumaktadır. Bu sebepten dolayı da hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü, fonksiyonel protein ve enzimlerin de inaktivasyonunu önler (Atere ve ark., 2018; Stocker ve ark., 2015).



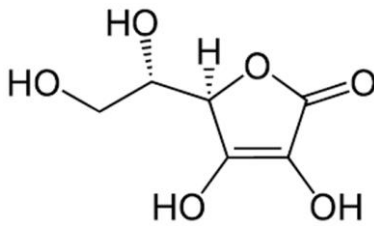
Şekil 1.11.Glutatyonun (GSH) molekül şekli

E vitamini doğada α , β , γ , δ - dört farklı formda bulunan ve tokoferol olarak adlandırılan bileşiklere verilen genel bir addır. Bu bileşikler içinde en aktif olanı α -tokoferoldür ve yapısında bulunan fenolik hidroksil grubu içeren aromatik halka (Şekil 1.12), vitaminin aktif kısmını oluşturmaktadır(Smith ve ark., 2019).



Şekil 1.12.Tokoferolün genel yapısı

Membranca zengin olan mitokondri ve mikrozoim gibi yapılarda çok fazla bulunmaktadır. Yağda çözüldüğü halde suda çözünmeyen bu bileşikler oksijen olmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa dayanıklıdır. α -Tokoferol, hidroksil, singlet oksijen, süperoksit, lipid peroksil radikalleri ve diğer bazı serbest radikallerin süpürülmesini sağlar (Alzoubi ve ark., 2019). Yalnız bitkiler tarafından sentezlenebilen E vitamini, hayvanlar ve insanlar için esansiyel olup biyolojik yapılarda oldukça güçlü antioksidan özellik göstermektedir (Caddeo ve ark., 2018).Askorbik asit (C vitamini), biyolojik sistemler için önemli indirgen ajandır (Şekil 1.13) ve organizmada pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici olarak görev yapar(Yue ve ark., 2018).



Şekil 1.13. Askorbik asitin genel yapısı

Çok güçlü bir indirgeyici olan vitamin C, semihidroaskorbat radikal ara ürünü sayesinde rahatlıkla dehidroaskorbik aside okside dönüşebilir. Askorbik asit organizmalar için oldukça güçlü bir antioksidandır (Fraga ve ark., 2018).

1.9.Kanser

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve büyümesidir (Gu ve ark., 2016). Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğu için kanser genel olarak genlerle bağlantılı bir hastalıktır. Bazen bir organı etkileyebilirken bazen de birden fazla organı da etkisi altına alabilir. Kanser tedavisinde bazı standartlar belirlenmiş olsa da her kanser türüne özgü olarak değişik yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır. Çevresel faktörler, diyet, somatik mutasyonlar ve kalıtım yapılan mutasyonlar gibi pek çok etken kanser oluşumuna sebep olmaktadır(Al-shamsi ve ark., 2016).Dünya' da kanserin birçok türü yaygınlaşmaya başlamıştır ancak kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir. Günümüzdeki kadınların birçoğunda meme kanseri olma riski çok fazla ve meme kanserine yakalanan kadınların bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetme olasılığı gün geçtikçe artmaktadır. Bu sebepten dolayı kanser tedavisi ve farklı tedavi yöntemlerinin önemi her geçen gün artmaktadır (Jurcak ve Zheng, 2019; Sources, 2008).

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Doğal ürünlerin ana bir parçasını oluşturan izokumarinler, farmakolojik ve optik özellikleri sayesinde, özellikle tıbbi kimya ve ilaç kimyasında birçok bilimsel ve teknolojik alanda yararlanılmaktadır. İzokumarinler, antifungal(Pal ve Pal, 2019), antienflamatuvar (Qadeer, Rama ve Garduño-Ramírez, 2007), antimikrobiyal (Arunpanichlert ve ark., 2015), fitotoksik (Rudianto ve ark., 2018), sitotoksik (Singh ve ark., 2013)ve diğer bazı özellikler göstermektedir (Karuk-Elmas ve ark., 2017).

Sentetik türevlerinin antikoagülan, spazmolitik ve bakteriyostatik ajanlar olarak da pek çok uygulama alanı bulunmaktadır. Ayrıca antibiyotikler, mantar öldürücüler, anti-inflamatuvar, antikoagülan ve antitümör ajan olarak kullanım alanları da bulunmaktadır (Mihaylov ve Trendafilova, 2006; Refat vd., 2009).Rehman ve ark., 2005' te yaptıkları çalışmada kumarin ve metal komplekslerinin *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginos* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerde üremeyi inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Kumarin türevi bileşiklerin enzim aktivitelerini düzenleyici etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Abenavoli ve arkadaşları, 2003'de yaptıkları çalışmada kumarinin hücre kültüründe serbest amino asitler ve amonyum birikimine neden olduğu ve glutamin sentetaz, glutamat dehidrojenaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksilaz aktivitelerini uyardığı ve malat dehidrojenazın aynı koşullar altında inhibe ettiği bildirilmiştir. Saleh ve Kebeish, 2017'de yaptıkları araştırmada kumarin ve türevlerinin α -amilaz üretimini indüklediğini, fakat süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini inhibe ettiğini açıklamışlardır. Bu çalışmada kumarin ve türevinin (GA3) antioksidan enzimleri baskılayarak hidrojen peroksit ve malondialdehit birikimine neden olduğu da gösterilmiştir. Antioksidan enzimleri baskılayıcı etkilerinin yansısıra, bazı çalışmalarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve bunların süpürülmesinde görev aldığı, CAT, SOD, GPx ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenlediği de değerlendirilmiştir(Traykova ve Kostova, 2005; Wu, Zhang ve Lin, 2007). Buna ilave olarak bağışıklık sisteminde görev yapan kinon oksiredüktaz, glutatyon-S transferaz, glutatyon sentetaz gibi enzimlerin aktivitesinin kumarin türevi bileşiklerce artabileceği gösterilmiştir. Lin ve ark., (2011) ve Traykova ve Kostova, (2005)' te yaptıkları çalışmalarda kumarinin lipit peroksidasyonunu engellediği ancak Fe^{3+}

iyonunun varlığında hidroksil radikali üretimine neden olduğunu ve bir oksidan gibi davrandığını göstermişlerdir. Bundan dolayı kumarinlerin yapısına ve oksidatif stresin kaynağına bakılarak hem antioksidan olarak hem de oksidan olarak görev alabilecekleri değerlendirilmiştir.

Kumarin ve türevi bileşiklerinin optik özellikleri de çeşitli araştırma gruplarına çalışma konusu olmuştur. Örneğin Jones ve ark., (1985) bazı kumarin türevlerinin lazer boyalarında ve organik ışık yayan diyotlarda (LED) kullanılan görünür ışık aralığında etkili floresans özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Demir, doğada yaygın bulunan elementlerden biridir ve biyolojik sistemlerde önemli fonksiyonlara sahiptir (Maleki, Movahed, ve Ravaghi, 2016). Elementel veya bileşik demir formunun pek çok maddenin ve farklı biyolojik sistemlerin doğası üzerinde faydalı veya zararlı etkileri bulunmaktadır. Bitki, hayvan ve insan metabolizmasında kritik görevler yapar. Örneğin, moleküller arasında elektron transfer eder, enzimlerin aktivitelerini düzenler ve hemoglobin ve miyoglobin gibi kompleks biyolojik bileşiklerin yapısında bulunur (Khaksar ve Yaghoobi, 2012). Demir eksikliği kansızlığa sebep olurken, vücuttaki fazlalığı ise karaciğer ve böbrek gibi bazı dokulara zarar verir. Bundan dolayı, tıbbi, çevresel ve endüstriyel örneklerde Fe^{3+} 'ü tespit etmek için hassas yöntemlere her geçen gün daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır (Diana ve ark., 2018; Khaksar ve Yaghoobi, 2012).

Civa, kurşun ve arsenikten sonra üçüncü en toksik element ve çevresel bir kirlenici olarak görülmektedir (Zhang ve ark., 2018). Civanın tüm formları beyin ve böbreklerde birikerek insan sağlığı için potansiyel tehlike yaratmaktadır. Organizmanın tüm sistemlerini etkiler ve tedavisi mümkün olmayan hastalıklara sebep olur (Powers ve Buchanan, 2019). Ayrıca sanayiden gelen ve ekosistem döngüsünde dolaşan başlıca çevre kirlenicileri olarak da bilinir. Ayrıca metalik özellikleri sebebiyle hiçbir zaman yıkılmaz (Conway ve Henderson, 2019).

3. AMAÇ VE GEREKÇE

Biyolojik sistemler için son derece önemli fonksiyonel gruplar olan tiyoller; sistein (Cys), homosistein (Hcy) ve glutatyon (GSH) canlılar için son derece önemli

bileşiklerdir. Bu bileşikler, hücre içi sinyal iletimi, gen regülasyonu ve hücre içi redoks aktiviteleri gibi hücresel işlevlerin gerçekleşmesinde görev yapmaktadır. Karbonat iyonu, Fe^{3+} ve Hg^{2+} gibi metal iyonları biyolojik sistemlerde ve ekosistemde oldukça önemli görevleri olan ve çevre kirliliğine de neden olabilen maddelerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı, kumarin türevi olarak yeni sentezlenen, karbonat iyonu, Fe^{3+} ve Hg^{2+} ağır metal elementlerini floresan özelliklerinde meydana gelen değişimler nedeniyle algılayabilen DHMC ve APICP bileşiklerinin ve ayrıca biyolojik tiyol gruplarının tayini için kullanılacak PDI/Arg molekülünün antioksidan ve antibakteriyel etkilerinin araştırılmasıdır. Bu kapsamda adı geçen bileşiklerin serbest radikal yakalama etkinlikleri, toplam antioksidan kapasiteleri (TAK), indirgeme güçleri incelenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin vücutta önemli antioksidan enzimlerden olan katalaz ve glutatyon S-transferaz enzimleri üzerine *in vitro* baskılayıcı etkileri de araştırılmıştır. Bu bileşikler çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilerin büyütüldüğü ortamlara eklenerek mikroorganizmaların büyümelerine etkileri de (antibakteriyel) araştırılmıştır.

Son olarak yeni sentezlenen ve biyosensör olarak kullanılacak bu üç bileşiğin HepG2 ve MCF-7 kanser hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksik etkileri de araştırılmış, floresan özelliklerine bağlı olarak canlı hücre sistemlerinde karbonat, Fe^{3+} ve Hg^{2+} iyonları ve biyolojik tiyollerin tayininde kullanılabilirliklerinin incelendiği floresan hücre görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4. MATERYAL VE METOT

4.1.Kullanılan cihazlar

Tez Çalışmasında; Thermo MultiScanGO marka mikropilaka spektrofotometre, Thermal marka Soxhlet Ekstraktörü, IKA RV 10 marka Rotary Evaporatör, Nüve marka Otoklav ve Etüv kullanılmıştır. İlave olarak Dry Black marka Thermostat, Leica DM IL-Led marka invert hücre mikroskobu, Metisafe marka Class 2 Biyogüvenlik

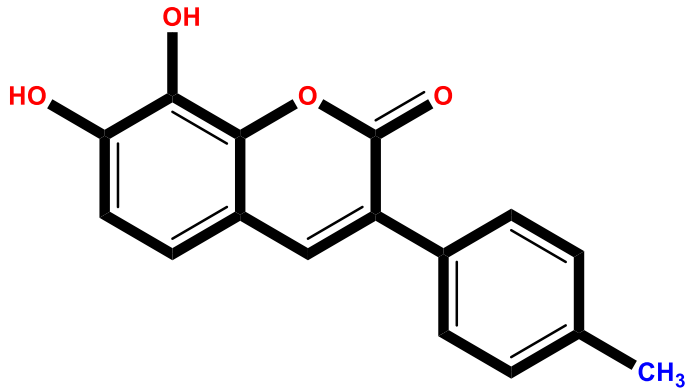
kabini, Sanyo marka CO₂ inkübatörü, Sigma marka soğutmalı Santrifüj, Bio-Rad (TC10) marka hücre sayım cihazı kullanılmıştır.

4.2.Kullanılan kimyasallar

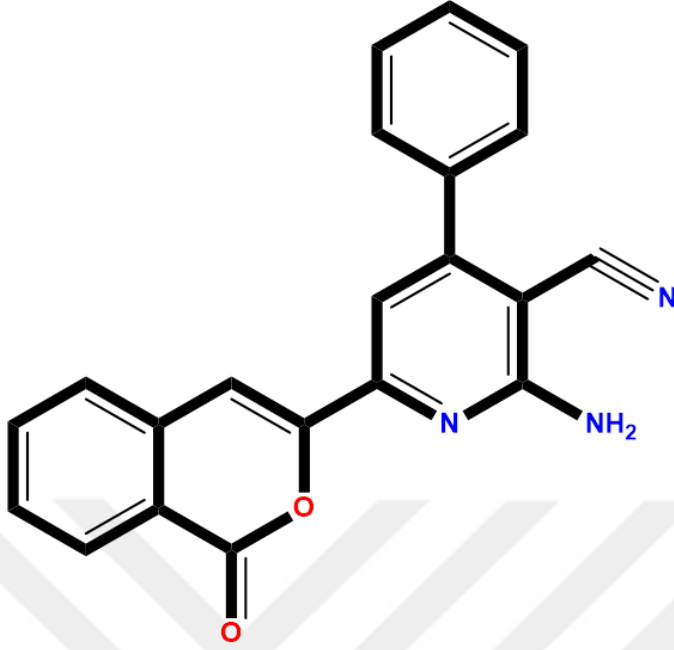
Deneylerde kullanılan kimyasallar ise şu şekildedir: AppliChem marka DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidraliz); Sigma marka TCA (Trichloro acetic acid), K₃Fe(CN)₆ (Potasyum ferrisiyanür), FeCl₃ (Demir (III) klorür), Sodyum Asetat. Merck marka Gallik asid, Folin reaktifi, Sodyum karbonat (Na₂CO₃), Aseton, Hekzan, Metanol, Mueller Hinton Agar, Mueller Hinton Broth; Lonza marka RPMI-1640, Sodyum piruvat ve PBS. Lonza marka FBS ve Trypsin K₂HPO₄ (Fosfat tampon), EDTA (Ethylene daimine tetra acetic acid), Ferrozin, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, KCl (Potasyum klorür), Ascorbat, Trolox, dimetil sülfoksit (DMSO), Bioshop XTT.

4.3.Kullanılan PDI/Arg, APICP ve DHMC maddelerinin açık yapıları

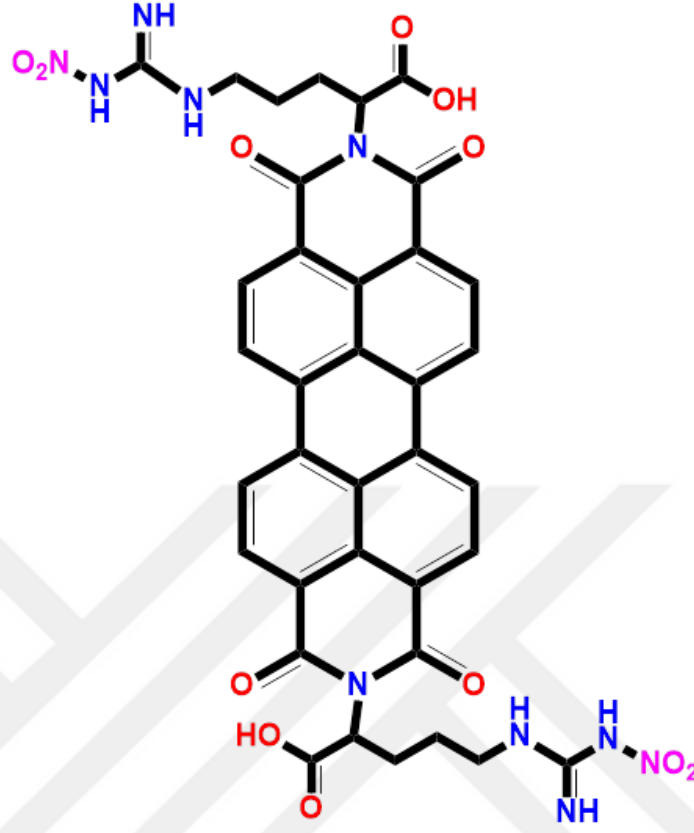
Prof. Dr. İbrahim YILMAZ ve ekibi tarafından sentezlenen ve tez kapsamında çalışılan karbonat sensörü DHMC (Şekil 3.1), Fe³⁺ ve Hg²⁺ iyonları sensörü APICP (Şekil3.2) ve tiyol grupları sensörü PDI/Arg (Şekil 3.3) bileşiklerinin açık yapıları aşağıda sırasıyla verilmektedir.



Şekil 3.1. Karbonat sensörü ve kumarin türevi DHMC bileşiğinin (7,8-dihydroxy-3-(3-methylphenyl) coumarin) açık yapısı.



Şekil 3.2. Fe^{3+} ve Hg^{2+} iyonları sensörü ve kumarin APICP bileşiğinin (2-amino-4-fenil-6- (izookumarin-3-il)-3 siyanopiridine) açık yapısı.



Şekil 3.3. Biyolojik tiyollerin sensörü ve perilen diimit türevi PDI/Arg (2S,2'S) 2,2'-(1,3,8,10-tetraoxoantra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline-2,9-(1H,3H,8H,10H)-diyl)bis(5-(3-nitro-guanidino)pentanoic acid) bileşiğinin açık yapısı.

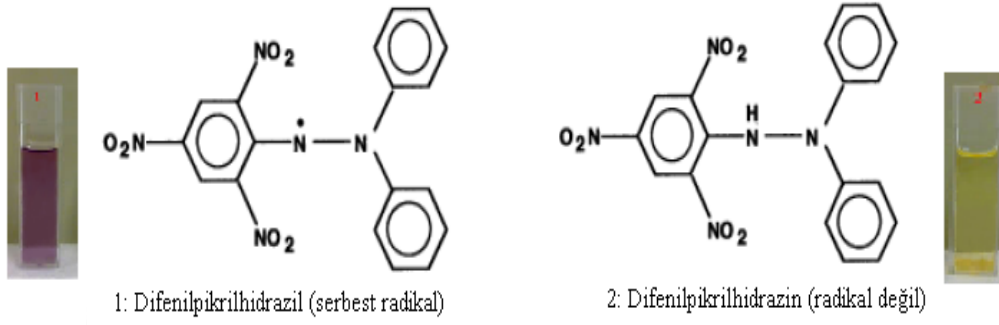
4.4. Antioksidan aktivitesi tayin yöntemleri

DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) radikali yakalama aktivitesi, ABST radikal yakalama aktivitesi ve indirgeme gücü aktivitesi belirleme yöntemleri kullanılmıştır

4.4.1. DPPH serbest radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesi

Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi tipik olarak, antioksidan bileşiklerin bir karışımını içeren bir çözeltinin hedef serbest radikallerle reaksiyona girmesiyle sağlanır. DPPH süpürücü radikal yöntemi, antioksidan kapasiteyi belirlemek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, DPPH radikalinin tüketiminin bir antioksidan bileşik (genellikle fenolik bileşikler) tarafından ölçülmesine dayanır (Akar, Küçük ve Doğan, 2017). DPPH radikalini tüketme yeteneğini değerlendirmek için en

yaygın kullanılan bu yöntem, reaksiyondan sonra DPPH radikalinin absorbansındaki azalmanın spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır (Sridhar ve Charles, 2019). Şekil 3.4'te DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği tepkime sonucu renginde meydana gelen değişim gösterilmektedir.



Şekil 3.4. DPPH radikalinin difenil-pikrilhidrazine dönüşümü ve bu dönüşüm sonucunda meydana gelen renk değişimi.

DPPH çözeltilisindeki renk açılması ne kadar fazla ise reaksiyon karışımındaki absorbans daha fazla düşmeyecektir. Bu nedenle belirli standart değerler içerisinde elde edilen düşük absorbans daha fazla radikal süpürme kapasitesi demektir. Bu renk değişimi 517 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir. Bu bağlamda maddelerin DPPH radikalinin yarısını süpürebildiği konsantrasyon yani IC₅₀ değerleri belirlenir. IC₅₀ değerinin düşük olması antioksidan kapasitenin oldukça güçlü olduğunu anlamına gelmektedir (Akar, Küçük ve Doğan, 2017).

Tez çalışması kapsamında DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan aktivitesi DPPH radikalini yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemde standart olarak gallik asit (0,005- 0,01- 0,02- 0,04- 0,06- 0,08- 0,1- 0,2 mM), APICP bileşiği (0,025- 0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1- 2- 4- 6- 8- 10 mM), DHMC bileşiği (0,02- 0,04- 0,06- 0,08- 0,1- 0,15- 0,2 mg/mL) ve PDI/Arg bileşiği (0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1- 2 mg/mL) stok olarak hazırlanmıştır. Yönteme göre maddelerden ve standartlardan, her bir 96'lık mikro plaka kuyucuğuna 20 µL koyulmuş ve üzerlerine 180 µL DPPH (metanol içerisinde çözünmüş 0,06 mM) eklenmiştir. Karanlık oda sıcaklığında 60 dk inkübasyonda bekletildikten örneklerin 517 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve DPPH radikalinin indirgenmesi belirlenmiştir. DPPH radikal yakalama aktivitesi için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

4.4.2. Toplam antioksidan kapasitenin (TAK) belirlenmesi

Toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için bu zamana kadar birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bir tanesi de Troloks (6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilkroman- 2-karboksilik asit) eşiti antioksidan kapasitenin belirlenmesidir. Bu yöntemi ilk defa Miller ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir(Miller ve ark., 1993). Yöntem; 660, 734 ve 820 nm’de maksimum dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren ABST (2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit)) radikalinin absorpsiyon değerlerinin antioksidanlar tarafından baskılanması temeline dayanmaktadır. Bu bağlamda da potasyum persülfid ile ABTS'nin oksidasyonu sonucu ABTS•+ radikali oluşturulur. Antioksidanların varlığında çözelti absorpsiyonunda ortaya çıkan azalma toplam antioksidan kapasite ile doğru orantılıdır (Liang ve Kitts, 2014). Yöntemde E vitaminin suda çözünen analogu olan Trolox, standart referans olarak kullanılmaktadır (Milajerdi ve ark., 2019).

Toplam antioksidan kapasite ABTS yöntemi kullanılarak literatüre uygun olarak belirlenmiştir(Erel, 2004). Yönteme göre 96’lık mikroyuvarlak kuyucuklarına ilk önce 250 µL R1 reaktifi (0,4 M sodyum asetat, pH: 5,8) koyulmuştur. Ardından üzerlerine 15 µL değişik konsantrasyonlarda (0,01- 0,02- 0,06- 0,08- 0,10- 0,20 mM) Trolox, DHMC (0,025- 0,05- 0,075- 0,10- 0,15- 0,25- 0,50- 1,00 mM), APICP (0,025- 0,05- 0,075- 0,10- 0,15- 0,25- 0,50- 1- 2- 4- 6- 8- 10 mM) ve PDI/Arg (0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1- 2 mM) konulmuştur. Daha sonra 5 dk bekletilip 660 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı absorpsiyonları belirlenmiştir. Ardından 35 µL R2 (30 mM sodyum asetat, %35 H₂O₂, 10 mM ABTS, pH:3,6) eklendikten sonra 5 dk bekletilip 660 nm dalga boyunda absorpsiyonları belirlenmiştir. TAK değerleri µmol Troloks eşleniği/mg protein olarak hesaplanmıştır.

$$TAK \left(\frac{\text{Trolox eq}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{(\Delta \text{Absorb H}_2\text{O}) - (\Delta \text{Absorb Örnek})}{(\Delta \text{Absorb}) - (\Delta \text{Absorb Standart})}$$

4.4.3. İndirgeme gücü aktivitesinin belirlenmesi

Bu metotta antioksidan maddenin indirgeme gücüne bağlı olarak antioksidan kapasitesi belirlenir. Potasyum ferrisiyanid [$K_3Fe(CN)_6$] maddesindeki Fe(III) iyonlarının antioksidan reaksiyon sistemi içerisinde Fe(II) iyonlarına indirgenmesi 700 nm de ölçülerek antioksidan aktivite belirlenir. Bu yöntemde yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme potansiyelini göstermektedir.

DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin indirgeme gücü Oyaizu metodu kullanılarak belirlenmiştir(Oyaizu, 1986). Yöntemde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. 96'lık mikroluka kuyucukları içine değişik konsantrasyonlarda (0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1,0- 2,0 mM) gallik asit ve değişik konsantrasyonlarda APICP, DHMC ve PDI/ARG maddelerinden (0,025-10 mg/mL) 50 µL konulmuştur. Üzerlerine 75 µL fosfat tamponu (0,2 M pH:6,6) ve 75 µL $K_3Fe(CN)_6$ (%1 w/v) çözeltileri ilave edildikten sonra vortekslenmiştir. Daha sonra 20 dakika 50°C sıcaklıkta inkübe edilen örneklerin üzerine 75 µL trikloroasetik asit (%10 w/v) çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika 1.000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen karışımın üzerinden 75 µL alınıp başka bir mikro plakaya konularak üzerine 75 µL distile su ve 15 µL $FeCl_3$ (0,1% w/v) çözeltisi eklenmiştir. Ardından spektrometrede 700 nm'de köre karşı absorbansları okutulurak 0,50 absorbans veren örnek miktarları (EC_{50}) belirlenmiş ve örneklerin indirgeme gücü tayin edilmiştir.

4.5.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

4.5.1. Disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel etkinliklerin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan en çok kullanılan yöntem disk difüzyon metodudur (Behravan ve ark., 2019). Bu yöntemde bakterilerin katı besiyerine ekimi yapılmaktadır. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan maddelerin emdirildiği kâğıt diskler ve standart antibiyotikler besiyerine yerleştirilerek belli bir süre ve sıcaklıkta inkübasyonda tutulur. Daha sonra besiyerlerinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüm yapılarak karşılaştırma yapılır(Ren ve ark., 2019).

Çalışmada kullanılan beş adet test bakterisi (*Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* 0157:H7 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC 2921)

Mueller Hinton Broth (MHB) sıvı besiyer ortamında çalkalayıcı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Test edilen mikroorganizmalardan *B. subtilis*, *Salmonella*, *B. licheniformis* ve *S. aureus* ATCC 2921 gram pozitif bakteri iken *E. coli* 0157:H7 ATCC 43895 gram negatif bakteridir. Sıvı kulture ekilerek 35°C 175 rpm'de bir gece inkübasyonda çoğaltılan mikroorganizmaların yoğunlukları 0,5 Mc Farland (10^6 CFU/mL) standardına eşit olacak şekilde ayarlanarak antibiyogramların yapılacağı Mueller Hinton Agar besi yerlerine 100 µL yayma ekim yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Disk difüzyon yöntemi için DHMC maddesi 75 mM, APICP maddesi 20 mM ve PDI/ARG 10mM olacak şekilde DMSO içinde çözülerek stok hazırlanmıştır.

Disklere hazırlanan mikroorganizmalar paralelli olmak üzere yayma ekim metodu kullanılarak Mueller-Hinton agar besi yerlerine ekim yapılmıştır. Hazırlanan DHMC, APICP ve PDI/ARG maddeleri boş antibiyotik disklerine bir yüzüne 20 µL olacak şekilde emdirilmiş ve bu diskler paralelli olacak şekilde ekilmiş besi yerlerine yerleştirilmiştir. Standart antibiyotikler olarak gentamicin ve tetrasiklin kullanılmıştır. Hazırlanan test ekim yerleri bir gece 35°C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda disklerin çevresinde meydana gelen disk boyutu 6 mm olan inhibisyon zonları disk etrafında en küçük boşluktan cetvel yardımıyla ölçüm mm olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar antimikrobiyal etkinlikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak da DMSO kullanılmıştır.

4.5.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirleme

Farklı konsantrasyonlarda test edilen antimikrobiyal maddelerin, mikrobiyal gelişimi tamamen durdurduğu ya da engellediği en küçük derişim Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak ifade edilmektedir. MİK değerlerini belirlemek amacıyla sıvı besiyerlerinde ya da katı besiyerlerinde antimikrobiyal etkisi olan bileşiklerin belirli seyreltme oranlarında eklenmesiyle hazırlanan besi ortamları kullanılmaktadır. Bir antimikrobiyal madde için MİK değeri mikroorganizma, inkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı gibi farklı analiz koşullarının etkisiyle değişiklikler gösterebilmektedir (Belete, 2019).

DHMC, APICP ve PDI/Arg maddelerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerine MİK değerlerinin belirlenmesi için çalışılacak konsantrasyonların iki katı örnek

hazırlanmıştır. Bir önceki aşamada hazırlanan DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşikleri başlangıç konsantrasyonları 1 olarak kabul edilerek 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 seyreltme yapılarak steril olarak hazırlanmıştır. Bir gün önceden ekilen (18-24 saat) ve uygun sıcaklıkta inkübe edilen test organizmalarının (*Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* 0157:H7 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC 2921) konsantrasyonları, 0,5 Mc Farland standardı (10^6 CFU/mL) kullanılarak steril Mueller Hinton broth besiyeri oluşturulmuştur. Mikro plaka üzerinde kuyucuklar uygun konsantrasyonlara göre belirlenmiş, 96 kuyucuklu mikroplakalarda paralelli olacak şekilde her kuyucuğa 75µL test çözeltisi ve 75µL mikroorganizmalı besi yeri koyularak gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak 3 farklı ortam kullanılmıştır: Bunlar, a) 75µL örnek + 75µL ekilmemiş besi yeri, b) 75µL uygun hazırlanmış organizma + 75µL ekilmemiş besi yeri, c) 150µL ekilmemiş besi yeridir.

Daha sonra mikro plakaların üzeri steril bir alüminyum folyo ile kapatılarak 35 °C'de inkübatörde bir gece bekletilerek inkübe edilmiştir. Süre sonunda her petri ayrı ayrı değerlendirip görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Ardından, mikro plakaya 75 µL kristal violet (%0,1 seyreltilen) eklenmiş, 5 dk inkübasyonun ardından 660 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

4.6.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan enzimler üzerine etkileri

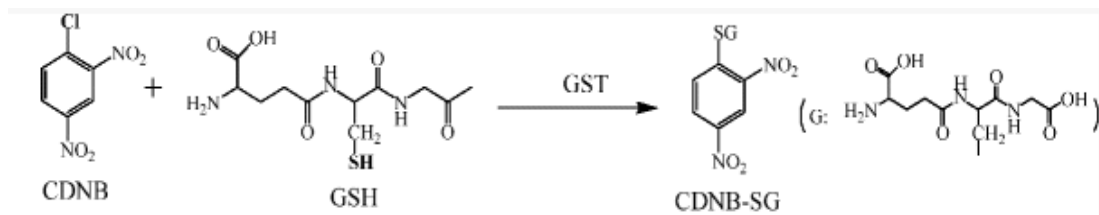
4.6.1. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Katalaz, hidrojen peroksinin su ve oksijene dönüştürülmesini katalizleyen ve böylece hidrojen peroksinin hücrel bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir antioksidan enzimdir. Katalaz enzim aktivitesi Aebi' nin (1974) metodu kullanılarak ölçülmüştür ve bu aktivite ölçümünde substrat olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır. 240 nm de absorbans veren hidrojen peroksinin katalaz tarafından suya dönüştürülmesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan bu yöntemde hidrojen peroksinin ekstinksiyon katsayısı 0.00364 (L/mmol.mm) olarak kullanılmıştır. Aktivite ölçümü için 96'lık UV geçirgen mikroplaka kuyucuklar içerisine 230 µL fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,0) 10 µL sıçan karaciğer homojenatı (400 kat seyreltilmiş), 10 µL değişik konsantrasyonlarda DHMC, APICP ve PDI/Arg

bileşiklerinden farklı dozlarda (0-10,0 mg/mL) eklenmiştir. Ardından 50 µL H₂O₂ değişik konsantrasyonlarda H₂O₂ (400 mM, 300 mM, 200 mM, 100 mM, 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM) eklenmiş ve enzimatik reaksiyon başlatılmıştır. Absorbans değişimi 240 nm’de 2 dakika boyunca ölçüldükten sonra, katalaz spesifik aktivitesi 1 dakikada 1 mg protein içeren karaciğer homojenatının nötürleştirdiği hidrojen peroksit miktarı olarak hesaplanmıştır. DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin katalaz enzimini hangi mekanizmayla baskıladığını belirlemek için substrat bağımlı enzimatik hız ölçümleri alınmış ve maddelerin yokluğunda ve farklı dozlu uygulamalarında Micheales-Mentan kinetiğine uygun olarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Farklı miktarlarda uygulanan DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşikleri için katalaz enziminin nasıl baskılandığı araştırılmış ve baskılama için IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

4.6.2. DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin karaciğer toplam Glutasyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi üzerine etkileri

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizlemektedir. GST aktivite ölçümü için en yaygın kullanılan aromatik elektrofil, 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB)’dir. Bu substratın kullanılmasıyla elde edilen dinitrobenzen S-glutasyon (CDNB-SG) ürünü 340 nm’de maksimum absorbans göstermektedir ve bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Ren ve ark., 2015).

Toplam GST aktivitesi Habig ve arkadaşlarının (Habig ve ark., 1974) geliştirdiği yöntemle göre CDNB ve GSH substratları kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre UV geçirgen mikropilaya kuyucukları içine 240 µL fosfat tamponu (50 mM; pH:7,0) ve 10 µL değişik konsantrasyonlarda (0,1-10 mg/mL) DHMC, APICP ve PDI/Arg maddelerinden eklenmiştir. Üzerine 20 µL GSH (20 mM), 15 µL karaciğer homojenatı (25 kat seyreltilmiş) ve farklı konsantrasyonlarda 15 µL CDNB (200 mM, 100 mM,

50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM), (3/2 etanol/su içinde çözülmüş) eklenmiştir. Absorbans değişimi 340 nm'de 2 dakika ölçülerek dakikadaki absorbans değişimi hesaplanmıştır. Ayrıca enzimatik olmayan CDNB-GSH reaksiyonunu belirlemek için enzimsiz reaksiyon hızı da belirlenmiş ve bu oran toplam reaksiyon değişiminden çıkarılmıştır. Karaciğer dokularındaki toplam GST aktivitesi ise bir dakikada bir mg protein içeren homojenatın oluşturduğu ürün miktarı olarak hesaplanmıştır. DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin GST enzimini hangi mekanizmayla baskıladığını belirlemek için substrat bağımlı enzimatik hız ölçümleri alınmış ve maddelerin yokluğunda ve farklı dozlu uygulamalarında Micheales-Menten kinetiğine uygun olarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. İlk olarak CDNB konsantrasyonları değiştirilerek elde edilen Michealis-Menten grafikleri DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin farklı dozlarda uygulamasıyla belirlenmiş, ardından bileşiklerin CDNB bağımlı GST aktivitesini nasıl değiştirdiği incelenmiştir. Farklı doz DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşikleri için GST-CDNB aktivitesi K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve enzimatik baskılamayı gösteren IC_{50} değeri hesaplanmıştır.

Glutasyon-S-Transferaz (GST) enziminin bir diğer substratı ise indirge glutatyondur (GSH). DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin GSH bağımlı GST aktivitesini nasıl değiştirdiği yine enzim kinetiği çalışmalarıyla belirlenmiştir. Bu çalışmalarda CDNB konsantrasyonu sabit tutularak GSH bağımlı toplam GST aktivitesi, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin farklı dozlarında belirlenmiştir. Bu çalışmalarda DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin farklı konsantrasyonları (0,1-0,5-1-2-5-10 mg/mL), GSH bileşiğinin farklı konsantrasyonları (200 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM) kullanılmıştır. Her bileşik dozu için K_m ve V_{max} değerleri bulunmuş ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

4.7.DHMC, APICP ve PDI/ARG bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi

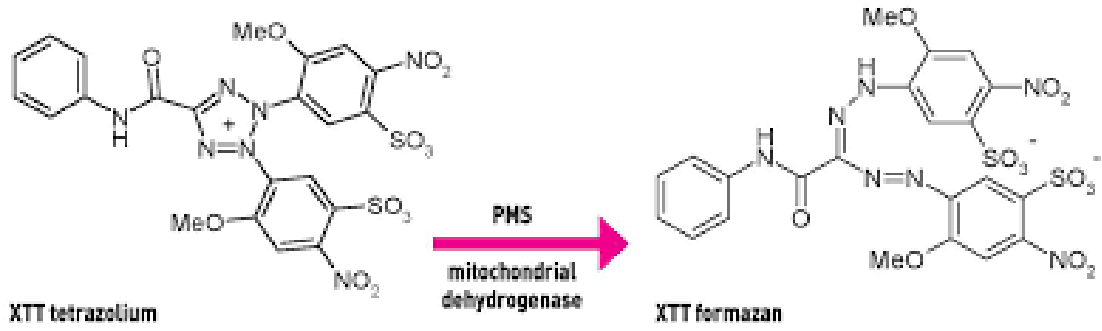
4.7.1. Hücre kültürü çalışmaları

DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin sitotoksik etkilerini incelemek için insan karaciğer kanser hücre hattı HepG2 ve meme kanser hücre hattı MCF-7 kullanılmıştır. HepG2 hücrelerinin büyütülmesi için yüksek glikoz içerikli DMEM ortamı, MCF-7 hücrelerinin yetiştirilmesi için ise RPMI besiyeri kullanılmıştır. Her iki besiyeri de

%10 (w/v) FBS, %1 (w/v) L-glutamin, %1 (w/v) Penicillin-Streptomycin ile zenginleştirilmiştir. Hücrelerin büyütülmesi %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde (Panasonic MCO 17AIC, ABD) %90 doluluğa ulaşana kadar sürdürülmüştür. Tripsin/EDTA solüsyonu ile kaldırılan hücreler bölünerek yeni büyüme ortamlarına alınmıştır. Hücreleri saklamak için, PBS ile yıkanan hücreler tripsin yardımıyla yüzeyden kaldırıldıktan sonra 15 mL'lik falkon tüplere alınmıştır. 200g'de 5 dk santrifüj edilen hücrelerin üzerine dondurucu besiyeri (freezing medium) (dimetil sülfoksit (DMSO)/Besiyeri (1/9 (v/v)) eklenerek cryo tüplerinde eşit dağıtım yapılmıştır. Tüpler MrFrosty™ (Sigma, ABD) içine yerleştirilerek -85°C derin dondurucuda 1 gece bekletildikten sonra sıvı azot örnek saklama tankına alınmış ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Sitotoksosite deneylerinde kullanılacak hücrelerin sayımı için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonra hücre sayım cihazının (TC10, BioRad, Almanya) slaytlarına yüklenmiştir. Slaytlara yüklenen hücrelerin sayısı (canlı ve ölü) belirlenerek eşit sayıda hücre kullanılmak üzere sitotoksosite deneylerine geçilmiştir.

4.7.2. XTT sitotoksosite testi

XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) sitotoksosite testinin temeli, mitokondri elektron taşıma zincirinde bulunan koenzim Q'dan PMS (phenazine metabisulphide)'nin elektron yakalayıp XTT'nin indirgenmesini sağlayarak renk değişimine dayalı absorban ölçümü yapmaktır. Sağlam mitokondriyal ve hücre zarı olan canlı hücreler aktif bir elektron taşıma zincirine sahiptir. Bundan dolayı, aktif hücrelerin sayısı fazlaştıkça, hücrelerin mitokondriyal enzimlerinin aktivitesi ve oluşan boyanın konsantrasyonu artar (Şekil3.6). Bu yeni oluşturulan boyanın yoğunluğunun ölçümü 450 nm'de yapılır (Abe ve Matsuki, 2000) ve renk yoğunluğu hücre canlılığı ile doğru orantılıdır.



Şekil 3.6. XTT'nin canlı hücrelerde enzimatik dönüşüm reaksiyonu.

DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksik etkilerini incelemek için laboratuvarımızda optimize ettiğimiz XTT sitotoksikite testi kullanılmıştır. Yöntemde Tripan mavisi ile boyanan hücreler, hücre sayım cihazında (TC-10, Bio-RAD, Almanya) sayılmış ve hücre yoğunluğu 5×10^4 hücre/kuyu/100 μ l olacak şekilde 96'lık kültür plakalarına ekilmiştir. Yüze yapışması için altı saat inkübatör içerisinde bekletilen hücreler üzerine uygun besiyeri içerisinde hazırlanmış farklı dozlarda (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/mL) 50 μ l DHMC, APICP ve PDI/Arg eklenmiştir. 48 saat madde uygulamasının ardından hücrelerin üzerine uygun besiyeri içerisinde hazırlanmış 25 μ l XTT reaktifi (1 mg/ml XTT, 25 μ M PMS) eklenmiş ve ilave olarak iki saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin ardından spektrofotometrik mikropilaka okuyucuda (MultiScan™ Go, Thermo Scientific, ABD) 450 nm de absorpsanları alınan hücrelerde hücre canlılıkları hesaplanarak IC_{50} değeri bulunmuştur.

4.8. Floresan hücre görüntüleme çalışmaları

Tez çalışması kapsamında DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin hücre içerisinde sırasıyla karbonat, Fe^{3+}/Hg^{2+} ve tiyol gruplarının tayini için kullanılabile potansiyelleri floresan hücre görüntüleme çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır.

4.8.1. DHMC için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları

Tez çalışmamız kapsamında DHMC'nin hücre içi görüntüleme kullanılabile potansiyeli, HepG2 hücreleri kullanılarak floresan görüntüleme çalışmalarıyla araştırılmıştır. Bunun için laboratuvarımız hücre stoklarında yer alan HepG2 hücreleri steril 12 kuyulu kültür plakalarına 1×10^5 hücre/500 μ L olacak şekilde ekilmiş ve

yaklaşık 4-6 saat hücrelerin yüzeye (adezyon) tutunması için inkübatör içerisinde (%95 nem, %5 CO₂, 37°C) (Panasonic MCO 17AIC, ABD) beklenmiştir. Ardından hücreler bir saat boyunca DMSO-PBS tamponu (%5 DMSO, %95 PBS) ile hazırlanan 100 µM DHMC çözeltisiyle inkübe edilmiş ve PBS tamponuyla iki kez yıkanmıştır. Bu işlemin ardından hücreler, DMSO-PBS ile hazırlanan 100 µM sodyum karbonat çözeltisiyle ilave bir saat daha inkübe edilmiştir. DHMC ve karbonat inkübasyonlarından önce ve sonra, flüoresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Bad, Almanya) kullanılarak hücrelerin parlak alan faz kontrast ve floresan görüntüleri alınmıştır.

4.8.2. APICP için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları

HepG2 hücreleri 24 kuyulu kültür plakaları içerisinde büyütülmüş ve ardından hücreler 400 µM APICP (DMSO-PBS tamponu içerisinde) ile 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra, üç kez PBS çözeltisi ile yıkanmış ve ayrıca 30 dakika boyunca ayrı ayrı Fe⁺³ ve Hg⁺² çözeltileri (her biri 100 µM) ile inkübe edilmiştir. PBS ile başka bir yıkama aşamasının ardından, floresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Bad, Almanya) ile metal iyon uygulamalarından önce ve sonra hücrelerin parlak bir alan faz kontrast ve floresan görüntüleri alınmıştır.

4.8.3. PDI/Arg için hücre kültürü ve floresan görüntüleme çalışmaları

Tez çalışmamız kapsamında ayrıca PDI/Arg bileşiğinin HepG2 hücreleri içerisinde tiyol gruplarının tayininde kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır. Bunun için farklı HepG2 hücreleri 100 µM PDI/Arg ve 100 µM PDI/Arg-Hg²⁺ çözeltileriyle 60 dakika inkübe edilmiştir. Üç kez PBS solüsyonuyla yıkanan hücrelerin floresan görüntüleri floresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Bad, Almanya) kullanılarak alınmıştır. Bununla birlikte bir başka deney setinde benzer floresan görüntüleme çalışmaları, hücre içi tiyol gruplarının baskılanmasını sağlayan 100 µM NEM (N-ethylmaleimide) çözeltisiyle 60 dakika boyunca ön muamele edilen HepG2 hücreleri kullanılarak tekrarlanmıştır. NEM bileşiği hücre içerisinde tiyol grupları baskılamış ve Hg²⁺ iyonlarının tiyol gruplarıyla yer değiştirmesi engellenmiştir.

4.9.İstatistiksel Analiz

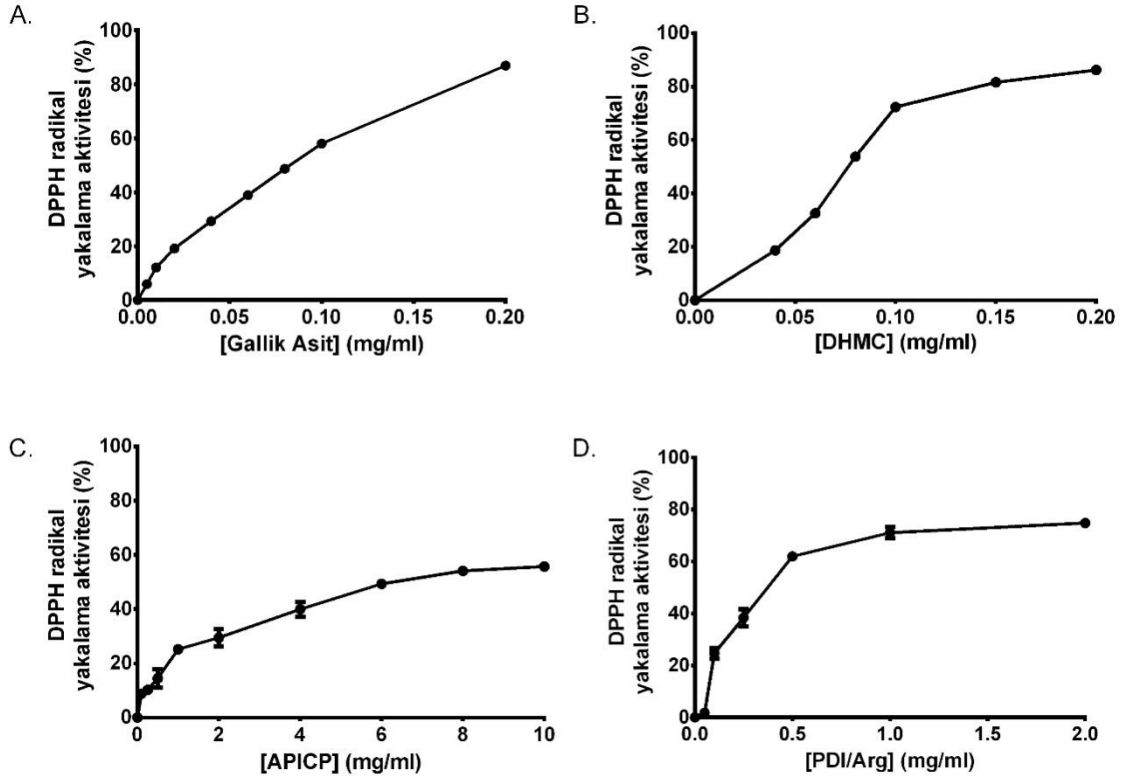
Aritmetik ortalamaları, standart sapmaları (SD) ve ortalamanın standart hataları (SEM) hesaplanan veriler ortalama \pm SEM şeklinde ifade edilmiştir. Her ölçüm en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Km, Vmax, EC₅₀ ve IC₅₀ değerleri GraphPad 6.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.



5. BULGULAR

5.1.APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin DPPH serbest radikal yakalama etkileri

Test edilen floresan problemlerin farklı konsantrasyonlarının serbest radikal DPPH'yi indirgeme aktivitelerine bakıldığında, her madde için konsantrasyon oranı arttıkça radikal yakalama etkinliğinin de yükseldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Test edilen üç maddenin DPPH yakalama aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek oranı %86,22 baskılamayla DHMC 0,2 mg/mL'lik konsantrasyonunda göstermiştir. En yüksek ikinci DPPH yakalama aktivitesi ise (%74,81) PDI/Arg bileşiğinin 2 mg/mL'lik konsantrasyonunda görülmüştür. APICP bileşiğinin en yüksek kullanım dozu olan 10 mg/mL'lik konsantrasyonda bile DPPH baskılamasının %55,69 oranında gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda serbest radikal yakalama etkinliği en yüksek bileşik DHMC, en düşük ise APICP olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Gallik asit, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin DPPH radikal yakalama aktivitesi.

Ayrıca üç madde türünün çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonları için DPPH radikallerinin inhibisyon etkileri hesaba katılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Standart antioksidan olarak kabul edilen gallik asit için hesaplanan IC₅₀ değeri 0,075±0,005 mg/mL olarak hesaplanırken, DHMC bileşiği düşük IC₅₀ değeri (0,076±0,003 mg/mL) ile gallik asite en yakın radikal yakalama aktivitesi göstermiştir. Analiz edilen bileşiklerden en düşük DPPH yakalama aktivitesini (IC₅₀: 6,746 ± 0,511mg/mL) APICP göstermiştir. Biyolojik tiyollerin tayininde kullanılabilecek PDI/Arg bileşiğinin IC₅₀ değeri ise 0,389 ± 0,053 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

5.2.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin ABTS radikali yakalama aktiviteleri: Toplam antioksidan kapasite belirlenmesi

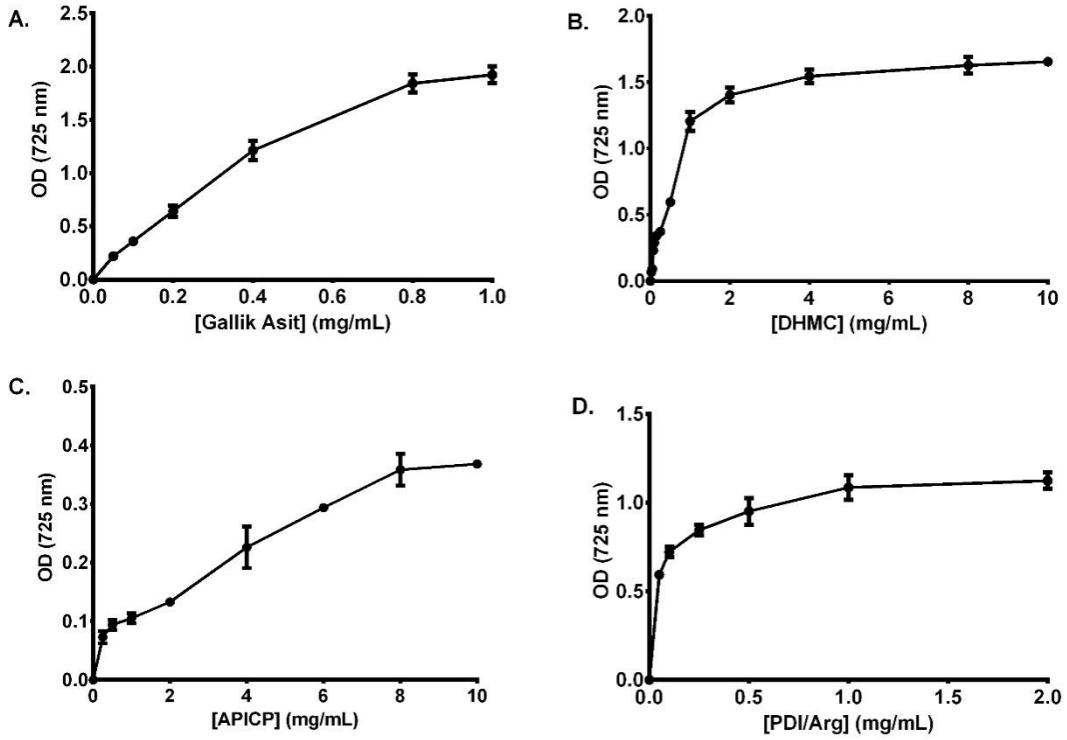
Hücrelerde bulunan antioksidanlar arasında güçlü bir etkileşim bulunmaktadır ve genellikle bu etkileşim sinerjik olarak çalışmaktadır. Bu sinerjik etkileşimler, hücrelerde bileşiklerin kendi başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla etki oluşturmaya sebep olmaktadır. Bundan dolayı, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde antioksidanların tek başına olan değeri yerine genellikle toplam antioksidan değerini veren total antioksidan kapasite ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, DHMC, APICP ve PDI/Arg maddelerinin toplam antioksidan kapasiteleri ABTS yakalama yöntemine göre (TAK) Trolox eşdeğeri olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. DHMC, APICP ve PDI/Arg maddelerinin total antioksidan kapasiteleri incelendiğinde DHMC bileşiğinin antioksidan kapasitesinin DPPH radikal yakalaması etkinliği sonuçlarıyla paralel olarak en yüksek düzeyde (6,742±0,021 µmol Trolox Equv/L) olduğu belirlenmiştir. Ancak DPPH radikal yakalama etkinliği sonuçlarından farklı olarak toplam antioksidan kapasitenin en düşük olduğu bileşik PDI/Arg'dır (0,132 ± 0,005µmol Trolox Equv/L). APICP bileşiğinin Trolox eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesinin DHMC bileşiği ile benzerlik (6,680 ± 0,045 µmol Trolox Equv/L) göstermektedir. Bu durumun nedeni DHMC ve APICP bileşiklerinin her ikisinin de kumarin türevi bileşikler olması olarak açıklanabilir.

Çizelge 4.1. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin Trolox eşdeğeri total antioksidan kapasitesi sonuçları. Her ölçüm en az dört kez alınmış olup veriler bu ölçümlerin ortalaması ± standart hatası olarak ifade edilmiştir.

İncelenen Bileşik	TAK değeri ($\mu\text{mol Trolox Equv/L}$)
DHMC	6,742 \pm 0,021
APICP	6,680 \pm 0,045
PDI/Arg	0,132 \pm 0,005

5.3.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin indirgeme gücü

Potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] içerisindeki Fe(III) iyonlarının antioksidan maddeler varlığında Fe(II) iyonlarına indirgenmesi sonucunda Gallik asit (GA), DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin indirgeme gücü aktivitesi belirlenmiştir. Kullanılan bileşiklerin indirgeme güçleri, kullanılan konsantrasyon miktarıyla doğru orantılıdır ve konsantrasyon miktarının artmasıyla indirgeme gücünün de yükseldiği görülmektedir (Şekil 4. 2). DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin indirgeme gücü aktivitesini belirlemek için maddelerin çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonları için EC_{50} (absorbansın 0,50 olduğu etkin konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır. Buna göre indirgeme gücü etkinlikleri PDI/Arg (EC_{50} : 0,024mg/mL) > GA (EC_{50} :0,110 mg/mL) > DHMC (EC_{50} :0,186 mg/mL) > APICP (EC_{50} :70,63 mg/mL) şeklinde sıralanmaktadır. Bu sonuçlar perilen türevi PDI/Arg bileğinin standart şelatlama molekülü gallik asitten bile yaklaşık 5 kat daha fazla indirgeme gücüne sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Gallik asit, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının indirgeme gücü grafikleri.

5.4.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antimikrobiyal etkileri

Antimikrobiyal test sonuçlarına göre DHMC bileşiğinin en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, *B. licheniformis*, *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı yüksek derecede etkin olduğu gösterilmiştir. APICP bileşiğinin *E.coli* ve *B. licheniformis*'e üzerine antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır. Bu bileşik *S. aureus*, *B. subtilis* ve *Salmonella* üzerine antimikrobiyal etki göstermiş ancak bu etki DHMC bileşiğinin yaklaşık yarısı kadardır. Bununla birlikte PDI/Arg bileşiğinin kullanılan dozlarda test edilen tüm bakterilerin üstüne hiçbir antimikrobiyal etkisi görülmemiştir. DHMC molekülü test edilen bütün bakteriler için antibiyotik etkinliğe sahip bir bileşiktir. Bu bileşik etki büyüklüğü olarak karşılaştırıldığında diğer maddelere oranla daha fazla inhibisyon zon alanı (IZ:mm) oluşturmuştur. Çalışılan madde örneklerinin mikrorganizmalar üzerine etkileri Çizelge 4.2'de özetlenmektedir.

Çizelge 4.2.APICP, DHMC ve PDI/Arg maddelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyogram sonuçları (İZ: İnhibisyon zonu-mm). S1: Gentamicin, S2: Tetrasiklin

	APICP	DHMC	PDI/Arg	DMSO	STANDART
<i>E. coli</i>	Açılma yok	6 mm	Açılma yok	Açılma yok	S1= 15 mm, S2= 19 mm
<i>B. licheniformis</i>	Açılma yok	16 mm	Açılma yok	Açılma yok	S1= 21 mm, S2= 17 mm
<i>B. subtilis</i>	7 mm	16 mm	Açılma yok	Açılma yok	S1= 18 mm, S2= 27 mm
<i>S. aureus</i>	7 mm	15 mm	Açılma yok	Açılma yok	S1= 16 mm, S2= 26 mm
<i>Salmonella</i>	7 mm	14 mm	Açılma yok	Açılma yok	S1= 20 mm, S2= 27 mm

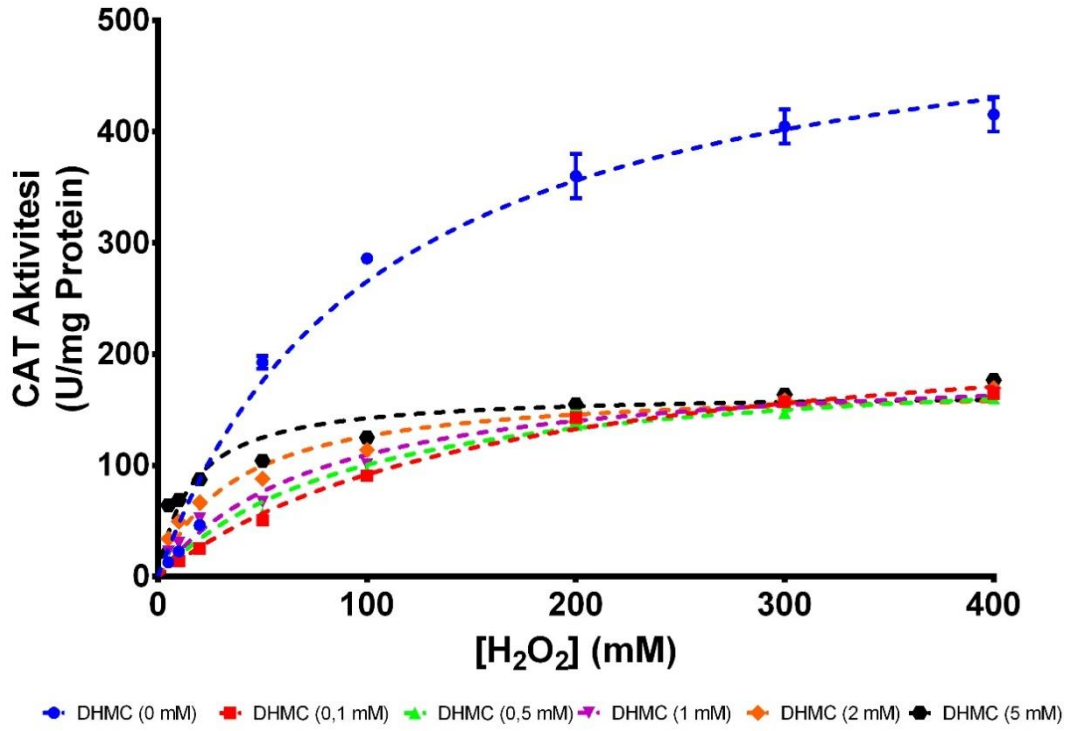
Bir mikroorganizmanın görülebilecek şekilde üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu “Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK)” olarak tanımlanmaktadır. MİK çalışması sonunda DHMC maddesi *Salmonella* üzerinde inhibe edici etki göstermemişken, *E. coli*, *B. subtilis*, *B. Licheniformis* üzerinde 0,0625 kat seyreltme de inhibe edici etki göstermiş, *S. aureus* ise 1 kat seyreltmede inhibe edici özellik göstermiştir. DHMC maddesinin *E. coli*, *B. subtilis*, *B. Licheniformis* mikroorganizmaları üzerindeki etkisi *S. aureus*’ a göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. APICP bileşiği *Salmonella* ve *S. aureus* üzerinde inhibe edici etki göstermemiştir. Fakat *E. coli*, *B. subtilis*, *B. Licheniformis* üzerinde 0,0625 kat seyreltme de inhibe edici etki göstermiştir. Bazı mikroorganizmalar için kullanılan en yüksek konsantrasyonda bile tamamen baskılama gözlemlenmediğinden dolayı MİK değeri belirlenememiştir.

5.5.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

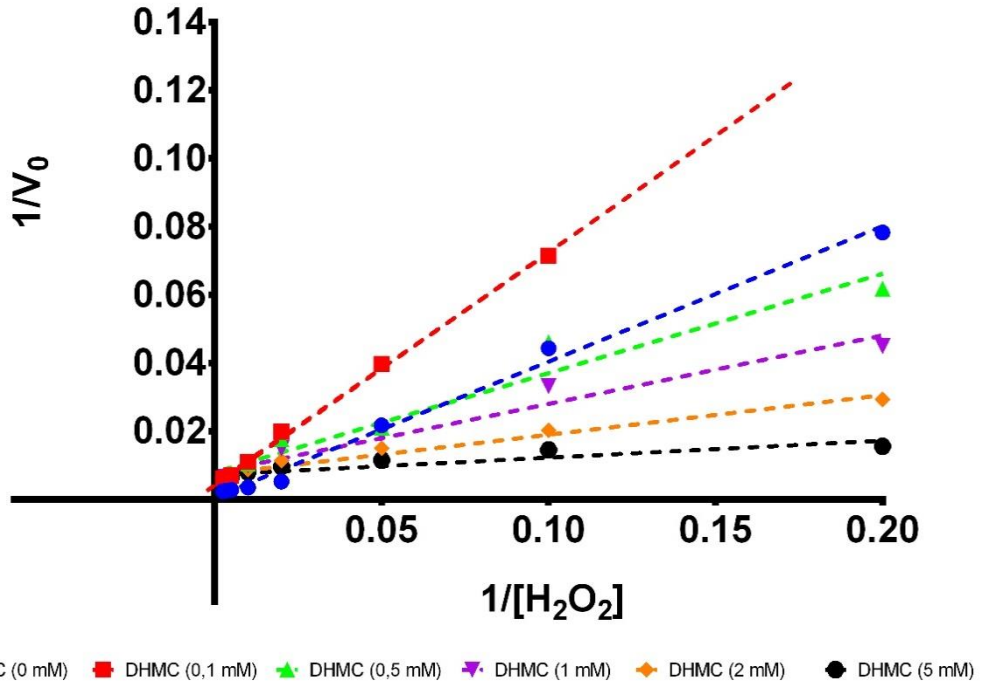
Çalışma kapsamında sıçan karaciğer doku homojenaları kullanılarak ana antioksidan enzimlerden biri olan CAT enzimi için kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiş, farklı substrat (H_2O_2) konsantrasyonları kullanılarak V_0 (ilk hız) düzeyleri belirlenmiştir. Buna göre Michaelis-Menten grafikleri oluşturulmuş, Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak CAT için V_{max} ($541,1 \pm 19,96$ U/mg) ve K_m ($104 \pm 10,81$ mM) değerleri hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında DHMC, APICP, PDI/Arg bileşiklerinin CAT

enzimi üzerinde nasıl bir etki gösterdiğini araştırmak amacıyla yukarıda belirtilen kinetik çalışmalar farklı miktarlarda (0,1-10 mM) DHMC, APICP, PDI/Arg bileşikleri kullanarak tekrar edilmiş, her madde ve konsantrasyonu için Vmax ve Km değerleri hesaplanmıştır.

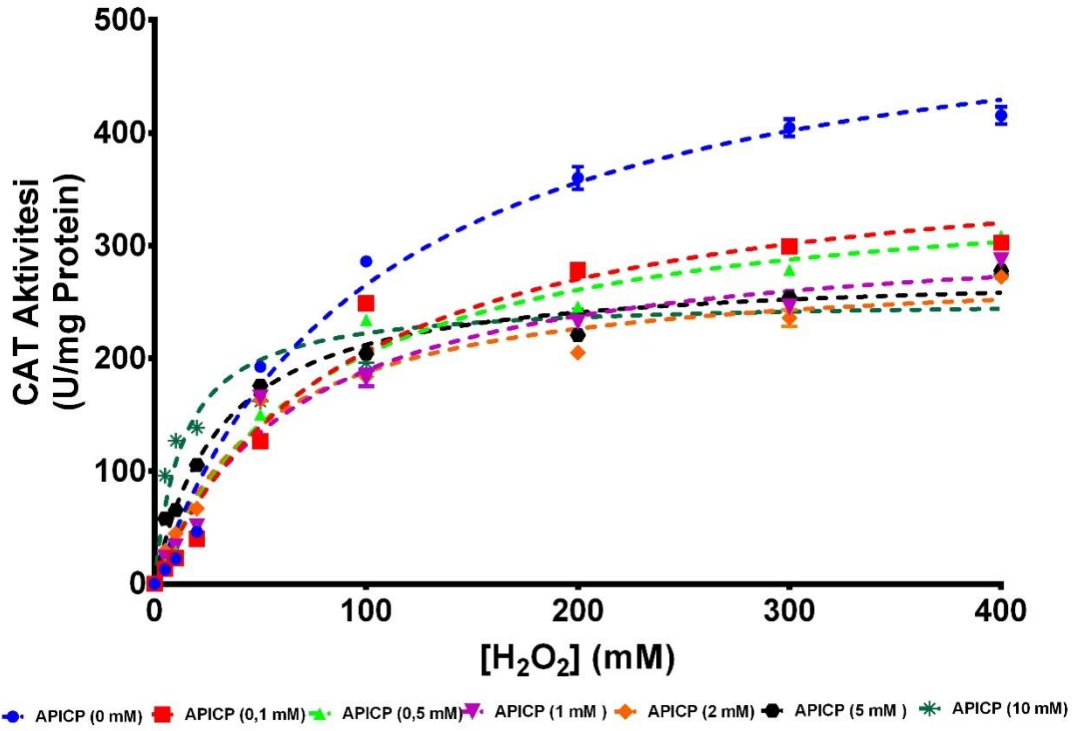
DHMC bileşiğinin CAT enzim aktivitesine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.3'te, bu grafiğin çift-ters dönüşümü yani Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre DHMC miktarının artışına bağlı olarak CAT enziminin Vmax ve Km değerleri kademeli olarak azalmıştır (izelge 4.3). Buna göre CAT aktivitesini %50 oranında azaltan DHMC miktarı IC₅₀: 0,12 mM olarak hesaplanmıştır. Vmax ve Km değerlerinin DHMC verilmesiyle genel olarak paralel olarak düşüşü ve aynı zamanda Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiklerinin davranışı, DHMC bileşiğinin CAT enzimini karışık inhibisyon (mixed-inhibition) mekanizmasıyla doz bağımlı bir Şekilde baskıladığını işaret etmektedir. Benzer bir Şekilde APCP ve PDI/Arg bileşikleri de Vmax ve Km değerlerini eşzamanlı olarak düşürmüştür. APICP için hesaplanan IC₅₀ değeri 5,27 mM iken, PDI/Arg bileşiği için IC₅₀ değeri 0,79 mM'dır. APICP ve PDI/Arg bileşikleri Michaelis-Menten (Şekil4.5 ve Şekil 4.7) ve Lineweaver-Burk grafiklerinin (Şekil 4.6 ve Şekil 4.8) davranışı, Km ve Vmax değerlerindeki değişimler bu bileşiklerin de CAT enzimini karışık inhibisyon mekanizmalarıyla baskıladığını göstermektedir. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiğinin CAT enzimini baskılama grafikleri Şekil 4.9'da özetlenmektedir.



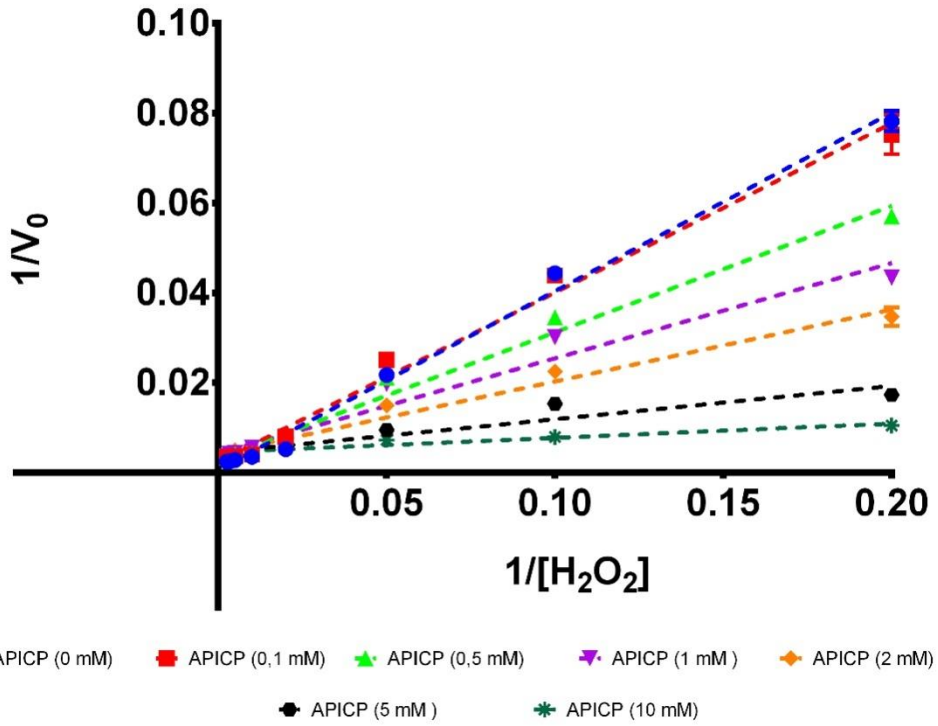
Şekil 4.3. DHMC bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



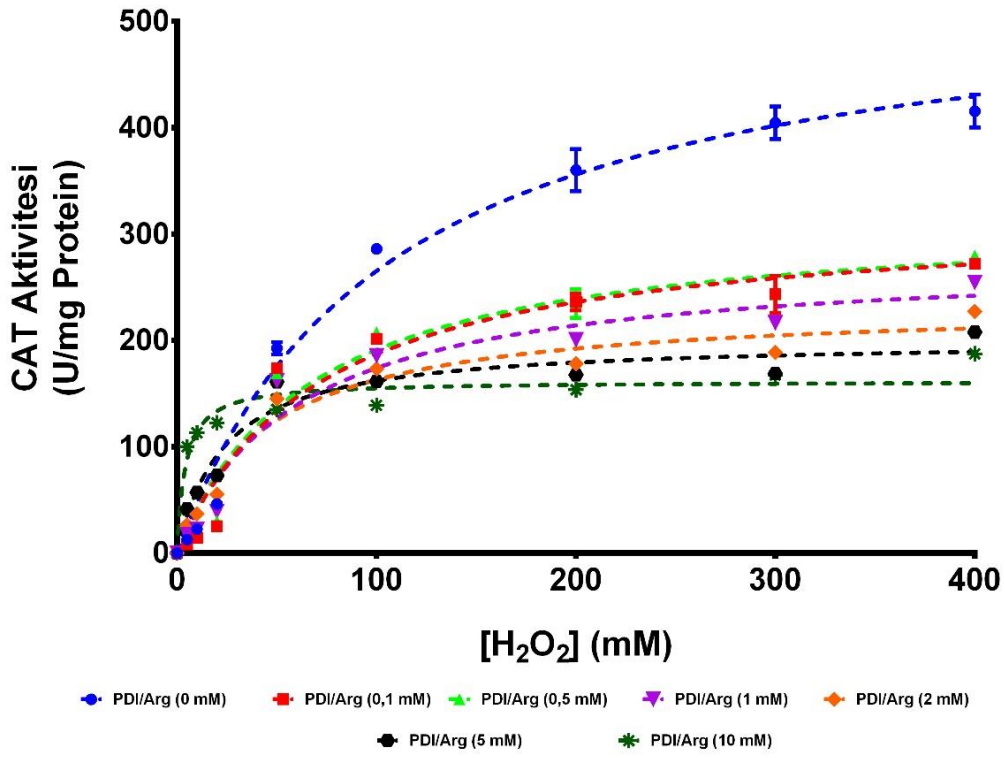
Şekil4.4. DHMC bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



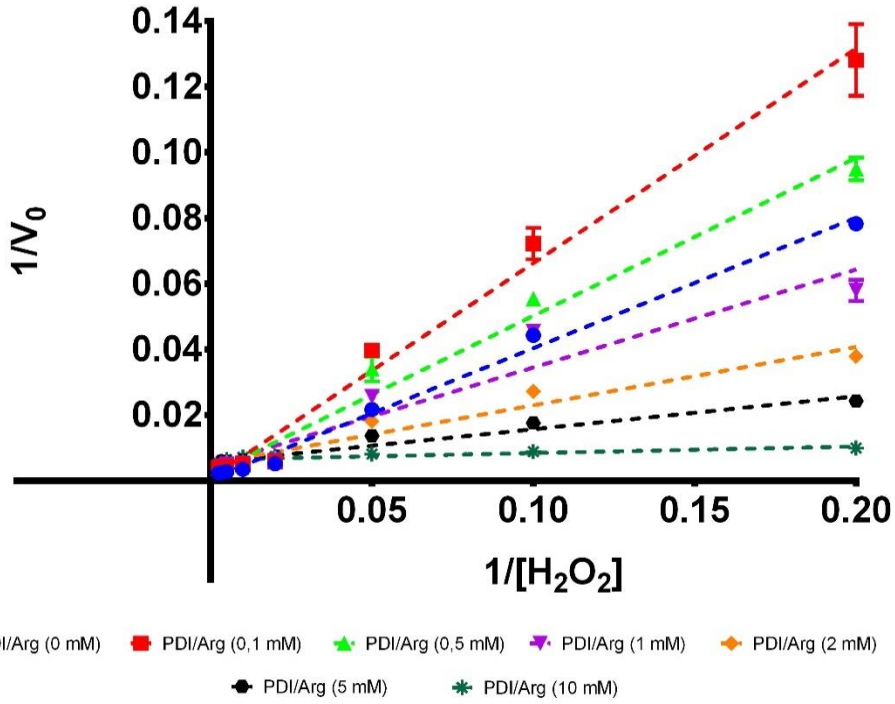
Şekil 4.5. APICP bileşiminin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.6. APICP bileşiminin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.7.PDI/Arg bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



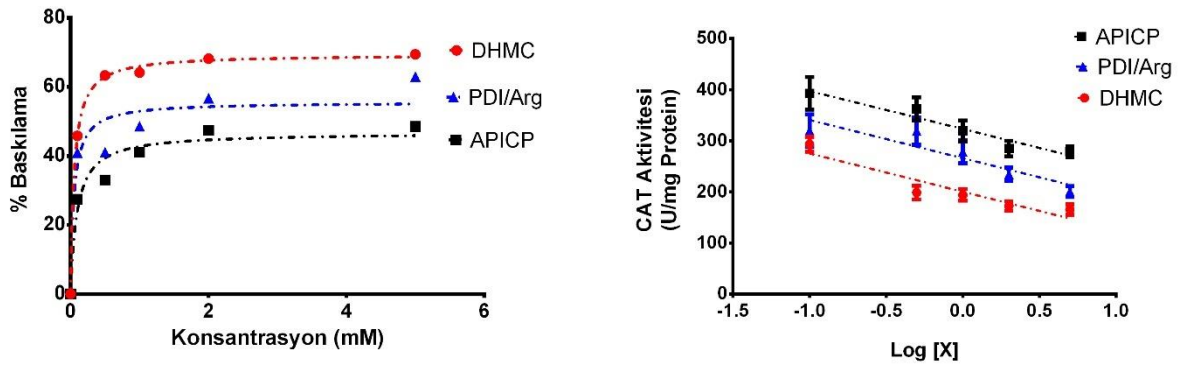
Şekil 4.8.PDI/Arg bileşiğinin CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren. Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.3. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer katalaz enziminin kinetik parametreleri (V_{max} , K_m , IC_{50}) üzerine etkileri. ND: Tayin edilemedi.

KATALAZ							
	DHMC (0 mM)	DHMC (0,1 mM)	DHMC (0,5 mM)	DHMC (1 mM)	DHMC (2 mM)	DHMC (5 mM)	DHMC (10 mM)
V_{max} (U/mg)	541,1 ± 19,96	239,1 ± 7,285	198,6 ± 6,66	193,9 ± 5,63	172,2 ± 4,73	165,4 ± 4,99	ND
K_m (mM)	104 ± 10,81	160,4 ± 11,68	97,65 ± 9,45	76,91 ± 7,01	36,35 ± 3,92	16,12 ± 2,28	ND
IC_{50} (mM)	0,12						

	APICP (0 mM)	APICP (0,1 mM)	APICP (0,5 mM)	APICP (1 mM)	APICP (2 mM)	APICP (5 mM)	APICP (10 mM)
V_{max} (U/mg)	541,1 ± 18,75	392,6 ± 16	362,3 ± 11,49	319,1 ± 10,26	284,5 ± 7,77	278,6 ± 5,31	252,2 ± 7,14
K_m (mM)	104 ± 10,15	90,58 ± 10,95	77,83 ± 7,721	68,57 ± 7,19	51,38 ± 5,01	31,35 ± 2,42	13,44 ± 1,85
IC_{50} (mM)	5,27						

	PDI/Arg (0 mM)	PDI/Arg (0,1 mM)	PDI/Arg (0,5 mM)	PDI/Arg (1 mM)	PDI/Arg (2 mM)	PDI/Arg (5 mM)	PDI/Arg (10 mM)
V_{max} (U/mg)	541,1 ± 18,75	319,6 ± 15,98	318,9 ± 13,65	278,1 ± 11,16	234,3 ± 6,59	200,4 ± 5,35	161,4 ± 3,47
K_m (H_2O_2)	104 ± 10,15	70,83 ± 11,43	66,77 ± 9,54	59,81 ± 8,18	43,75 ± 4,60	23,77 ± 2,74	4,183 ± 0,61
IC_{50} (mM)	0,79						



Şekil 4.9. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin katalaz enzimini baskılayıcı etkileri.

5.6.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer GST (CDNB) ve GST (GSH) enzim aktivitesi üzerine etkileri

Karbonat, Fe^{3+} , Hg^{2+} ve tiyol gruplarının floresan tayinlerinde kullanılan DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin hücre ana detoksifikasyon enzimleri içerisinde yer alan GST enzimi üzerine etkilerini incelemek üzere enzim kinetiği çalışmaları gerçekleştirilmiştir. GST enzimi, CAT enziminden farklı olarak iki sübstratlı (GSH ve xsenobiotikler (CDNB)) bir enzimdir. Bu nedenle GST enzimi için yapılan kinetik çalışmalar, her iki sübstrat için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İlk çalışmada sübstratlardan birisinin (GSH) konsantrasyonu sabit tutularak CDNB için sübstrat bağımlı enzimatik hızlar belirlenmiş ve GST enziminin CDNB için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. İkinci aşamada ise CDNB konsantrasyonu sabit tutularak farklı GSH miktarlarında enzimatik hızlar hesaplanmış ve GST enziminin GSH için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Buna göre CDNB değiştirilerek hesaplanan V_{max} değeri $503,70 \pm 18,88$ U/mg protein, K_m değeri ise $16,54 \pm 1,61$ mM olarak belirlenmiştir.

GST (CDNB) için kinetik çalışmalar reaksiyon ortamına farklı dozlarda (0,1-10 mM) DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşikleri uygulanarak tekrarlanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen farklı bileşik uygulamaları altında elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.10, 4.12 ve 4.14'te, bu grafiklerin çift-ters dönüşümü Lineweaver-Burk grafikleri ise Şekil 4.11, 4.13 ve 4.15'te verilmiştir. Bu grafikler ve denklemleri kullanılarak DHMC, APICP, PDI/Arg bileşiklerinin GST(CDNB) aktivitesi V_{max} ve K_m değerlerini nasıl değiştirdikleri incelenmiştir. Sonuçlara göre DHMC ve APICP bileşikleri GST(CDNB) için V_{max} değerlerini belirli bir doza kadar önemli ölçüde değiştirmezken, görünen K_m değerlerini normal değerlerin üzerine çıkarmıştır. Bu sonuçlar DHMC ve APICP bileşiklerinin CDNB için birer yarışmalı inhibitör olabileceklerini göstermektedir. V_{max} üzerinde belirgin bir değişime neden olmadan K_m değerlerindeki (Çizelge 4.4) artış, enzimatik aktivite için CDNB sübstratı ile olabilecek muhtemel bir yarışmayı işaret etmektedir. Bu sonuçlardan farklı olarak PDI/Arg bileşiği GST (CDNB) aktivitesi için V_{max} değerini önemli ölçüde baskılamakta, K_m değerini görece olarak nispeten değiştirmemiştir. Yarışmasız inhibitörler, enzim-sübstrat kompleksi ile reaksiyona girer ve enzim-ürün kompleksi oluşturmak için reaksiyon hızını yavaşlatırlar. Deney sonuçlarımız PDI-Arg

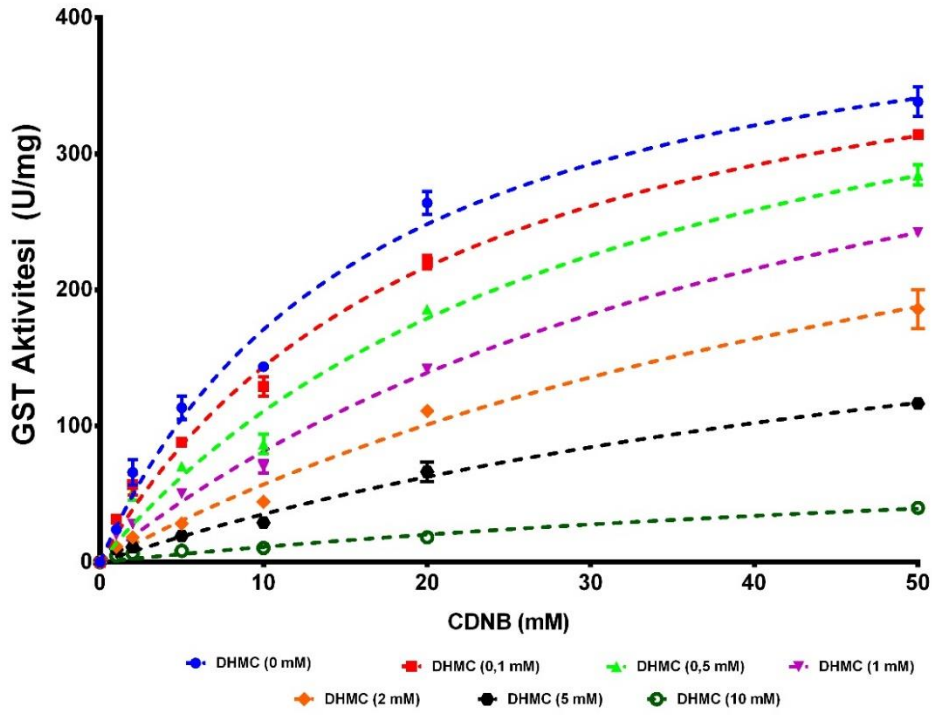
bileşiminin GST enzimini yarışmasız (non-competatif) olarak baskıladığını göstermektedir. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin GST (CDNB) enzimini baskılama grafikleri Şekil 4.16’da özetlenmektedir. Bu baskılama grafikleri kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değerleri ise DHMC için 3,74 mM, APICP için 146,55 mM ve PDI/Arg bileşiği için 49,09 mM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer toplam GST (CDNB) enzimi kinetik parametreleri (V_{max}, K_m, IC₅₀) üzerine etkileri.

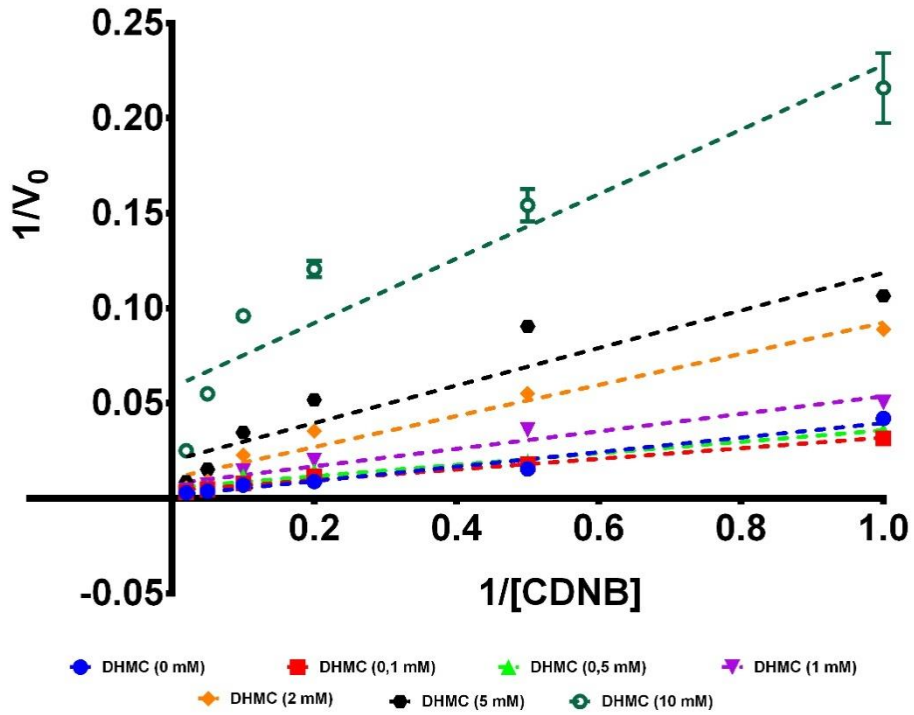
GST (CDNB)							
	DHMC (0 mM)	DHMC (0,1 mM)	DHMC (0,5 mM)	DHMC (1 mM)	DHMC (2 mM)	DHMC (5 mM)	DHMC (10 mM)
V_{max} (U/mg)	503,70 ± 18,88	444,40 ± 16,26	466,10 ± 35,30	477,6 ± 29,09	437,4 ± 51,28	277,4 ± 28,42	106,4 ± 21,36
K_m (CDNB)	16,54 ± 1,614	20,94 ± 1,68	32,04 ± 4,65	48,63 ± 4,99	66,54 ± 12,02	68,49 ± 10,75	85,06 ± 24,63
IC₅₀ (mM)	3,74						

	APICP (0 mM)	APICP (0,1 mM)	APICP (0,5 mM)	APICP (1 mM)	APICP (2 mM)	APICP (5 mM)	APICP (10 mM)
V_{max} (U/mg)	500,8 ± 31,39	531,9 ± 49,79	542,3 ± 50,69	405,9 ± 36,31	398,5 ± 37,31	391,7 ± 44	369,5 ± 27,91
K_m (CDNB)	19,11 ± 2,69	28,36 ± 5,28	35,79 ± 6,19	29,85 ± 5,23	35,38 ± 6,16	54,12 ± 9,94	68,6 ± 7,92
IC₅₀ (mM)	146,55						

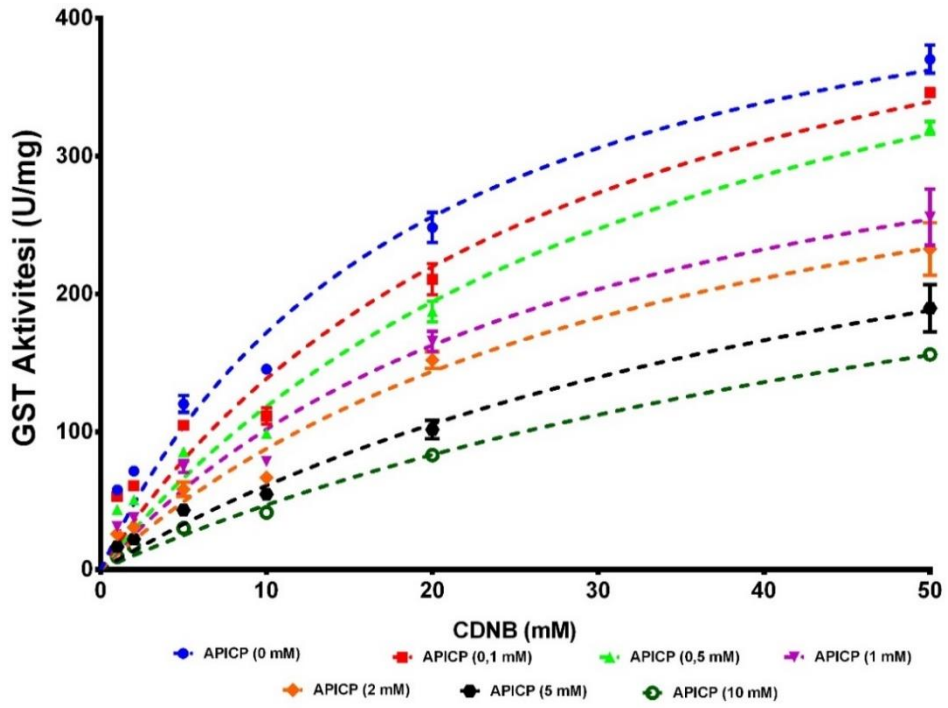
	PDI/Arg (0 mM)	PDI/Arg (0,1 mM)	PDI/Arg (0,5 mM)	PDI/Arg (1 mM)	PDI/Arg (2 mM)	PDI/Arg (5 mM)	PDI/Arg (10 mM)
V_{max} (U/mg)	503,1 ± 26,4	363,6 ± 14,06	360 ± 20,05	346,7 ± 13,95	327,3 ± 16,86	286,3 ± 15,72	277,9 ± 12,75
K_m (CDNB)	20,8 ± 2,39	12,35 ± 1,22	16,72 ± 2,18	12,49 ± 1,28	17,2 ± 2,05	15,81 ± 2,07	18,23 ± 1,91
IC₅₀ (mM)	49,09						



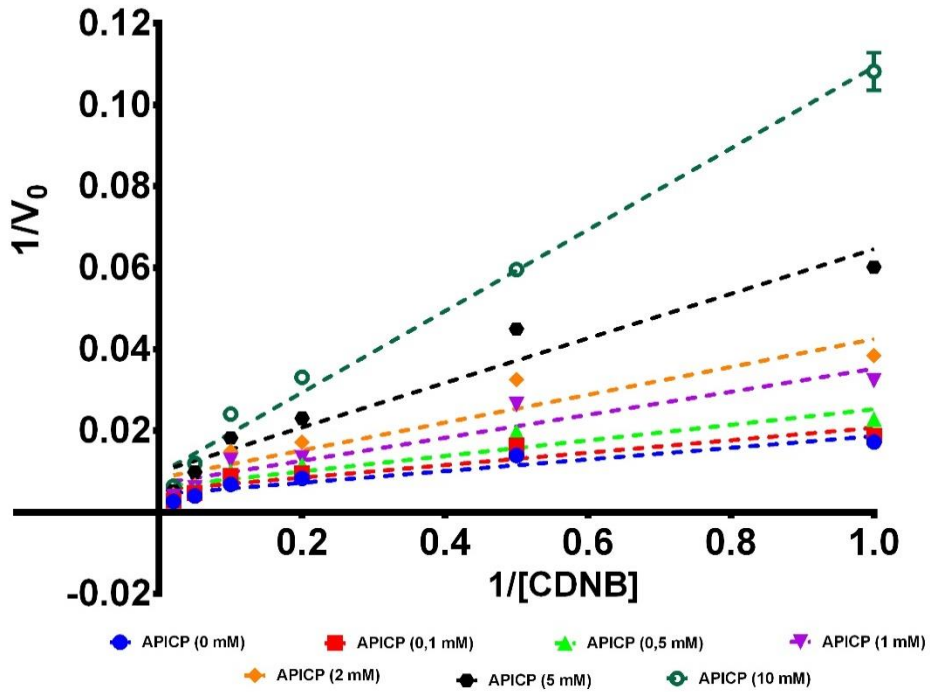
Şekil 4.10. DHMC bileşiminin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



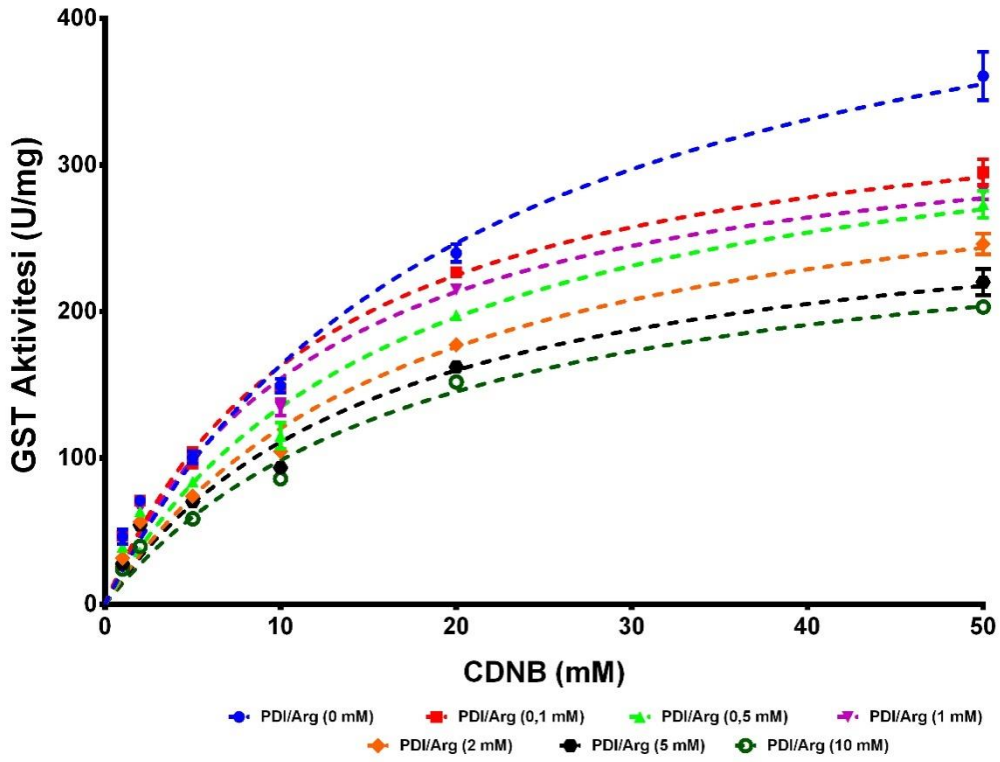
Şekil 4.11. DHMC bileşiminin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



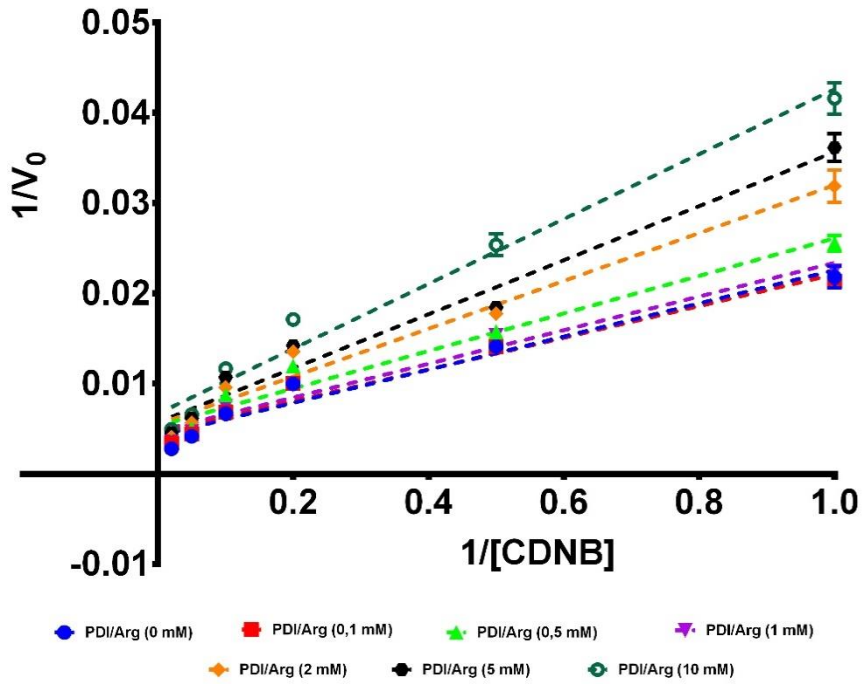
Şekil 4.12. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



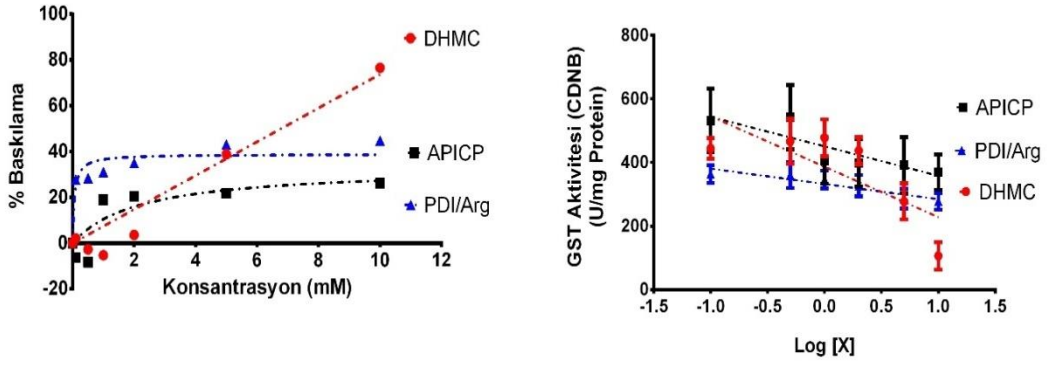
Şekil 4.13. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.14. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.15. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (CDNB) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.16. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin toplam GST (CDNB) enzimini baskılayıcı etkileri.

GST enziminin bir diğer ana süstratı ise GSH molekülüdür. Bütün GST izozimleri detoksifiye edilecek bileşiklere GSH grubunu tiyol gruplarından konjuge ederek onları daha suda çözünebilir hale getirmektedir. DHMC, APICP, PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer GSH bağımlı GST aktivitelerini nasıl etkilediğine dair çalışmalar CDNB konsantrasyonunun sabit tutulduğu ve GSH konsantrasyonunun değiştirildiği kinetik çalışmalarla incelenmiştir. Deney sonuçları GST (GSH) aktivitesinin V_{max} değerinin $346,5 \pm 10,88$ U/mg, GSH için K_m değerinin ise $8,38 \pm 1,03$ mM olduğunu göstermektedir.

GST (GSH) aktivitesi için inhibisyon çalışmaları reaksiyon ortamına farklı doz DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşikleri uygulanarak tekrarlanmıştır. Çalışmalar sonucunda farklı bileşik uygulamaları altında elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.17, 4.19 ve 4.21’de, bu grafiklerin çift-ters dönüşümü Lineweaver-Burk grafikleri ise Şekil 4.18, 4.20 ve 4.22’de verilmiştir. Bu grafikler ve denklemleri kullanılarak DHMC, APICP, PDI/Arg bileşiklerinin GST(CDNB) aktivitesi V_{max} ve K_m değerlerini nasıl değiştirdikleri incelenmiştir. Sonuçlara göre GSH bağımlı GST aktivitesinin uygulanan bileşiklerinin tümü tarafından baskılandığı görülmüştür (Çizelge 4.5). DHMC, APICP, PDI/Arg bileşikleri bütün konsantrasyonlarında GST(GSH) aktivitesi için V_{max} değerlerini azaltırken, görece GSH K_m değerini arttırmıştır. Bu tür baskılama, karışık tip (mixed-type inhibition) baskılama türünün genel özelliklerindedir. Yarışmasız inhibitörlerin etkilerine benzer olmasına karşın, karışık tip inhibitörler süstrat ile rekabet etmeden süstratın enzime karşı olan afinitesini düşürürler. V_{max} değerlerindeki azalış ve GSH için K_m değerindeki artış,

bu üç bileşimin de GST(GSH) aktivitesini karışık tip baskılama ile baskıladığını göstermektedir.

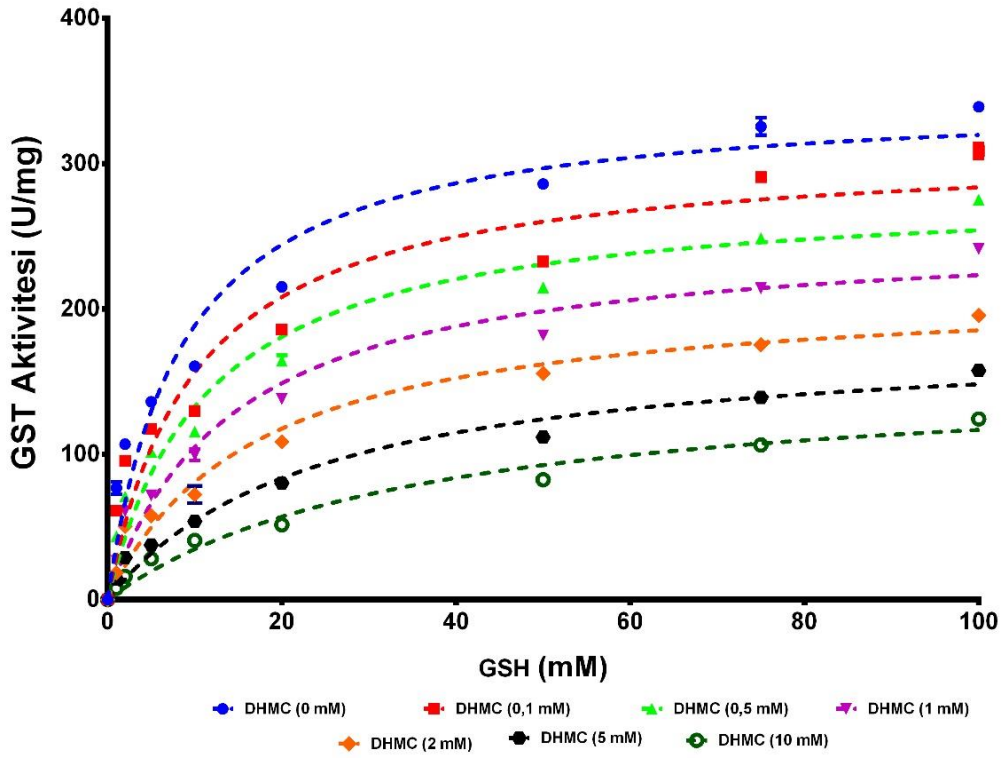
DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin GST (GSH) enzimini baskılama grafikleri Şekil 4.23'te özetlenmektedir. Bu baskılama grafikleri kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değerleri ise DHMC için 7,49 mM, APICP için 724,44 mM ve PDI/Arg bileşiği için 21877,62 mM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer toplam GST (GSH) enzimi kinetik parametreleri (V_{max}, K_m, IC₅₀) üzerine etkileri.

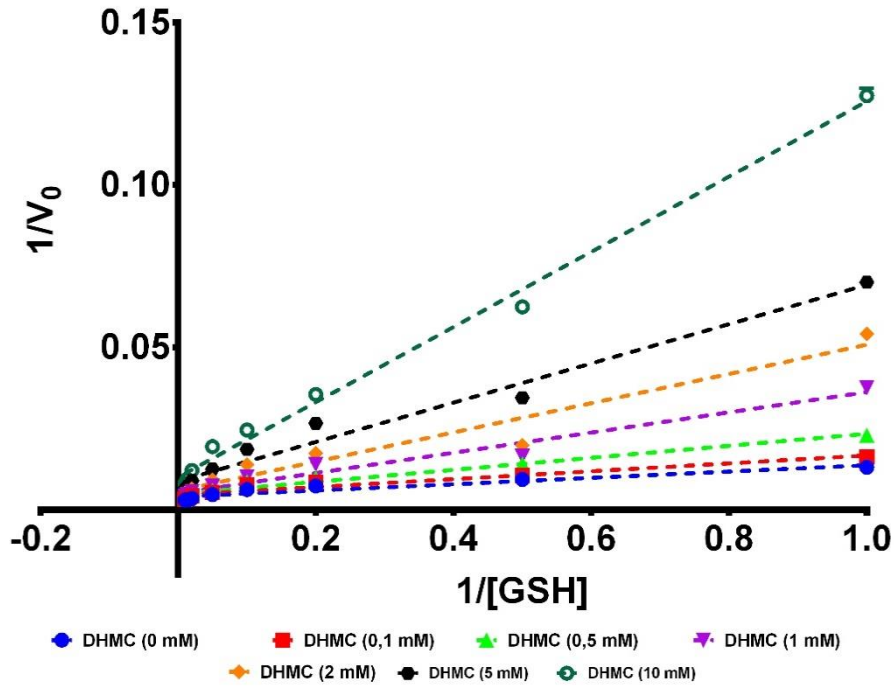
GST (GSH)							
	DHMC (0 mM)	DHMC (0,1 mM)	DHMC (0,5 mM)	DHMC (1 mM)	DHMC (2 mM)	DHMC (5 mM)	DHMC (10 mM)
V_{max} (U/mg)	346,5 ± 10,88	311,8 ± 12,11	282,7 ± 8,71	255 ± 7,96	216,3 ± 7,24	183,6 ± 6,53	158,2 ± 7,60
K_m (GSH)	8,382 ± 1,03	9,952 ± 1,45	11,27 ± 1,26	14,25 ± 1,52	16,75 ± 1,83	23,91 ± 2,48	35,45 ± 4,31
IC₅₀ (mM)	7,49 mM						

	APICP (0 mM)	APICP (0,1 mM)	APICP (0,5 mM)	APICP (1 mM)	APICP (2 mM)	APICP (5 mM)	APICP (10 mM)
V_{max} (U/mg)	346,2 ± 10,91	313,7 ± 9,55	301,3 ± 8,78	292,2 ± 8,88	278,4 ± 7,78	256,2 ± 4,90	231,9 ± 6,71
K_m (GSH)	7,763 ± 1,01	8,526 ± 1,01	9,705 ± 1,07	11,94 ± 1,30	14 ± 1,34	17,24 ± 1,06	28,25 ± 2,25
IC₅₀ (mM)	724,44 mM						

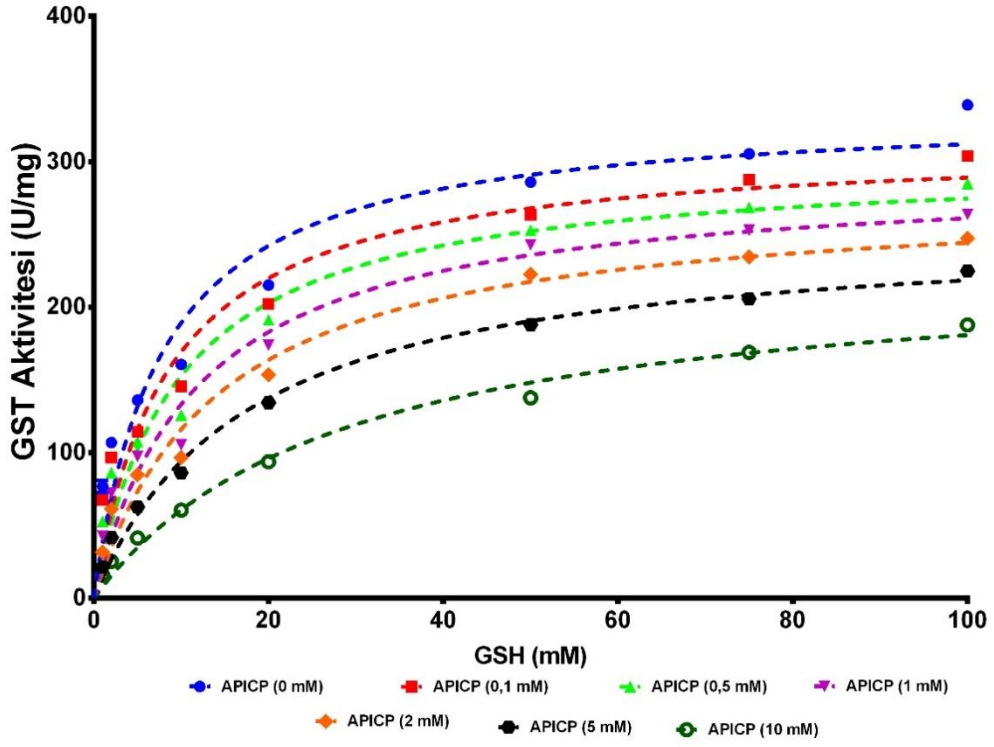
	PDI/Arg (0 mM)	PDI/Arg (0,1 mM)	PDI/Arg (0,5 mM)	PDI/Arg (1 mM)	PDI/Arg (2 mM)	PDI/Arg (5 mM)	PDI/Arg (10 mM)
V_{max} (U/mg)	348,80 ± 11,19	347,7 ± 13,05	325,1 ± 11,91	312,7 ± 10,78	302,1 ± 7,85	290,8 ± 6,64	285 ± 9,58
K_m (GSH)	7,74 ± 0,99	14,4 ± 1,84	15,48 ± 1,89	20,85 ± 2,19	21,1 ± 1,66	25,52 ± 1,66	38,47 ± 3,17
IC₅₀ (mM)	21877,62 mM						



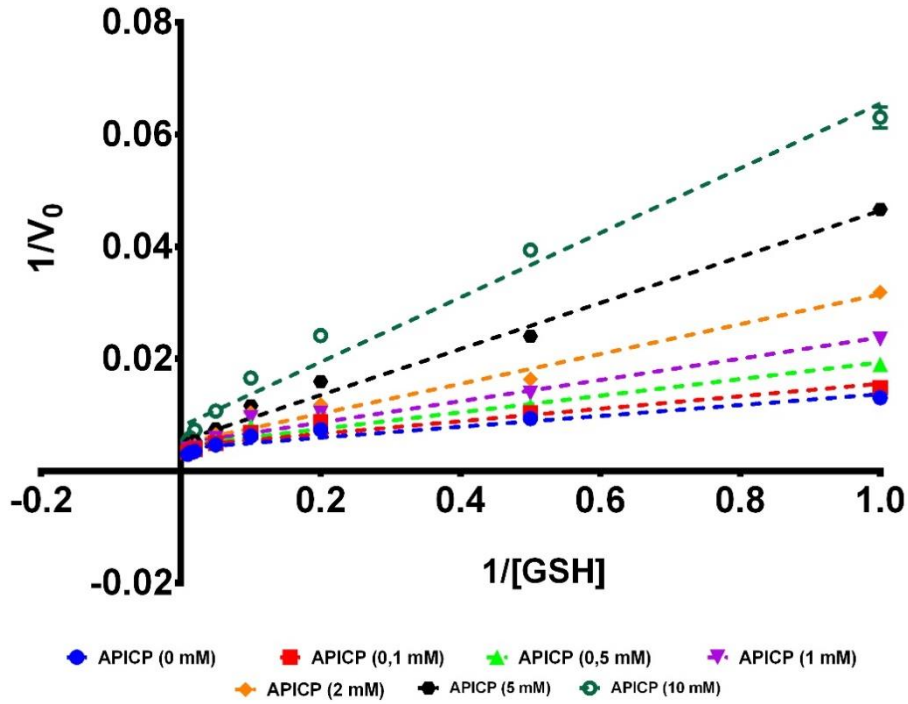
Şekil 4.17. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



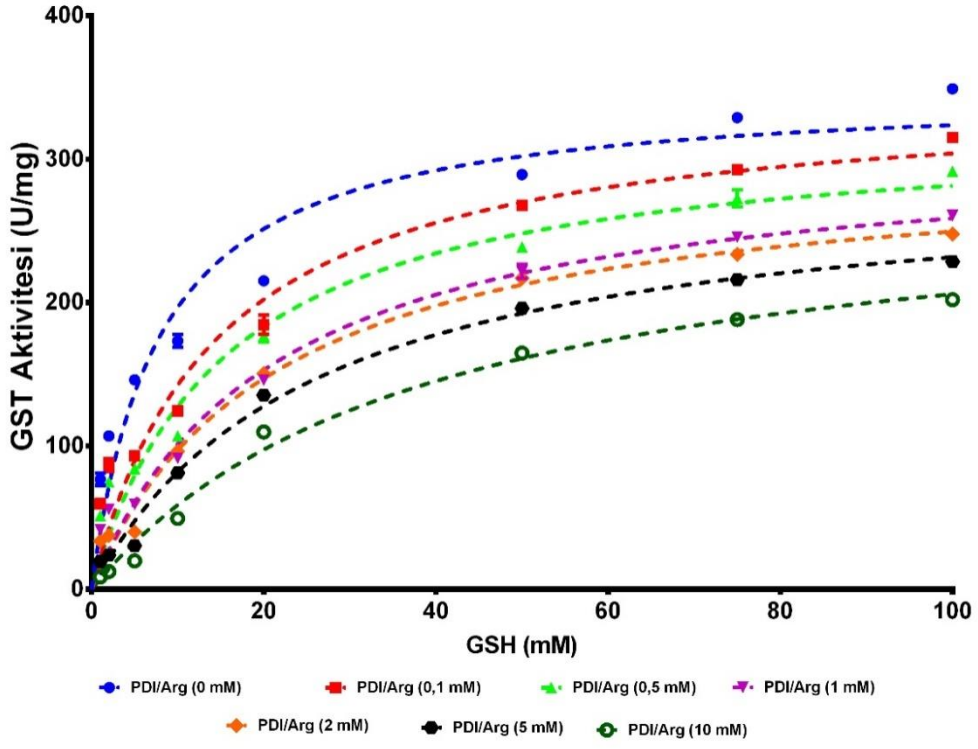
Şekil 4.18. DHMC bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



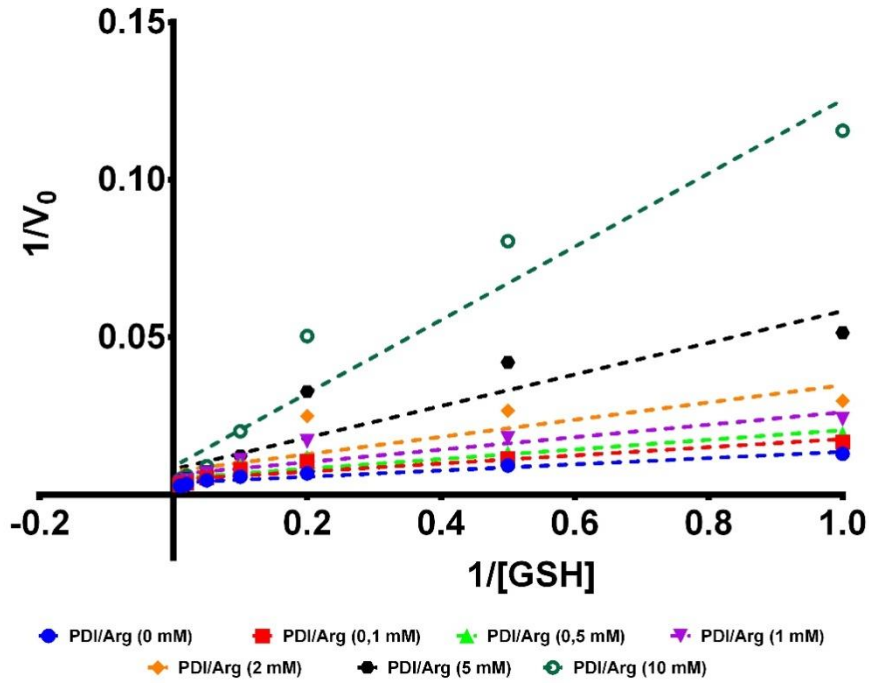
Şekil 4.19. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



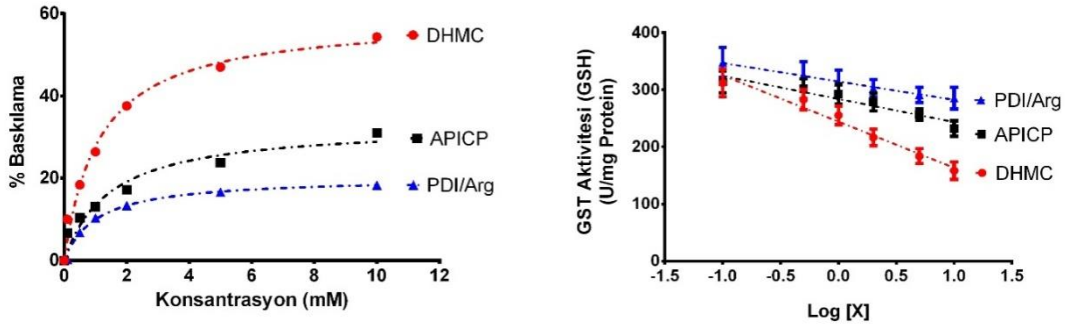
Şekil 4.20. APICP bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.21. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.22. PDI/Arg bileşiğinin toplam GST aktivitesi (GSH) üzerine etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.



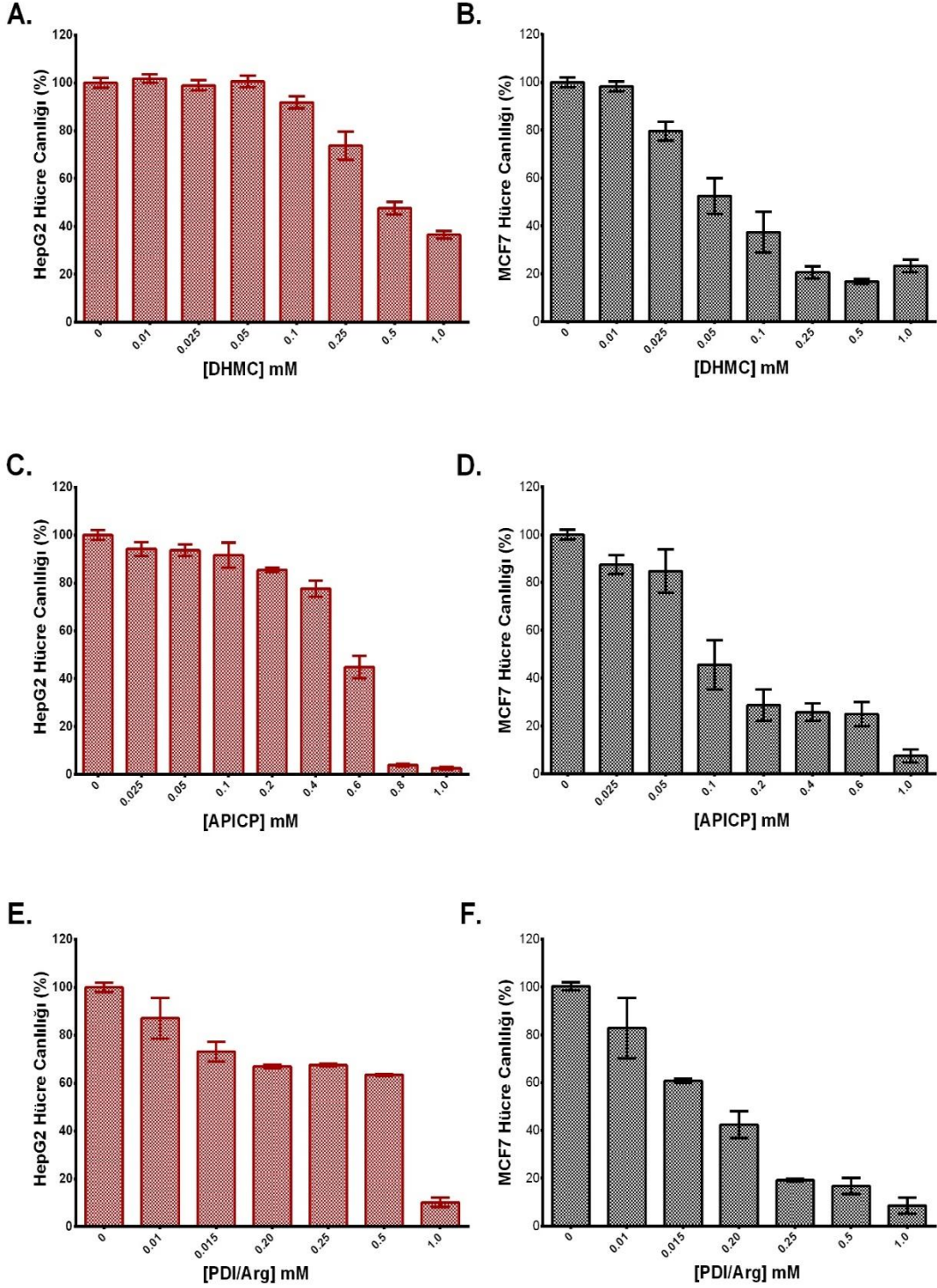
Şekil 4.23. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin GST(GSH) baskılayıcı etkileri

5.7.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Antioksidan, antibakteriyel ve antioksidan enzimleri baskılayıcı etkileri belirlenen DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer ve meme kanseri hücre hatları (sırasıyla HepG2 ve MCF-7) üzerine sitotoksik etkinliklerinin belirlenmesine yönelik *in vitro* sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite çalışmaları genel olarak incelendiğinde, kullanılan bileşiklerin hepsinin belirli bir dozdan sonra hücreler üzerine sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Ayrıca MCF-7 hücrelerinin kullanılan problemlere daha duyarlı olduğu ve çok daha küçük dozlarda ölmeye başladıklarını görülmüştür (Şekil 4.24). Bu bağlamda HepG2 hücrelerinin sitotoksik etkilere karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Kullanılan farklı dozlardaki bileşiklerin hücre canlılıklarını nasıl etkiledikleri Şekil 4.24’de açıkça gösterilmektedir. Farklı dozlarda floresan bileşiklerin *in vitro* sitotoksik etkilerini gösteren IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan IC_{50} değerleri ve değerlere ait %95 güven aralığı değerleri Çizelge4.6’da özetlenmiştir.

IC_{50} değerlerine göre MCF-7 hücrelerinin HepG2 hücrelerine oranla çok daha duyarlı oldukları değerlendirilmiştir. HepG2 hücre canlılığı sonuçlarına göre en yüksek sitotoksik etkinin PDI/Arg bileşiği tarafından gerçekleştiği (IC_{50} :0,3071 mM), DHMC ve APICP bileşiklerinin ise HepG2 hücreleri üzerine neredeyse benzer etkiler gösterdikleri belirlenmiştir. MCF-7 canlılık analizlerine göre ise yine en yüksek sitotoksik etki PDI/Arg tarafından sağlanmıştır (IC_{50} : 0,0160 mM). Bu hücreler

üzerine en düşük sitotoksik etki ise APICP bileşiği (IC_{50} :0,0883 mM) tarafından oluşturulmuştur.



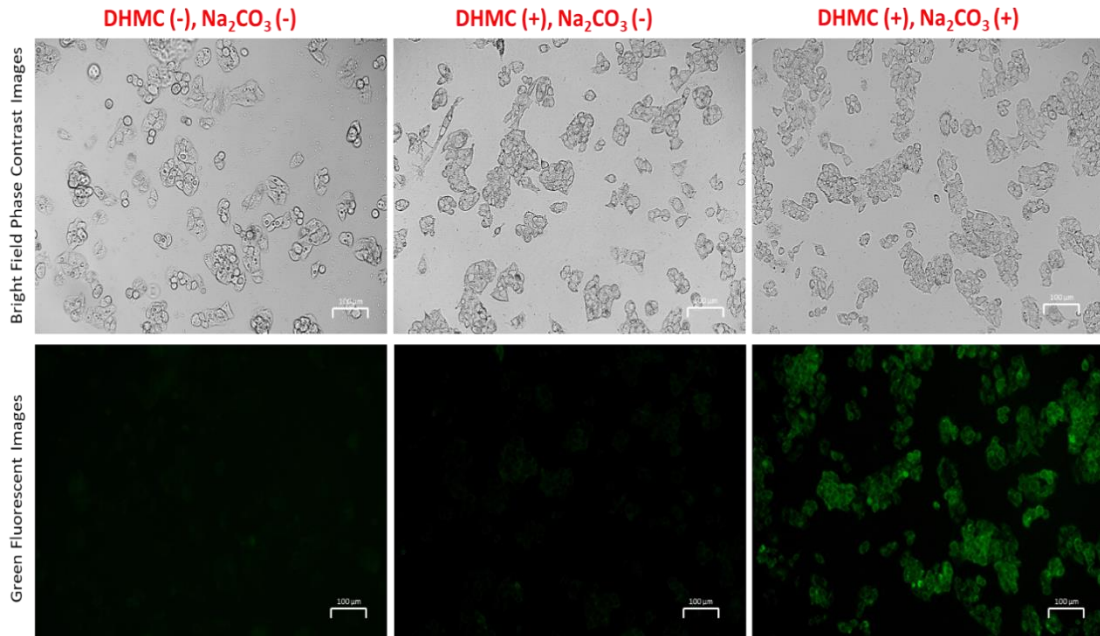
Şekil 4.24. DHMC maddesinin farklı konsantrasyonlarda 48 saat sonundaki HepG2 ve MCF-7 hücre canlılıkları üzerine etkileri.

Çizelge 4.6. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini gösteren IC₅₀ değerleri (mM). CI: Güven aralığı.

	HepG2		MCF-7	
	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (%95 CI) (mM)	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (%95 CI) (mM)
DHMC	0,5532	(0,4959-0,6170)	0,0399	(0,0304-0,0522)
APICP	0,5410	(0,5051-0,5795)	0,0883	(0,0691-0,1128)
PDI/Arg	0,3071	(0,0854-1,1050)	0,0160	(0,0107-0,0238)

5.8.DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin floresan hücre (HepG2) görüntüleme çalışmaları

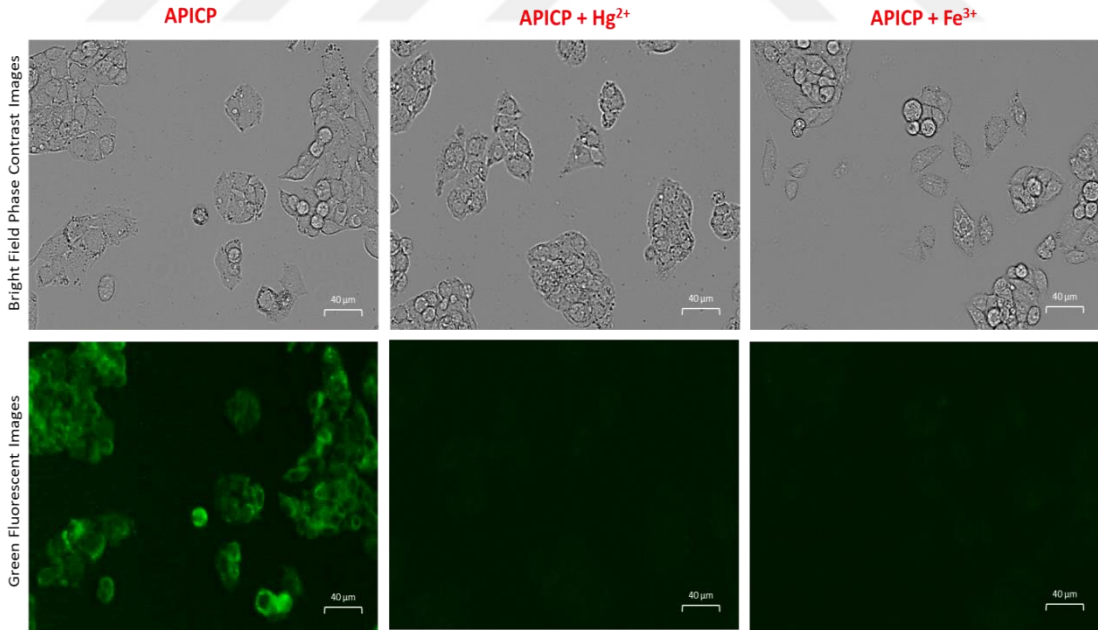
Yeni sentezlenen DHMC bileşiğinin canlı hücelere girerek hücre içi görüntüleme uygulamaları için kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirme amacıyla floresan görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, HepG2 hücreleri DHMC ve karbonat iyonlarıyla inkübe edilmiştir. Şekil 4.25'de gösterildiği gibi, DHMC tek başına hücrelerde hücre içi floresansı değiştirmemiş ve neredeyse hiç floresans göstermemiştir.



Şekil 4.25. DHMC ve sodyum karbonat ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve floresan görüntüleri, Görüntüler floresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Rad, $\lambda_{ex} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 517/23$ nm) kullanılarak alınmıştır. Uzunluk çizgisi 100 μ m belirtmektedir.

Öte yandan, DHMC inkübasyonundan sonra hücreler eşit miktarda karbonat iyonu ile muamele edildiğinde, hücre içi yeşil floresansta çarpıcı bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar DHMC' nin hücre zarına nüfuz edebileceğini ve spesifik olarak DHMC' nin canlı sistemlerde karbonat algılamasında kullanılabileceğini göstermektedir.

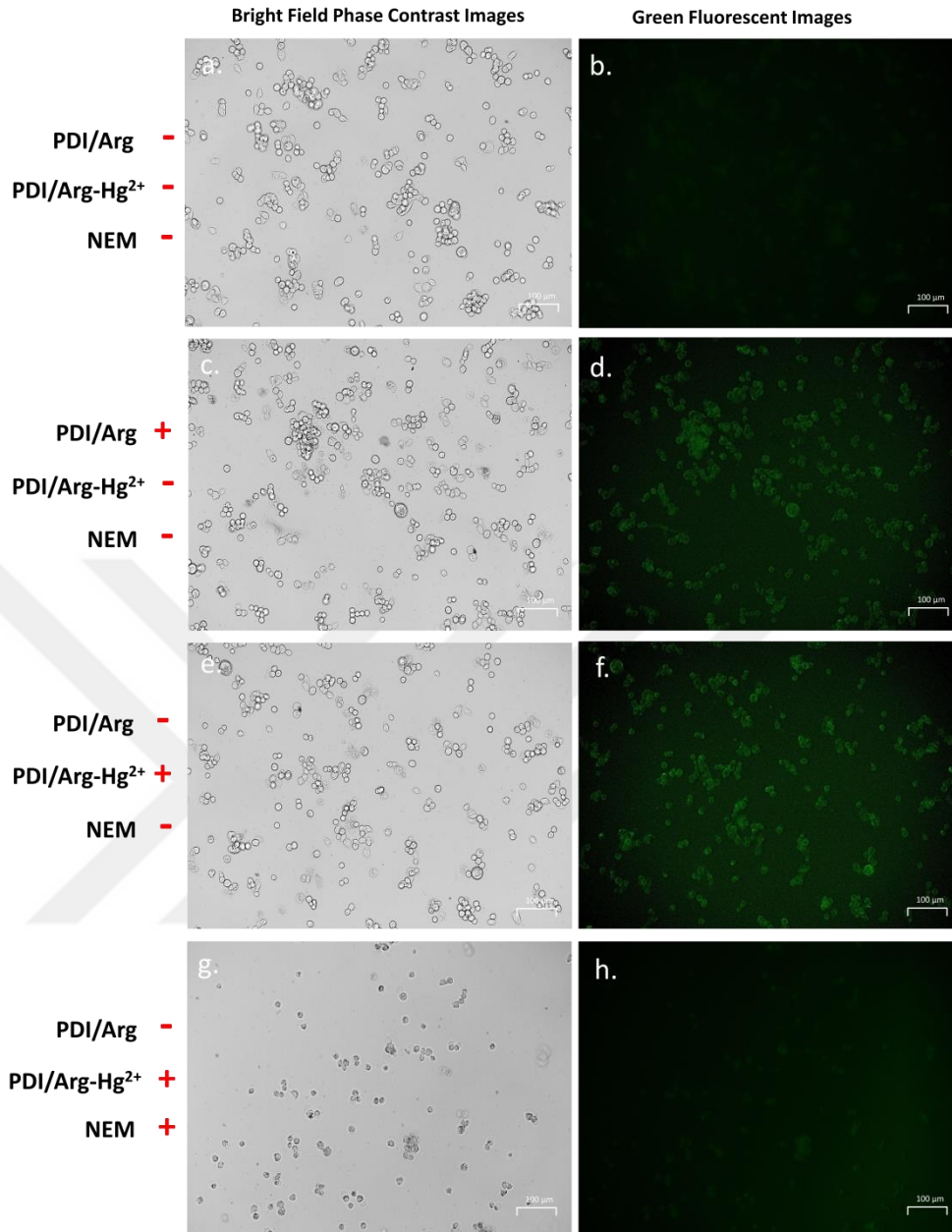
APICP bileşiğinin hücre içi Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarını algılama için pratik uygulanabilirliğini değerlendirmek için HepG2 hücreleri kullanılarak floresan görüntüleme deneyleri yapılmıştır (Şekil 4.26). Bunun için HepG2 hücreleri 400 μM APICP ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Şekil 4.26'de gösterildiği gibi, APICP tek başına HepG2 hücrelerinde hücre içi floresanı arttırmıştır. Öte yandan, HepG2 hücreleri APICP'den sonra Hg^{2+} iyonları ile muamele edildiğinde hücre içi yeşil floresansta çarpıcı bir azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde, APICP'in oluşturduğu hücre içi yeşil floresans Fe^{3+} iyonlarıyla da söndürülmüştür. Bu sonuçlar, bu iki metal iyonunun hücrelere dağıldığını ve floresansını gidermek için APICP ile bağlandığını göstermektedir. Dahası, APICP'nin sönmülmesinde Hg^{2+} iyonunun daha etkili olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.26. APICP ve Hg^{2+}/Fe^{3+} ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve floresan görüntüleri, Görüntüler floresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Rad, $\lambda_{exc} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 517/23$ nm) kullanılarak alınmıştır. Uzunluk çizgisi 40 μm belirtmektedir

Tiyol gruplarının hücre içi görüntülemesi için tasarlanan işlevselleştirilmiş probun (PDI/Arg) pratik uygulanabilirliğini daha iyi değerlendirmek için HepG2 hücreleri kullanılarak floresan görüntüleme deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.27). Buna göre, HepG2 hücreleri PDI/Arg ve PDI/Arg-Hg²⁺ ile bir saat boyunca inkübe edilerek floresan görüntüler alınmıştır. Şekil 4.27'de gösterildiği gibi, PDI/Arg tek başına HepG2 hücrelerinde hücre içi floresanı arttırmıştır. Bu durum PDI/Arg bileşiğinin hücre zarından geçebildiğini ve hücre içi görüntülemeye etkili olabileceğini göstermektedir. Floresan ışması Hg²⁺ ile söndürülmüş PDI/Arg-Hg²⁺ kompleksi hücrelere verildiğinde ise yine hücre içi yeşil floresanı görülmüştür (Şekil 4.27f). Bu sonuç, PDI/Arg molekülü üzerindeki Hg²⁺ iyonlarının hücre içi tiyol gruplarıyla yer değiştirdiğini ve böylelikle floresan ışmanın oluştuğu düşüncesini oluşturmuştur.

Bu hipotezi doğrulamak için HepG2 hücrelerinin hücre içi tiyol gruplarını bloke etmek için NEM molekülü ile ön işleme tabi tutulduğu ve daha sonra PDI/ Arg-Hg²⁺ kompleksi ile muamele edildiği negatif kontrol deneyi ile test edilmiştir. Bu deney sonucunda NEM ön işlemine tutulmuş PDI/ Arg-Hg²⁺ uygulanan hücrelerde floresan ışıma görülmemiştir (Şekil 4.27h). Bu durum, hücre içi serbest tiyol gruplarının Hg²⁺ ile yarışarak floresan aç-kapa probu olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.27. Farklı bileşik uygulamaları altında HepG2 hücrelerinin parlak alan faz kontrast ve yeşil floresan görüntüleri. Tek başına HepG2 hücrelerinin parlak alan (a) ve floresan (b) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 μ M PDI/Arg ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (c) ve floresan (d) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 μ M PDI/Arg-Hg²⁺ ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (e) ve floresan (f) görüntüleri; 60 dakika boyunca 100 μ M NEM ile önceden inkübe edilmiş ve daha sonra 60 dakika boyunca 100 μ M PDI/Arg-Hg²⁺ ile inkübe edilmiş hücrelerin parlak alan (g) ve floresan (h) görüntüleri. Görüntüler floresan hücre görüntüleme sistemi (ZOE, Bio-Rad, $\lambda_{ex} = 480$ nm, $\lambda_{em} = 517/23$ nm) kullanılarak alınmıştır. Uzunluk çizgisi 100 μ m belirtmektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte; biyomedikal uygulamalar, gıda güvenliği, tıp, çevre kirliliği, eczacılık, askeri uygulamalar gibi birçok farklı alanda kullanımı artan biyosensörler hızla gelişmeye ve ilerlemeye başlamıştır (Behravan ve ark., 2019). Biyosensörler, hassas, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz analizlerin yapılmasını oldukça kolay hale getirmesi nedeniyle günümüzde yeni biyosensörlerin tasarımı ve geliştirilmesi de oldukça önem kazanmaktadır (Gupta ve ark., 2019; Wang ve ark., 2013). Bu bağlamda bu çalışmada, laboratuvarımızda biyosensör olarak yeni sentezlenen kumarin türevi olan DHMC ve APICP bileşikler ile perilen türevi PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik etkilerinin araştırması yapılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin canlı hücre sistemlerinde çeşitli iyonların ve fonksiyonel grupların tanımlanmasında kullanılabilme potansiyelleri floresan hücre görüntüleme çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır.

Çalışılan bileşiklerin antioksidan özellikleri incelendiğinde en yüksek kapasitenin DHMC bileşiğinde olduğu DPPH radikal süpürücü etkiler ve toplam antioksidan kapasite sonuçlarından anlaşılmaktadır. DHMC bileşiği düşük IC₅₀ değeri ile standart antioksidan olarak kullanılan gallik asite yakın radikal yakalama aktivitesi göstermiştir. APICP bileşiğinin Trolox eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesi DHMC bileşiği ile benzerlik göstermektedir. Bu durumun nedeni DHMC ve APICP bileşiklerinin her ikisinin de kumarin türevi bileşikler olması olarak açıklanabilir. İndirgeme gücü etkinlerine göre kıyaslandığında incelenen üç bileşikten PDI/Arg molekülünün yüksek ölçüde indirgeme potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmiştir.

İncelenen bileşiklerin çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkilerinin incelendiği çalışma sonuçlarımız, DHMC bileşiğinin test edilen mikroorganizmaların çoğu üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. APICP bileşiği *S. aureus*, *B. subtilis* ve *Salmonella* gibi mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etkilere sahip olmasına karşın bu etki DHMC molekülünün etkilerinden oldukça düşük bulunmuştur. PDI/Arg bileşiğinin ise kullanılan dozlarda test edilen tüm bakterilerin üstüne hiçbir antimikrobiyal etkisi görülmemiştir.

Karbonat, Fe^{3+} , Hg^{2+} ve tiyol gruplarının floresan tayinlerinde kullanılacak DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin hücre ana antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri içerisinde yer alan CAT ve GST enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemek üzere enzim kinetiği çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar her üç bileşiğin de incelenen enzimler üzerine baskılayıcı etkileri olduğunu göstermektedir. DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin CAT enzimini karışık inhibisyon (mixed-inhibition) mekanizmasıyla doz bağımlı bir şekilde baskıladığı bulunmuştur. Enzim kinetiği çalışmaları DHMC ve APICP bileşiklerinin GST enzim aktivitesinde CDNB için birer yarışmalı inhibitör olabileceklerini göstermektedir. Bu sonuçlardan farklı olarak PDI/Arg bileşiği GST (CDNB) enzimini yarışmasız (non-competatif) olarak baskılamaktadır. DHMC, APICP, PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer GSH bağımlı GST aktivitelerini nasıl etkilediğine dair yapılan çalışmalarda, enzimatik aktivitenin uygulanan bileşiklerinin tümü tarafından baskılandığı görülmüştür. DHMC, APICP, PDI/Arg bileşikleri, bütün konsantrasyonlarında GST(GSH) aktivitesi için V_{max} değerini azaltırken, görece GSH K_m değerini arttırmıştır. Bu tür baskılama, karışık tip yarışmasız (mixed-type uncompetitive inhibition) baskılama türünün genel özelliklerindedir. Yarışmasız inhibitörlerin etkilerine benzer olmasına karşın, karışık tip inhibitörler süstrat ile rekabet etmeden süstratın enzime karşı olan afinitesini düşürürler. V_{max} değerlerindeki azalış ve GSH için K_m değerindeki artış, bu üç bileşiğin de GST(GSH) aktivitesini karışık tip uncompetitive baskılama ile baskıladığını göstermektedir.

Antioksidan, antibakteriyel ve antioksidan enzimleri baskılayıcı etkileri belirlenen DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin karaciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik etkinliklerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar, MCF-7 hücrelerinin kullanılan bileşiklere daha duyarlı olduğunu ve çok daha düşük konsantrasyonda hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermektedir. Bu bağlamda HepG2 hücrelerinin sitotoksik etkilere karşı daha dirençli olduğu söylenebilir. Sitotoksik etkinliği en yüksek olan PDI/Arg bileşiği HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerine oldukça yüksek etki göstermiştir. APICP bileşiğinin ise incelenen diğer maddelere göre benzer veya daha az sitotoksik etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Yeni sentezlenen DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin canlı hücrelere girerek hücre içi görüntüleme uygulamaları için kullanılıp kullanılmayacağını analiz etmek için floresan görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, HepG2 hücreleri DHMC ve karbonat iyonlarıyla inkübe edilmiş ve elde edilen sonuçlar DHMC'nin hücre zarına nüfuz edebileceğini ve spesifik olarak DHMC'nin canlı sistemlerde karbonat algılamasında kullanılabileceğini göstermiştir. APICP bileşiğinin hücre içi Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarını algılama için pratik uygulanabilirliğini değerlendirmek için HepG2 hücreleri APICP, Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarıyla muamele edilmiştir. APICP tarafından sağlanan hücre içi floresans, Hg^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarıyla azalmıştır. Bu sonuçlar, bu iki metal iyonunun hücrelere dağıldığını ve floresansını gidermek için APICP bileşiğine bağlandığını göstermektedir. Tiyol gruplarının tayini için kullanılabilecek PDI/Arg bileşiği ise tek başına HepG2 hücrelerinde hücre içi floresanı arttırmıştır. Bu durum PDI/Arg bileşiğinin hücre zarından geçebildiğini ve hücre içi görüntülemede etkili olabileceğini göstermektedir. Floresan ışması Hg^{2+} ile söndürülmüş PDI/Arg- Hg^{2+} kompleksi hücrelere verildiğinde ise yine hücre içi yeşil floresanı görülmüştür. Bu sonuç, PDI/Arg molekülü üzerindeki Hg^{2+} iyonlarının hücre içi tiyol gruplarıyla yer değiştirdiğini ve böylelikle floresan ışmanın oluştuğunu göstermiştir. Bu durum PDI/Arg'ın hücre içi tiyol gruplarının tanımlanması ve belirlenmesi çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, DHMC, APICP ve PDI/Arg bileşiklerinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin araştırıldığı bu çalışmada, bileşiklerin çeşitli oranlarda antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik özellikler taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin insan vücudunda çeşitli metabolik faaliyetler sonucu meydana gelen oksidatif stresi azaltabilecekleri, zararlı mikroorganizmaları inhibe edebilecekleri, kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterebilecekleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu bileşiklerin hücre içerisindeki çeşitli iyonların ve fonksiyonel grupların *in vivo* tayininde kullanılabilme potansiyelleri de bu çalışma kapsamında ortaya çıkarılmıştır. Bütün bu özelliklerinden ötürü incelenen bileşiklerin biyoloji, farmakoloji ve tıp alanlarında farklı kullanım alanları olabileceğini değerlendirmekteyiz. Ancak, sağlık açısından önemli potansiyele sahip olabilecek bu bileşiklerin antioksidan enzimler üzerindeki baskılayıcı etkileri göz önüne alındığında ileri çalışmaların yapılması ve kullanım alanlarının daha kapsamlı araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Abe, K., Matsuki, N., 2000. Measurement of cellular reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, 38(4), 325–329.
- Akar, Z., Küçük, M., Doğan, H., 2017. A new colorimetric DPPH • scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 640–647.
- Al-shamsi, H.O., Jones, J., Fahmawi, Y., Dahbour, I., Tabash, A., Abousamra, A.O.S., Shaw, K.R., Xiao, L., Hassan, M.M., Kipp, B.R., Kopetz, S., Soliman, A.S., McWilliams, R.R., Wolff, R.A., 2016. Molecular spectrum of KRAS , NRAS , BRAF , PIK3CA , TP53 , and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer : determination of frequency and distribution pattern. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(6), 882–902.
- Aleshinloye, A.O., Bodapati, J.B., Icil, H., 2015. Synthesis, characterization, optical and electrochemical properties of a new chiral multichromophoric system based on perylene and naphthalene diimides. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 300, 27–37.
- Alzoubi, K.H., Hasan, Z.A., Khabour, O.F., Mayyas, A., Yacoub, O.N. Al, Banihani, S.A., Alrabadi, N.S., 2019. Department of Physiology , College of Medicine and Medical Sciences , Arabian Gulf. *Physiology & Behavior*, 206, 220–205.
- Ansar, M., Khan, A., Akhtar, J., Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., Rengel, Z., 2019. Plant Physiology and Biochemistry Acquiring control : The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141(April), 353–369.
- Apostolova, N., Victor, V.M., 2015. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria : Therapeutic Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10;22(8), 686–729.
- Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Supaphon, O., Sakayaroj, J., 2015. Meroterpenoid, isocoumarin and phenol derivatives from the seagrass-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-ES194. *Tetrahedron*,.
- Atere, T.G., Akinloye, O.A., Ugbaja, R.N., Ojo, D.A., Dealtry, G., 2018. Food Science and Human Wellness In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costus afer* leaf. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 266–272.
- Bajpai, V.K., Baek, K., Kang, S.C., 2017. South African Journal of Botany Antioxidant and free radical scavenging activities of taxoquinone , a diterpenoid isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *South African Journal of Botany*, 111(July), 93–98.
- Baykara, O., 2016. Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balikesir Health Sciences*

- Journal*, 3(5), 154–165.
- Behravan, M., Hossein, A., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R., Mirzapour, A., 2019. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124(March), 148–154.
- Belete, T.M., 2019. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Human Microbiome Journal*, 11(January), 100052.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Biswas, S., Gangopadhyay, M., Barman, S., Sarkar, J., Singh, N.D.P., 2016. Simple and efficient coumarin-based colorimetric and fluorescent chemosensor for F⁻ detection : An ON 1 – OFF – ON 2 fluorescent assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 823–828.
- Caddeo, C., Manca, M.L., Peris, J.E., Usach, I., Matos, M., Fernández-busquets, X., Fadda, A.M., Manconi, M., Caddeo, C., Manca, M.L., Manca, M.L., 2018. Tocopherol-Loaded Transfersomes: In Vitro Antioxidant Activity and Efficacy in Skin Regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 551(1–2), 34–41.
- Chem, T.J., 2011. Amphiphilic and chiral unsymmetrical perylene dye for solid-state dye-sensitized solar cells. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(6), 847–859.
- Chen, L.D., Mandal, D., Pozzi, G., Gladysz, J.A., Philippe, B., 2011. Potentiometric sensors based on fluorinated membranes doped with highly selective ionophores for carbonate. *Journal of the American Chemical Society*, 133(51), 20869–20877.
- Conway, D., Henderson, M.A., 2019. Iron metabolism. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(3), 175–177.
- Cukurovali, A., Kirbag, S., 2006. Spectroscopic characterization and biological activity of salicylaldehyde thiazolyl hydrazone ligands and their metal complexes. *Transition Metal Chemistry*, 31(2), 207–213.
- Diana, R., Caruso, U., Concilio, S., Piotta, S., Tuzi, A., Panunzi, B., 2018. Data on a real-time tripod colorimetric / fluorescence sensor for multiple target metal ions. *Data in Brief*, 19, 2119–2125.
- Dubey, R.K., Efimov, A., Lemmetyinen, H., Box, P.O., July, R., Manuscript, R., August, R., 2011. 1,7- and 1,6-Regioisomers of Diphenoxy and Dipyrroliidiny Substituted Perylene Diimides : Synthesis , Separation , Characterization , and Comparison of Electrochemical and Optical Properties †. *American Chemical Society*, 23(3), 778–788.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation , more stable ABTS radical cation. *Clinical*

- Biochemistry*, 37(4), 277–285.
- Ezemonye, L., Tongo, I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81(2), 214–217.
- Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D., Sun, Y., 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1–2), 8–26.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, P.D., 2008. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : *International Journal of Cancer*, 15;127(212), 2893–2917.
- Fraga, D.B., Olescowicz, G., Moretti, M., Siteneski, A., Mauren, K., Azevedo, D., Colla, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2018. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. *Journal of Psychiatric Research*, 100, 16–23.
- Goswami, S. V, Hangirgekar, S.P., 2010. L-Proline : An Efficient Catalyst for the Synthesis of Coumarins Via Pechmann Reaction. *International journal of chemical science*, 8(1), 553–558.
- Gu, J.J., Rouse, C., Xu, X., Wang, J., Onaitis, M.W., Pendergast, A.M., 2016. Inactivation of ABL kinases suppresses non – small cell lung cancer metastasis. *JCI Insight*, 1(21), e89647.
- Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., Malhotra, B.D., 2019. Biosensors and Bioelectronics Cell-based biosensors : Recent trends , challenges and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronic*, 141(April), 111435.
- H., Dinçalp, Z., Aşkara, C., Zafer, S., İçli, 2011. Dyes and Pigments Effect of side chain substituents on the electron injection abilities of unsymmetrical perylene diimide dyes. *Dyes and Pigments*, 91(2), 182–191.
- H. Aebi, 1974. *Catalase*, Weinheim/NewYork.
- Habig, William H. Michael J. Pabst, A.W.B.J., 1974. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(20), 7130–7140.
- Hadwan, M.H., Abed, H.N., 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, 6(March), 194–199.
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125–130.
- Han, K., Hashimoto, N., Fukushima, M., 2016. 2016 Alcoholic Liver Disease : Global view Relationships among alcoholic liver disease , antioxidants , and antioxidant enzymes. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), 37–49.
- Harris, D., 2008. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal*, 6(9), 2675–

2683.

- Harsh, A., Sharma, Y.K., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., Kumar, S., Sharma, R., 2016. Effect of short-term heat stress on total sugars , proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 57–64.
- He, L., Liu, C., Xin, J.H., 2015. Sensors and Actuators B : Chemical A novel turn-on colorimetric and fluorescent sensor for Fe³⁺ and Al³⁺ with solvent-dependent binding properties and its sequential response to carbonate. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 213, 181–187.
- Heusler, T., Bruno, G., Bekeschus, S., Lackmann, J.W., von Woedtke, T., Wende, K., 2019. Can the effect of cold physical plasma-derived oxidants be transported via thiol group oxidation? *Clinical Plasma Medicine*, 14(May 2018), 100086.
- Huang, C., Barlow, S., Marder, S.R., 2011. Perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylic Acid Diimides : Synthesis , Physical Properties , and Use in Organic Electronics. *The Journal of Organic Chemistry*, 15;76(8), 2386–2407.
- Huang, Y., Nan, G., 2019. Oxidative stress-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 63, 13–16.
- Interest, P., 2019. Isocoumarins in Medicinal Chemistry and Organic Synthesis 382, 153–176.
- Jeong, S., Jung, J., Kim, M., Seong, H., Lim, H., Lim, S., 2016. Biochemical and Biophysical Research Communications The three catalases in *Deinococcus radiodurans* : Only two show catalase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(3), 443–448.
- Jiang, X., Yu, Y., Chen, J., Zhao, M., Chen, H., Song, X., Alexander, J., Carroll, S.L., Tan, X., Sizovs, A., Cheng, N., Wang, M.C., Wang, J., 2015. Quantitative Imaging of Glutathione in Live Cells Using a Reversible Reaction-Based Ratiometric Fluorescent Probe. *ACS Chemical Biology*, 20;10(3), 864–874.
- Jin, M., Zhang, X., Wang, L., Huang, C., Zhang, Y., Zhao, M., 2009. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Aquat Toxicol*, 13;95(4), 347–354.
- Jones, G., Jackson, W.R., Kanoktanaporn, S., Bergmark, W.R., 1985. Photophysical and photochemical properties of coumarin dyes in amphiphilic media. *Photophysics and Photobiology*, 42(5), 477–483.
- Jurcak, N., Zheng, L., 2019. Signaling in the microenvironment of pancreatic cancer: Transmitting along the nerve. *Pharmacology and Therapeutics*, 200, 126–134.
- Kardos, M., 1913. Über einige Aceanthrenchinon- und 1.9-Anthracen-Derivate. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 46(2), 2086–2091.
- Karuk, Elmas, N., Ş., Ozen, F., Koran, K., Orhan, A., 2018. Selective and sensitive fl

- uorescent and colorimetric chemosensor for detection of CO₃²⁻ anions in aqueous solution and living cells. *Talanta*, 188(March), 614–622.
- Karuk, Elmas, N., Ş., Ozen, F., Koran, K., Yilmaz, I., 2016. Coumarin Based Highly Selective B off-on-off ^ Type Novel Fluorescent Sensor for Cu²⁺ and S²⁻ in Aqueous Solution. *Journal of Fluorescence*, 27(2), 463–471.
- Khaksar, S., Yaghoobi, M., 2012. A concise and versatile synthesis of 2-amino-3-cyanopyridine derivatives. *Journal of Fluorine Chemistry*, 142, 41–44.
- Kiliç, T., Danişmanı, T., Şengün Özsoz, M.E., Anabilim, B., Bilim, D., Kodu, D., 2011. EÜniversitesi FBilimleriEnstitüsüAntikanserİlaç Olan Mitomycin-CNin Dna'YaEtkiMekanizmasınınElektrokimyasalNükleikAsitBiyosensörlerİlBelirlemeesi.
- Kulkarni, A., Patil, S.A., Badami, P.S., 2009. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis , characterization , DNA cleavage and in vitro antimicrobial studies of La (III), Th (IV) and VO (IV) complexes with Schiff bases of coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(7), 2904–2912.
- Lee, J., Spector, D., Labarre, J., Toledano, M.B., Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., Toledano, M.B., 1999. A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast *. *The Journal of Biological Chemistry*, 19;274(8), 4537–4544.
- Li, D., Zhong, Z., Zheng, G., Tian, Z., 2017. A naphthalene benzimidazole-based chemosensor for the colorimetric and on-off fluorescent detection of fluoride ion. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 173–178.
- Liang, N., Kitts, D.D., 2014. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208.
- Lin, Y., Kim, K., Yang, Y., Sadoshima, J., Park, Y., 2011. Regulation of longevity by regulator of G-protein signaling protein, Loco. *Aging Cell*, 10(3), 438–447.
- M. Çamur, 2011. Bazı 4-Hidroksifenilasetikasit Türevi Ftalosiyanın Metal Komplekslerinin Sentezi ve Yapılarının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
- M, W., , Yin P, Shen Y, Zhang L, Deng J, Xue S, Li H, Guo B, Zhang Y, Y.S., 2013. A new turn-on fluorescent probe for selective detection of glutathione and cysteine in living cells †. *Chem Commun (Camb)*, 21;49(41), 4640–4642.
- Maleki, A., Movahed, H., Ravaghi, P., 2016. Magnetic cellulose / Ag as a novel eco-friendly nanobiocomposite to catalyze synthesis of chromene-linked nicotinonitriles. *Carbohydrate Polymers*, 156, 259–267.

- Mathur, K.C.C.Æ.C.L.Æ.P.P., 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol*, 76(9), 545–551.
- Mihaylov, T., Trendafilova, N., 2006. complex of coumarin-3-carboxylic acid DFT modeling and spectroscopic study of metal – ligand bonding in La (III) complex of coumarin-3-carboxylic acid. *Chemical Physics*, 327(September), 209–219.
- Milajerdi, A., Keshteli, A.H., Afshar, H., Esmailzadeh, A., Adibi, P., 2019. Dietary total antioxidant capacity in relation to depression and anxiety in Iranian adults. *Nutrition*, 65, 85–90.
- Miller, N.J., Rice-evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 412, 407–412.
- Mirto, A., Iannuzzi, F., Carillo, P., Ciarmiello, L.F., Woodrow, P., Fuggi, A., 2017. Data in Brief Dataset on antioxidant metabolites and enzymes activities of freshly harvested sweet cherries (*Prunus avium* L .) of Campania accessions. *Data in Brief*, 15, 522–527.
- Mitsuyoshi, H., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Inaba, K., Sakamoto, Y., Okanou, T., Kashima, K., 1999. Ursodeoxycholic Acid Protects Hepatocytes against Oxidative Injury via Induction of Antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun*, 542, 537–542.
- Munne-Bosch S, Pinto, M., 2017. Free Radicals , Oxidative Stress and Antioxidants. *Encyclopedia of Applied Plant Science*, 2(1), 16–19.
- Ni, J.C., Yan, J., Zhang, L.J., Shang, D., Du, N., Li, S., Zhao, J.X., Wang, Y., Xing, Y.H., 2016. Bifunctional fluorescent quenching detection of 2, 4, 6-trinitrophenol (TNP) and acetate ions via 4,4'-(9,9-dimethyl-9H-fluorene-2,7-diyl)dibenzoic acid. *Tetrahedron Letters*, 57, 4978–4982.
- Niu, Y., Cao, W., Zhao, Y., Zhai, H., 2018. The levels of oxidative stress and antioxidant capacity in hibernating *Nanorana parkeri*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 219–220, 19–27.
- Oliveira, P., Sc, B.B., Sc, M., Pala, D., Nutr, B.S., Sc, M., Teixeira, C., Sc, S.B., Sc, M., Oliveira, M., Sc, D.S.B., Sc, M., Ph, D., Ferreira, J., Nutr, B.S., Sc, M., Ph, D., Adrielle, R., Vieira, L., Nutr, B.S., Sc, M., Andrezza, G., Folly, D.F., Nutr, B.S., Sc, M., Carolina, A., Volp, P., Nutr, B.S., Sc, M., Ph, D., Nascimento, R., Sc, D.F.B., Sc, M., Ph, D., 2016. Ac , ai (*Euterpe oleracea* Mart .) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. *Nutrition*, 32(6), 674–680.
- Online, V.A., Tian, M., Liu, L., Li, Yongjun, Hu, R., Liu, T., Liu, H., Wang, S., Li, Yuliang, 2014. An unusual OFF–ON fluorescence sensor for detecting mercury ions in aqueous media and living cells † 2055–2057.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Products of Browning Reaction-Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307–

- Özoğlu, Ö., ÜNAL, M.A., Güneş Altutaş, E., 2017. Biyosensörler : Gıda ve Sağlık Alanında Laktat Biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(2), 180–193.
- Powers JM, B.G., 2019. Disorders of Iron Metabolism: New Diagnostic and Treatment Approaches to Iron Deficiency. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 33(3), 393–408.
- Pugazhendhi, A., Dhanarani, S., Shankar, C., Prakash, P., Ranganathan, K., Saratale, R.G., Thamaraiselvi, K., 2017. Electrophoretic pattern of glutathione S-transferase (GST) in antibiotic resistance Gram-positive bacteria from poultry litter. *Microbial Pathogenesis*, 110, 285–290.
- Qadeer, G., Rama, N.H., Gardun, M.L., 2007. Synthesis and anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and. *Journal of Fluorine Chemistry*, 128, 641–646.
- Refat, M.S., El-deen, I.M., Anwer, Z.M., El-ghol, S., 2009. Bivalent transition metal complexes of coumarin-3-yl thiosemicarbazone derivatives : Spectroscopic , antibacterial activity and thermogravimetric studies. *Journal of Molecular Structure*, 920(1–3), 149–162.
- Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexo, E., Clarke, R., Mcpartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., Mcpartlin, C., Scott, J.M., 2004. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations : An Expert Opinion. *Clin Chem*, 50(1), 3–32.
- Ren, S., Zhou, F., Xu, C., Li, B., 2015. Simple method for visual detection of glutathione S -transferase activity and inhibition using cysteamine-capped gold nanoparticles as colorimetric probes 147–152.
- Ren, Y., Yang, H., Wang, T., Wang, C., 2019. Bio-synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 235(November 2016), 121746.
- Rudianto, N., Kristiana, P., Aboshi, T., Murayama, T., 2018. Fitoterapia New isocoumarins , naphthoquinones , and a cleistanthane-type diterpene from *Nectria pseudotrichia* 120-1NP. *Fitoterapia*, 127(March), 356–361.
- Ş., N., K.E., 2019. Biyotiyollerin Tayini İçin Perilen Diimid Temelli Floresans Problemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları. *Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Karaman.
- Saeed, A., Shabir, G., Mahar, J., Irfan, M., 2015. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Spectroscopic and electrochemical behavior of newly synthesized high hybrid dyes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 151, 72–79.
- Sahin, Z.M., Alimli, D., Tonta, M.M., Kose, M.E., Yilmaz, F., 2016. Highly Sensitive and Reusable Mercury (II) Sensor based on Fluorescence Quenching of Pyrene

- Moiety in Polyacrylamide-Based Cryogel. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 242, 362–368.
- Saleh, A.M., Kebeish, R., 2017. Coumarin impairs redox homeostasis in wheat aleurone layers. *Journal of Plant Research*, 131(1), 157–163.
- Seifi, M., Rabori, M.K., Sheibani, H., 2013. Highly Efficient Method for Synthesis of N-Amino-2-Pyridone Derivatives in the Presence of Catalysts such as Magnesium Oxide (MgO) and. *Modern Research in Catalysi*, 2(June), 8–12.
- Shahrokhian, S., 2001. Lead Phthalocyanine as a Selective Carrier for Preparation of a Cysteine-Selective Electrode 73(24), 5972–5978.
- Shen, Y., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., Qi, X., 2015. In Vitro and In Vivo Antioxidant activity of Polyphenols Extracted from Black Highland Barley. *Food Chemistry*, 194, 1003–1012.
- Singh, B., Parshad, R., Khajuria, R.K., Guru, S.K., Pathania, A.S., Sharma, R., Chib, R., Aravinda, S., Gupta, V.K., Khan, I.A., Bhushan, S., Bharate, S.B., Vishwakarma, R.A., 2013. Saccharonol B , a new cytotoxic methylated isocoumarin from *Saccharomonospora azurea* q. *Tetrahedron Letters*, 54(49), 6695–6699.
- Sma, A., Monache, F.D., Sma, E.F.A., 2008. Antifungal activity of coumarins. *Zeitschrift für Naturforschung*, 63(1–2), 21–28.
- Smith, M.A., Nelson, C.L., Biffin, T.E., Bush, D., Hall, E.J.S., Hopkins, D.L., 2019. NU SC. *Meat Science*, 151, 18–23.
- Sridhar, K., Charles, A.L., 2019. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH [rad] and ABTS [rad] assays: Estimation methods for EC 50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275, 41–49.
- Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D., 2015. Antioxidants in Translational Medicine 1 23(14), 1130–1143.
- Supuran, C.T., 2005. In-vitro antibacterial , antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(August), 333–340.
- Tarımeri, N., 2019. Tek Kullanımlık Bir Biyosensör: Yeni Silanlama Ajanı ve Biyosensörlerde Kullanımının İncelenmesi. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale*.
- Thakur, M.S., Ragavan, K. V., 2013. Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 625–641.
- Traykova, M., Kostova, I., 2005. Coumarin Derivatives and Oxidative Stress. *International Journal of Pharmacology*, 1(1), 29–32.
- Tunç, S., 2017. Dna hasari tayini için grafene dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin

- hazırlanması. *Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Ordu.
- Tüylek, Z., 2017. Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim Biosensors and Nanotechnological Interaction. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi BEU Journal of Science*, 6(62), 71–80.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
- Verlag, F., Abenavoli, M.R., Sorgonà, A., Sidari, M., Badiani, M., Fuggi, A., Università, Ambientale, Calabria, R., Vito, F., Calabria, I.-R., Università, Agrobiologia, Calabria, R., Francesco, P.S., Rc, I.-G., Università, S., C, C.D., Arena, V., Ce, I.-C., Rosa, M., 2003. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L . cv . Saint Valery) cells in suspension culture. *Journal of Plant Physiology*, 160(3), 227–237.
- Wang, F., Tang, J., Liu, J., Wang, Y., 2011. Synthesis and photoinduced electron transfer characteristic of a bis (zinc porphyrin) - perylene bisimide array. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 24(11), 1101–1109.
- Wang, M., Zhang, D., Li, M., Fan, M., Ye, Y., 2013. A Rhodamine-Cyclen Conjugate as Chromogenic and Fluorescent Chemosensor for Copper Ion in Aqueous Media. *Journal of Fluorescence*, 23(3), 417–423.
- Wang, X.F., Cynader, M.S., 2001. Pyruvate Released by Astrocytes Protects Neurons from Copper-Catalyzed Cysteine Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 21(10), 3322–3331.
- Wu, J., Zhang, M., Lin, W., 2007. A case study of a frontal system simulated by a climate model : Clouds and radiation 112(November 2006), 1–16.
- Wu, J.Q., Kosten, T.R., Zhang, X.Y., 2013. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 112(12), 1–16.
- Yu, Y., Li, Yongjun, Qin, Z., Jiang, R., Liu, H., Li, Yuliang, 2013. Journal of Colloid Designed synthesis and supramolecular architectures of furan-substituted perylene diimide. *Journal of Colloid And Interface Science*, 399(June), 13–18.
- Yue, D., Wang, M., Deng, F., Yin, W., Zhao, H., Zhao, X., Xu, Z., 2018. Biomarker-targeted fluorescent probes for breast cancer imaging. *Chinese Chemical Letters*, 29(5), 648–656.
- Zhang, H., Zhabyeyev, P., Wang, S., Oudit, G.Y., 2019. Role of iron metabolism in heart failure: From iron deficiency to iron overload. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1865(7), 1925–1937.
- Zhao, H., Zhang, Y., Xu, H., He, Z., Zhang, Z., Zhang, H., 2015. *AC. Tetrahedron*,

71(40), 7752–7757.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Hacer BORA
E-posta : hbora8484@gmail.com
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim:

Lise: Açık Öğretim Lisesi
Lisans: Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Öğretmenliği
Yüksek Lisans: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-Halen	Süleymanobası Ortaokulu Gaziantep/Yavuzeli	Fen Bilimleri Öğretmeni

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar:

- 1) Şahin, G., Bora, H., Sadi, G., (2018). Changes in the expression levels of CAT, SOD1 and SOD2 in kidney tissues in response to diabetes and resveratrol. *7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Konya, Türkiye (25-27 April 2018)*, Poster Presentation, PP: 369
- 2) Bora, H., Köksal, E., A., (2014). Fen eğitiminde laboratuvar güvenliği. *Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi*, 11-14 Eylül, Adana. Bildiri Kitabı s. 1268.