

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BENZOFURAN VE BENZİMİDAZOL İHTİVA EDEN BİLEŞİĞİN
RATLARDAKİ (WİSTAR) BAZI KAN PARAMETRELERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İlyas SARI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fikret KARATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

2009-ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BENZOFURAN VE BENZİMİDAZOL İHTİVA EDEN BİLEŞİĞİN
RATLARDAKİ (WİSTAR) BAZI KAN PARAMETRELERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İlyas SARI

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı

Bu tez, tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin hazırlanması ve çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam F.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Fikret KARATAŞ'a tüm içtenliğimle teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmalarım sırasında her zaman, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Sayın Doç. Dr. Süleyman SERVİ ve Doç. Dr. Haki KARA'ya teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Her zaman bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan F.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen doktora öğrencisi Sayın Murat GENÇ'e teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca 1356 no'lu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen **Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)**'ne çok teşekkür ederim.

Büyük fedakârlıklar göstererek bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen biricik anneme, babama ve kardeşlerime, içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I
Şekillerin Listesi.....	III
Tabloların Listesi.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	V
Özet	VI
Abstract	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Benzimidazol ve Türevi Bileşikler.....	1
1.2. Benzofuran ve Türevi Bileşikler	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. A Vitamini.....	3
2.2. E Vitamini.....	4
2.3. C Vitamini.....	5
2.4. Malondialdehit (MDA)	7
2.5. Glutasyonun Yapısı ve Önemi.....	9
2.6. Glutasyonun Sentezi ve Döngüsü.....	10
2.7. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	13
2.8. Serbest Radikaller ve Toksik Etkileri	14
2.9. Antioksidanlar ve Metabolizma için Önemleri	16
3. METERYAL VE METOT.....	18
3.1. Hayvan Materyali.....	18
3.2. Grupların Oluşturulması	18
3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	19
3.4. Doku Örneklerinin (Karaciğer) Hazırlanması.....	20
3.5. Metot.....	20
3.5.1. A ve E Vitamini Tayini.....	20
3.5.2. C Vitamini Tayini	21
3.5.3. MDA Tayini	22
3.5.4. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyonun Tayini.....	23
3.5.5. Glutasyon Peroksidaz Tayini	25
3.5.5.1. Hemolizat Hazırlanması	25
3.5.5.2. Hemogloblin Tayini	27

3.6. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. Glutatyonun sentezi	11
Şekil 1.2. Glutatyon döngüsü	12
Şekil 3.1. 2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)	19
Şekil 3.2. Vitamin A'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi.	21
Şekil 3.3. Vitamin E'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.	21
Şekil 3.4. Vitamin C'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.	22
Şekil 3.5. MDA'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi.	23
Şekil 3.6. İndirgenmiş Glutatyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	24
Şekil 3.7. Yükseltgenmiş Glutatyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	24
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve 2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratların serumdaki vitamin A, E, C miktarlarının sütun grafiği	30
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait GSH ve GSSG miktarlarının sütun grafiği	30
Şekil 4.3. Kontrol grubu edilen 2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratların GSH-Px aktivitesinin sütun grafiği	31
Şekil 4.4. Kontrol grubu ve 2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait karaciğer vitamin A, E, C ve MDA miktarlarının sütun grafiği	32

TABLÖLARIN LİSTESİ

Tablo 1. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratların serum vitamin A, E, C, MDA ile kan GSH, GSSG miktarları ile GSH/GSSG oranı ve eritrosit GSH-Px aktivitesinin değerleri. **29**

Tablo 2. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin üç farklı dozda uygulandığı ratların karaciğer vitamin A, E, C ve MDA miktarları **32**

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP = Adenozin Trifosfat

BIBE = 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon

DFMO = Diflorometilornitin

DMSO = Dimetil sülfoksit

DNA = Deoksiribonükleik Asit

EDTA = Etilen diamin tetra asetik asit

EPG = Electropalaltography

FÜDAM = Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi

GABA = Gama Amino Bütirik Asit

GSH = İndirgenmiş Glutasyon

GSH-Px = Glutasyon Peroksidaz

GSSG = Yükseltgenmiş Glutasyon

HPLC = High performance liquid chromatography

H₂O₂ = Hidrojen peroksit

MDA = Malondialdehit

NADPH = Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

PUFA = Poly Unsaturated Fatty Acids

SOD = Süperoksit dismutaz

SOR = Serbest Oksijen Radikalleri

ROS = Reactive oxygen substance

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BENZOFURAN VE BENZİMİDAZOL İHTİVA EDEN BİLEŞİĞİN RATLARDAKİ (WİSTAR) BAZI KAN PARAMETRELERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlyas SARI

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

2009, Sayfa: 46

Bu çalışmada 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE) bileşiği 10, 20 ve 30 mg/kg(canlı ağırlık) olacak şekilde üç farklı dozda ratlara deri altına gün aşırı enjekte edildi. Kontrol ve uygulama grupları (her bir grupta 10 rat) olmak üzere toplam 40 rat kullanıldı. Her gruptaki ratlar 10. enjeksiyondan sonra dekapite edildi. Karaciğerleri alüminyum folyoya sarıldı, kanlar ise normal ve EDTA'lı tüplere alındı. Normal tüplere alınan kanlar santrifüjlenip serumları ayrıldı ve bu serumlar ile karaciğerlerde antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve Malondialdehit (MDA) miktarları belirlendi. EDTA'lı tüplere alınan kanlarda ise indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) miktarları ile Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi belirlendi.

Uygulama gruplarındaki ratların serum ve karaciğerlerindeki antioksidan vitaminleri kontrol grubuna göre, doz artışına paralel olarak E ve C vitaminleri miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olurken ($p<0.05$), A vitamini miktarında anlamsız artış gözlemlendi ($p>0.05$). Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA miktarında ise anlamsız bir azalma gözlemlendi ($p>0.05$). GSH miktarında da uygulanan doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.05$), GSSG miktarında ise azalma ($p>0.05$) olduğu belirlendi. Uygulama gruplarında, doz artışına bağlı olarak GSH-Px aktivitesinde azalma ($p>0.05$), kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak antioksidan vitamin salınımındaki artma, MDA oluşumunda azalma, GSH-Px aktivitesine bağlı olarak GSH'ta artma ve GSSG'de azalma olduğundan BIBE bileşiğinin yüksek antioksidan potansiyele sahip olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelime: 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon, antioksidan vitaminler, GSH, GSSG, GSH-Px, Rat.

ABSTRACT

PhD Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF COMPONENT CONTAINING BENZOFURANE AND BENZIMIDAZOL ON THE SOME PARAMETERS AT BLOOD OF RATS(WISTAR).

İlyas SARI

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemical

2009, Page: 46

In this work, 2-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-1-(benzofuran-3-yl)ethanone (BIBE) is injected to the rats (wistar) under the skin every other day in the doses of 10, 20 and 30 mg per kilogram of the living. Total of 40 rats are used as control and experimental groups (10 rats in each group). The rats of both groups are decapitated after the tenth injection. Rats' livers are wrapped with an aluminum foil and their bloods are placed in tubes with and without EDTA. Serum in the blood that was placed in the tubes without EDTA is separated by centrifuging. Amounts of antioxidant vitamins (A, E and C) and malondialdehyde (MDA) in livers and this serum are determined. Amounts of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) are determined on the blood that was placed in the tubes with EDTA.

While amounts of antioxidant vitamins E and C in livers and blood of the rats in the experimental group showed statistically meaningful ($p < 0.05$) increase as the injection dose increases, relative to the control group, the amount of vitamin A unmeaningful ($p > 0.05$) increase is observed as such as a statistically unmeaningful ($p > 0.05$) decrease in the amount of lipid peroxidation product, MDA, is observed. At the same time, it was found that the amount of GSH increases statistically meaningfully ($p < 0.05$) but the amount of GSSG decreases as the infection dose increases. In the experimental group, decrease in the activity of GSH-Px relative to the control group as the injection dose increases is the statistically meaningful ($p > 0.05$). As a result, since antioxidant vitamin release increases, MDA formation decreases, depending on the activity of GSH-Px GSH increases and GSSG decreases it can be said that BIBE compound may have high antioxidant potential.

Key Word; 2-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-1-(benzofuran-3-yl) ethanon, antioxidant vitamins, GSH, GSSG, GSH-Px, Rat

1. GİRİŞ

1.1. Benzimidazol ve Türevi Bileşikler

Benzimidazol ve imidazolün halka sistemleri çeşitli farmakolojik etkiye sahiptir. Özellikle 2-Süstitüe 1H-benzimidazoller ve 2- süstitüe 1H-imidazollerin yanı sıra 2-aril amino imidazolün türevleri de son yıllarda geniş uygulama alanları bulmuşlardır [1, 2]. Benzimidazol ve imidazol türevlerinin başta antiparaziter olmak üzere, antibakteriyel, antiviral, analjezik ve antihipertansiv etkilerinin yanı sıra antioksidan etkiye sahip oldukları bildirilmektedir [3 - 18] Bishop ve ark. [3] yapmış oldukları araştırmalarında 2-Arilamino-2-imidazollerin türevlerinin kardiyovasküler sistemde yüksek tansiyonu düşürücü etkisi olduğunu, ağrı kesici ve sakinleştirici olarak kullanıldıklarını tespit etmiş, ayrıca antidiyaretik özelliklerinin olduğunu belirlemişlerdir.

Abuzar ve ark. [5] ile Dardonville ve ark. [6] bu bileşiklerin çeşitli parazitlere karşı etkili olduklarını bildirmişlerdir. Srivastava ve ark. [7] yapmış oldukları araştırmada metil-(5-((4-(2 piridinil)-1-piperazinil) karbonil-1H-benzimidazol-2-y1) karbomat (CD:RI bileşiği 81/470) ve tiyobendazol'un solucan düşürücü etkisinin yanı sıra parazitlerde glutatyon (GSH) miktarında düşüş ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Coles ve ark. [8, 9] yapmış oldukları araştırmada benzimidazollerin evcil hayvanlardaki paraziter enfeksiyonların sağaltımı ve kontrolü amacıyla kullanılan önemli kimyasal ajan gruplarından olduklarını ortaya koymuşlardır. Özellikle oxfendazole-oxyclozanide karışımları veteriner hekimlikte yaygın olarak antelmintik amaçla kullanıldığı bildirilmektedir [10].

Paglietti ve ark. [11] halkanın 2. pozisyonunda fenil substitesi taşıyan benzimidazol türevleri ile ilgili yaptıkları araştırmalarında bu bileşiklerin ağrı kesici olduğunu ortaya koymuşlardır. Mousseron ve ark. [12] 1-(β -dimetilaminoetil) benzimidazol türevlerinin morfin benzeri analjezik aktiviteye sahip olduğu belirtmişlerdir. Kusano ve ark. [13] araştırmalarında bu bileşiklerin antimikrobiyal etkilerini araştırmış ve bu bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Yine Dunwell ve ark. [14] bu bileşiklerin iltihap kurutucu özelliğinin olduğunu bildirmişlerdir. Komssarov ve ark. [15] halkanın 2. pozisyonunda fenil substitesi taşıyan benzimidazol bileşiklerinin spasmolitik etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Haskell ve ark. [16] bu bileşiklerin antiviral olduğunu belirtmişlerdir.

Ateş ve ark. [17], ratlarda retinoid tip benzimidazol bileşiğinin (benzimidazol-tetranafthalin-BITN) sitokrom P 450 (CYP) bağımlı etoksiresorufun O-deetalaz (EROD) ve

pentoksiresorufun O-depentelaz (PROD) enzim aktiviteleri ile ilişkisini belirleyip antikanserojenik ve antioksidan potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Tanaka ve ark. [18] 5-metil-4-(3-piridil)-2-(sübstitelenmiş benzimidazol-5-il) imidazol türevlerinin tromboksan A2 sentetaz fosfodiesteraz (PDE) ve siklooksigenaz gibi trombosit pıhtılaşma dizisinde olan enzimleri inhibe ettiği ortaya koymuşlardır.

1.2. Benzofuran ve Türevi Bileşikler

Benzofuran bileşikleri çeşitli etkilerinden dolayı ilaçların yapısında yer almaktadırlar. Benzofuran bileşikleriyle ilgili yapılan araştırmalarda bu bileşiklerin ağrı kesici, iltihap kurutucu, antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antioksidan gibi etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [19 - 38]. Radl ve ark. [19] yaptıkları çalışmada bu bileşiklerin ağrı kesici etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Smati ve ark. [20] İle Babu ve ark. [21] yapmış oldukları araştırmalarda benzofuran bileşiklerinin iltihap kurutucu özellikleri ortaya koymuşlardır. Koca ve ark. [22], Demizu ve ark. [23, 24] ile Khan ve ark. [25] yapmış oldukları araştırmalarda benzofuran ve türevlerinin antimikrobial etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Papadakivaliraki ve ark. [26] benzofuran türevi bileşiklerinin antiviral etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Masubuchi ve ark. [27] ile Singh ve ark. [28] bu bileşiklerin antifungal özelliklerinin olduğunu yapmış oldukları araştırmalarında belirtmişlerdir.

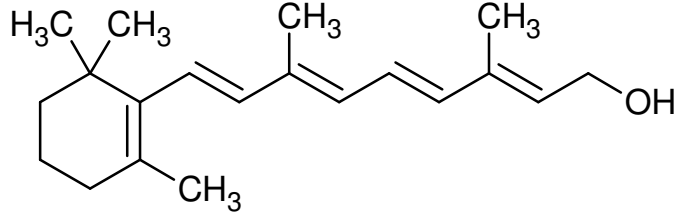
Baraldi ve ark. [29], Hayakawa ve ark. [30] İle Radl ve ark. [31] benzofuran türevi bileşiklerin antitümör etkilerini ortaya koymak için yaptıkları araştırmada bu bileşiklerin tümör gelişimini durdurduğu ve tümörü geriletmediğini belirtmişlerdir. Connor ve ark. [32] yapmış oldukları araştırmada bu bileşiklerin; antialerjik özelliğe sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Davis ve ark. [33] İle Ohno ve ark. [34] da bu bileşiklerin kan basıncını düşürücü olduklarını gözlemlemişlerdir.

Grisar ve ark. [35] ile Bindoli ve ark. [36] benzofuran türevi bileşiklerin lipit peroksidasyonu sonucu oluşan oksidanları ve sülfhidril grup oksidanlarıyla etkileşerek bu oksidanları yok ettiği ve dolayısıyla antioksidan olduğunu yapmış oldukları araştırmalarda belirtmişlerdir.

Cowley ve ark. [37] yapmış oldukları araştırmada benzofuran türevi bileşiklerinin α - tokoferolün analogu gibi özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Kirilmis ve ark. [38] da benzofuran türevi bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. A Vitamini



A Vitamini (Retinol)

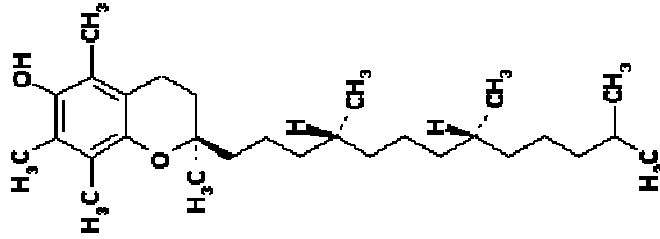
A vitaminin tabiatta iki yaygın şekli mevcuttur. Memeli dokularında ve deniz suyu balıklarında bulunan A₁ vitamini veya retinol, tatlısu balıklarında bulunan A₂ vitamini veya retinol₂ her ikisi altı üyeli bir karbon halkası ve 11 karbonlu yan zincirden ibarettir. Bitkilerde çok yaygın olan belirli karotinoidler (özellikler α-, β- ve γ- karoten) de A vitamini aktivitesi gösterir. Bu karotinoidler bağırsak zarında ve karaciğerdeki enzimatik reaksiyonlarla A vitaminine dönüşür [39]. A vitamini dokuların bakım ve onarımı, yeni hücrelerin gelişmesi, kemiklerin ve dişlerin oluşumu için de önemlidir. Antioksidan olarak faaliyet göstererek hücreleri kansere ve diğer hastalıklara karşı korur, yaşlanma sürecini yavaşlatır, yağ depolanmasına yardımcı olur. A vitamininin vücut açısından diğer bir önemi, proteinlerin A vitamini olmadan kullanılamamasıdır [40].

A vitamini sağlıklı deri ve saçlar için gerekli olup diş, dişeti ve kemik gelişiminde önemli rol oynar. Normal görme ve gece görmede etkili, ayrıca bağışıklık sistemini de kuvvetlendirir. Akciğer, mide, üriner sistem ve diğer organların koruyucu epitelinin düzeninde rol oynar. Kanseri, damar sertliği ve katarakt gibi hastalıkları önlediği yolunda bulgular elde edilmiştir. Bu vitamin ayrıca protein bileşimine katılır ve tümörlerde görülen hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalmasını önler. Yaşlılıkta etkinliği çok artan kolajenaz enziminin indirgeyici etkisini önlediği saptanmıştır [41].

A vitamini eksikliği genç hayvanlarda büyüme geriliğine, kemik ve sinir sisteminin doğru gelişmemesine sebep olur, deri kurur ve kalınlaşır, böbrekler ve değişik bezler dejenerasyona uğrar ve kısırılık görülür. A vitamini eksikliğinde en fazla etkilenen gözlerdir. Genç hayvanlarda ve çocuklarda vitamin eksikliğinin belirtisi olarak kseroftalmi diye bilinen

hastalık ortaya çıkarır ve bazı tropikal bölgelerde körlüğe götürür. Yetişkinler A vitamin eksikliği gece körlüğü şeklinde ortaya çıkar [39].

2.2. E Vitamini



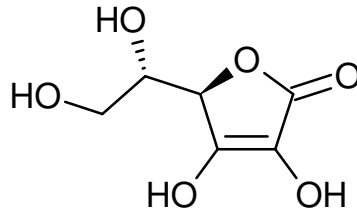
E vitamini (α -tokoferol)

E vitamini etkisi gösteren sekiz bileşik bilinmektedir. Bu bileşikler α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, vb. tokoferoller olarak adlandırılırlar. Tokoferoller içinde en bol bulunan ve en aktif olanı α -tokoferoldür. Tokoferoller bir kroman halka sistemi ve izoprenoid bir yan zincir ihtiva eder. Kroman halka sistemi, bir benzen halkası ile bir piran halkasının kondansasyonundan meydana gelir ve 2- metil-2-fetil-6-hidroksi kromana tokol denir. Bütün tokoferoller tokol türevleri olup, tokoferoller antioksidan olarak bilinirler. Moleküler oksijene maruz bırakılan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu gibi oksidasyonlar doymamış yağ asitlerinin polimerleşmesine sebep olur. Buna göre tokoferollerin fonksiyonlarından birisi membranların lipidlerindeki birçok doymamış yağ asitlerini moleküler oksijenin bozucu etkisine karşı korumaktır [39].

E vitamini, kimyasal yapı itibarı ile bir tokol olup, antisterilite vitamin olarak da bilinir. E vitamini yağda çözünen önemli bir antioksidandır ve özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli antioksidan işlevler görmektedir. Epidemiyolojik ve sınırlı ara çalışmalar, E vitamininin kardiyovasküler hastalıkların, bazı kanserlerin ve öteki kronik hastalıkların riskini azalttığını belirlemektedir. Bazı klinik deneylerle E vitamininin sağlığa yararları daha derinlemesine değerlendirilmektedir. Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi α -tokoferoldür. Geçmişte asıl olarak α -tokoferol üzerinde yoğunlaşmış iken, bugün öteki tokoferoller ve tokotrienoller daha fazla ilgi çekmektedir. İlk sonuçlara göre bunlar, α -tokoferolden farklı antioksidan ve diğer fonksiyonlara sahiptir. E vitaminin insanlardaki ana antioksidan fonksiyonu çoğunlukla α -tokoferollerle birlikte incelenir ve bu lipid peroksidasyonunun engellenmesidir. Lipid peroksidasyonu hücre ve organel zarlarında, lipoproteinlerde, yağlı dokuda, beyinde ve PUFA'nın (poly unsaturated

fatty acids = çoklu doymamış yağ asitleri) bol olduğu diğer dokularda özellikle yaygındır. α -Tokoferol, zarlarda yaklaşık 1 moleküle 1000 lipid molekülü oranında bulunur. Fitol kuyruğu sayesinde, yüzeye yakın olan aktif kroman halkasıyla birlikte zar alt tabakasında konumlanmak gibi eşsiz bir yeteneğe sahiptir. Bu hem lipid antioksidanı olarak iş görmesine hem de diğer antioksidanlarla etkileşime geçerek oksitlenmiş halinden kendi haline yeniden dönüşmesine imkân sağlar. Diğer antioksidanlarla, özellikle de suda çözünenlerle sinerjisi, antioksidan sistemin önemli bir özelliğidir [40]. En iyi antioksidan olup, serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek kanser gibi dejeneratif hastalıkların oluşmasını engeller. Hücre zarı ve taşıyıcı moleküllerin lipid kısmını stabilize ederek hücreyi serbest radikaller, ağır metaller, zehirli bileşikler, ilaç ve radyasyonun zararlı etkilerinden korur. Bağışıklık sisteminin aktivitesi için gereklidir. Timus bezini, alyuvarları korur ve virütik hastalıklara karşı bağışıklık sistemini geliştirir. Göz sağlığı için hayati önem taşır ve retina gelişimi için de gereklidir. Serbest radikallerin katarakt yapıcı etkilerini önler. Yaşlanmaya karşı koruyucu olup, serbest radikallerin; dokular, deri ve kan damarlarında oluşturduğu dejeneratif etkiyi önler. Yaşlanmayla ortaya çıkan hafıza kayıplarını da önleyici etkisi vardır[41].

2.3. C Vitamini



C Vitamini (Askorbik asit)

C vitamini askorbik asit olarak da adlandırılır. Yapı itibarıyla en basit vitaminlerdendir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Birçok hayvan ve bitki askorbik asidi glukozdan ve diğer basit ön basamaklardan sentezleyebilirler. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dâhil bazı omurgalılar için esansiyeldir. Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu veren ve bu sırada dehidroaskorbik aside dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajan, yani antioksidandır. Dehidroaskorbik asitte vitamin etkisine sahiptir. C vitamini kofaktör olarak, prolinin hidroksiprolin enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılır [39]. C vitamininin kanserden koruyucu ya da tedavi edici etkisi üzerine yüzlerce hayvan, insan ve hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Bu araştırmaların birçoğunda C vitamininin anti-kanser özelliklerinin altı çizilmiştir [42–44].

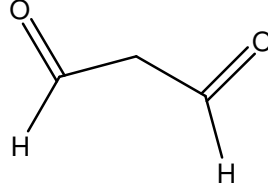
Yetmişli yılların başlarında Cameron ve iki Nobel ödüllü Pauling yüzlerce terminal dönemdeki kanserli hastaya günde 10 gram C vitaminini 10 gün süre ile damardan, ölünceye kadar da ağızdan vermişler. Bu hastaların yaşam sürelerini 1000 kadar C vitamini almayan fakat aynı ağırlıktaki kanser hastalarinkiyle kıyaslamışlar. Sonuçta C vitamini alan kanser hastalarının almayanlardan 150 ile 300 gün daha uzun yaşadığını tespit etmişlerdir [45].

C vitamini ile ilgili yapılan bazı araştırmalar C vitaminini kanser hücrelerini tahrip ederek öldürdüğünü (nekroz), kanser hücrelerinde programlanmış ölümü (apoptoz) hızlandığını, kollojen (bağ dokusu) oluşumunu artırarak kanserli dokuyu sağlamca sardığını, böylece metastazı (sıçramayı) engellediğini ortaya koymuştur. Ayrıca hiyaluridaz enzimini aktive ettiği, hiyaluridaz bağ dokusunu parçaladığı, metastazı artırdığı, ağrı eşiğini düşürdüğü, efora tahammülü artırdığını, bağışıklığı güçlendirerek kanserli hastayı enfeksiyonlardan koruduğu belirlenmiştir [44, 46].

Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi için kullanılır. Ayrıca çabuk soğutularak dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirir. Bunları dondurmadan önce saf askorbik asit katmakla bu sakıncalar önenebilmektedir. Oksijen hoşla gitmeyen değişiklikleri yapmadan önce askorbik asit tarafından tutulur. Bu şekilde dondurulmuş kayısı, şeftali, elma, üzüm, muz, armut, ananas gibi meyvelerde 25 yıldan beri askorbik asit antioksidan olarak yeğlenerek kullanılır ve yaygın biçimde de gıda sanayiinde kullanılır [40].

C vitamininin başlıca rolü doku bağlarını tutan ve ana protein maddesi olan kollojeni üretmek ve bağışıklık sistemi, sinir sistemi, hormonlar ve besinlerin emilimi fonksiyonlarına (E vitamini ve demir gibi) destek olmaktır. Göz merceği ve akciğer gibi yapılarda antioksidan olarak çalışır. C vitamini ayrıca antioksidan yapıda olan E vitaminine dönüşebilir. Yüksek dozda alınması halinde ne gibi yararlar getireceği yolunda çalışmalar sürmekle birlikte; β -karoten gibi, antioksidan etki nedeniyle kanser, kalp-damar hastalıklarında ve katarakta yakalanma ihtimalini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca soğuk algınlığı gibi hastalıklara karşı da direnci arttırmaktadır [41].

2.4. Malondialdehit (MDA)



Malondialdehit (MDA)

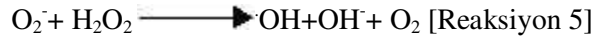
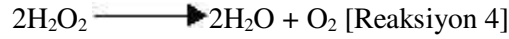
Serbest radikallerin, membranların reseptörlerine kovalent bağlanması çoklu doymamış yağ asidi/protein oranını değiştirir ve lipid peroksidasyonu başlatır [44]. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi MDA olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle MDA miktarı ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyon derecesini yansıtmaktadır. MDA, molekül oksijen azalması yaparak süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur, bu ürünlerde hücre ve dokulara hasarlayıcı etki yaparlar [47].

Lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, trigliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elamanları ile etkileşirler [48]. Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, fazla miktarlarda doymamış yağ asiti ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipid radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir işaretidir. Biyolojik membranların en önemli unsurları lipid ve proteinlerdir. Lipid peroksidasyonu, lipidler kadar membran proteinlerini de hasara uğratabilir [49].

Oksijen molekülü lipidlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlere çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipid peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun zar yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerinin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [50].

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Oksijenin indirgenmesini izleyen dönemde süperoksit (O_2^-), hidroperoksil (HO_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) hidroksil

radikali ($\cdot\text{OH}$) nin dâhil olduğu birçok reaktif oksijen türü oluşmaya başlar [Reaksiyon 1,2,3,4,5].



Üç numaralı reaksiyon superoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından fizyolojik pH'da $2 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ hız sabitesi ile katalizlenir. Reaksiyon sonunda oluşan H_2O_2 , memeli hücrelerinde katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından glutatyon redüksiyonu ile su moleküler oksijene detoksifiye edilir [Reaksiyon 4]. Okside glutatyon da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutatyon redüktaz (GR) ile redükte glutatyona dönüştürülür.

Hidroksil radikalleri son derece aktif oksidanlardır. Bu radikaller hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu DNA hasarını başlatırlar. Superoksit radikalleri daha az reaktif olmakla birlikte yarı ömürleri daha uzundur Haber-Weiss reaksiyonu aracılığı ile hidroksil radikallerini oluştururlar [Reaksiyon 5]. Bu reaksiyon Fe^{2+} , Cu^{2+} gibi eser metal iyonları varlığında daha hızlı ilerlemektedir (Fenton reaksiyonu).

Hidroksil radikali oluşumu için bir diğer yol ise O_2^- in beyindeki nöronal endotelial glial nitrik oksid sentetaz (NOS) aracılığı ile sürekli oluşan bir gaz radikali olan nitrik oksid (NO) ile girdiği reaksiyondur. Bu reaksiyon ürünü peroksinitrittir (ONOO^-) [Reaksiyon 6]

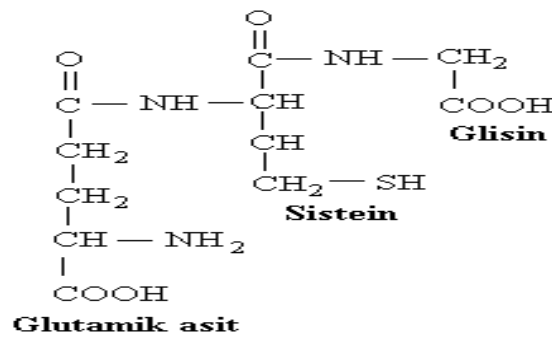


Son derece hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda ONOO^- oluşum hızı $6.7 \times 10^9 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olup diffüzyon sınırlıdır. Fizyolojik pH da ONOO^- hemen azot dioksidi (NO_2) parçalanır [Reaksiyon 7, 8]. Çok güçlü bir prooksidan olan ONOO^- , SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Sonuçta hücresel proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması hücresel disfonksiyon ölümüne yol açabilir. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur [51].

Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerini ve membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [50].

2.5. Glutatyonun Yapısı ve Önemi

Glutatyon (γ -glutamil sistein glisin) organizmada tiyol grubu içeren düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. Yapısını oluşturan 3 aminoasit sırasıyla glutamik asit+sistein+glisin'dir [52-55]. Dokularda yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında önemli rol oynayan glutatyon, gliseraldehit fosfat dehidrogenaz enziminin prostetik grubudur. Glutatyon dokularda oksijen taşınmasında rol oynayan gliksilaz adındaki koenzimde bulunan bir tripeptittir [56].



Glutatyon

Glutatyon kolaylıkla hidrojen verebilen ve alabilen bir yapıya sahiptir. Bu özelliği ile çeşitli redoks olaylarına katkıda bulunur. Bazı enzim sistemlerinin içinde yer alır, ayrıca eritrositlerde hemoglobinin dönüşümsüz oksidasyonunu engeller ve bağırsaklardan demir emilimini kontrol eder [57]. Glutatyonun DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transport gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca

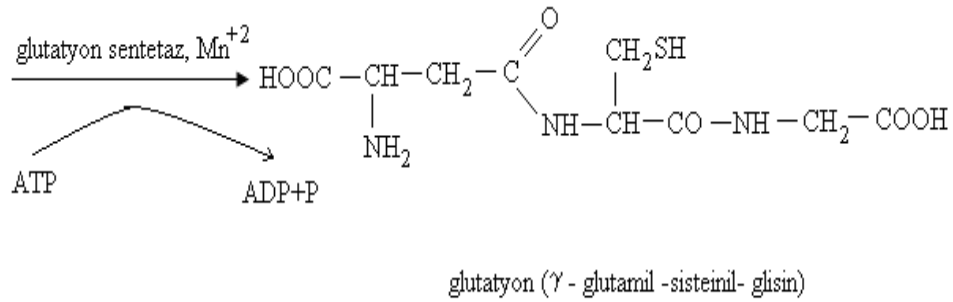
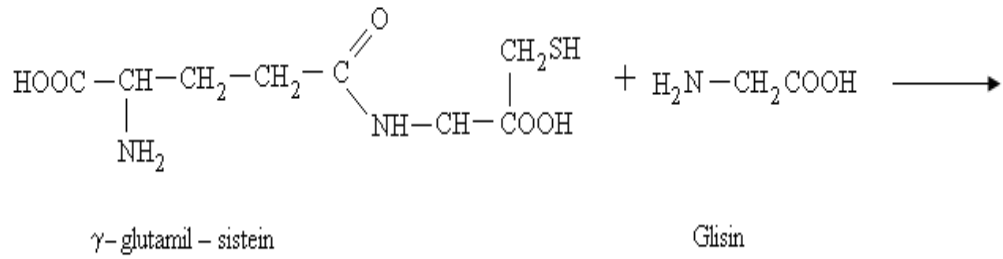
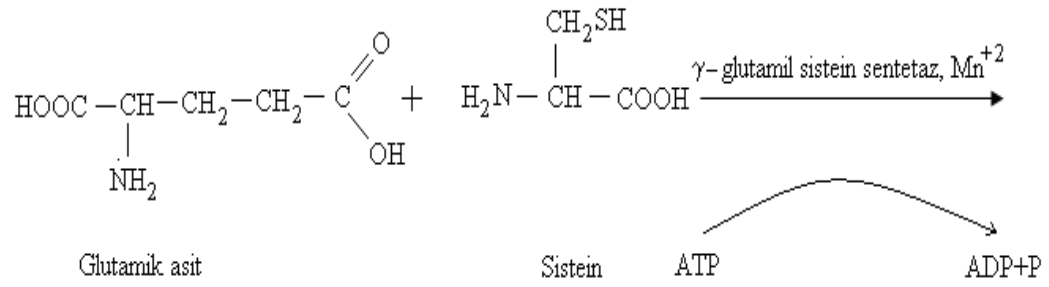
antioksidan olarak hücre savunmasında önemli rolü vardır [52, 58]. Glutasyon GSH-Px enziminin kofaktörüdür [59, 60]. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin kofaktörlüğünü yaparak, H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'ye çevirme tepkimesini metabolize eder [54, 55, 61-63]. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücrel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır [59-61]. İndirgenmiş glutasyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli stres modellerinin reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir [64, 65]. Glutasyon, hücrel işlevler için gerekli olup; beyin, kalp, bağışıklık sistemi hücreleri, böbrekler, gözler, karaciğer, akciğer ve deri dokularını oksidatif hasara karşı korur. Yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır. Glutasyonun en zengin kaynağı ise soğan ve sarımsaktır [66]. Glutasyon bitkiler tarafından oksijen alınmasında önemli rol oynamaktadır [67].

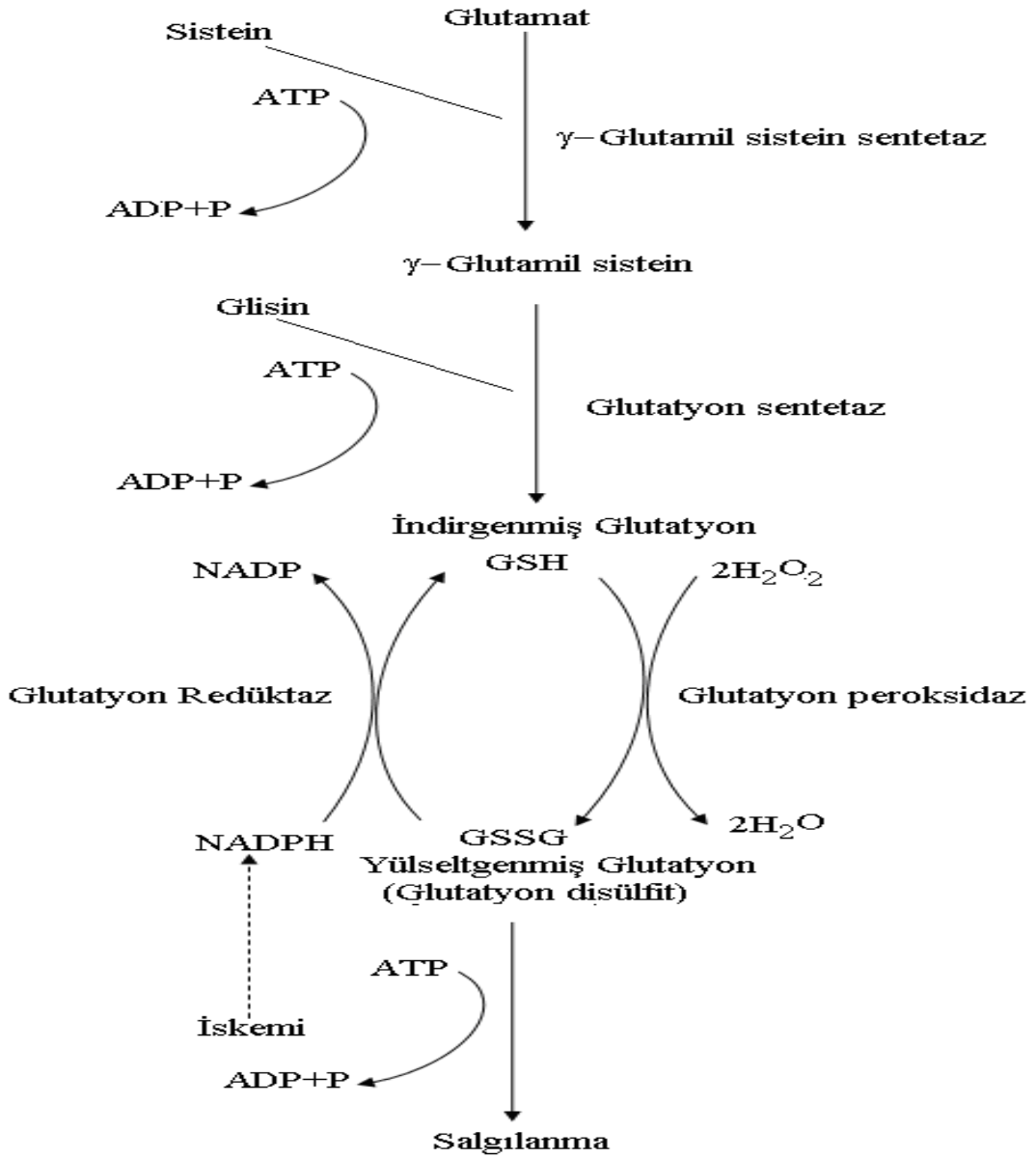
ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. İn vivo ve invitro yapılan deneylerde, endojen GSH'ın çeşitli hasarlarda mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir mediatör olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Diğer yandan stres ülserine bağlı iskeminin, hasara karşı savunmada önemli bir faktör olan mukozal enerji metabolizmasını azalttığı da gösterilmiştir [68, 69].

2.6. Glutasyon Sentezi ve Döngüsü

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir (Şekil 2.1). Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör (ana maddeyi oluşturan öncü madde) amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutasyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nın hidrolizi gerekir [70, 71] (Şekil 2.2). GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir [54, 55, 63].



Şekil 2.1. Glutasyonun sentezi



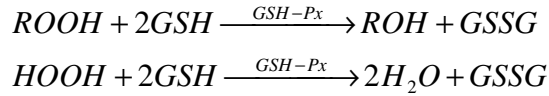
Şekil 2.2. Glutatyon döngüsü

Oksidatif stres sonucunda artan Reactive oxygen substance (ROS) oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyonun indirgenmiş formunun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. GSH-Px'ın katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'ın enzim aktivitesi için esas olduğu açıktır. Okdidasyon sonucunda oluşan GSSG (Glutatyon disülfid) ise glutatyon radüktaz isimli enzim aracılığıyla ile geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olmaktadır [65, 70].

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır [65, 71]. Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyonlaşarak kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir [65, 72]. Bu son olaya bağlı hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile bertaraf edildiği bildirilmiştir [73]. Diğer taraftan gastrik mukozada glikojen depolarının az olduğu ve devamlı glikoz ihtiyacının karşılanması gerektiği bilinmektedir [74].

2.7. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hücre içi bir enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir ve vücutta doğal olarak bulunan bir antioksidandır (GSH-Px); iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltgerken hidroperoksitleri ve H₂O₂'yi indirger [75-78].



GSH-Px enzimi, karaciğer, böbrek eritrositler, damar endoteli ve gözün lens metabolizmasında büyük önem taşır [79]. GSH-Px peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek; eritrosit, zar lipidleri, hücre zarı sellüler ve subsellüler membranların oksidatif etkisinden korunmasını sağlar [80]. GSH-Px selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekli mevcuttur [81]. Selenyum bağımlı enzim hem H₂O₂ hem de hidroperoksitlere etki eder. Selenyum bağlı GSH-Px, glutasyon ile hidrojen peroksidin redüksiyonunu katalizler ve hücre membranının oksijen radikalleri tarafından hasara uğratılmasını engeller. Hem lipooksijenaz hem de siklooksijenaj yollarında ilk başlangıç olarak gerekli olan eser peroksit ürünlerinin temizlenmesini sağlayarak da etki gösterebilmektedir [69, 82]. Diyetteki selenyum desteği enzim aktivitesini modüle eder. Flatt ve ark. [83], teofilin, β₂-agonist, sodyum kromoglikat ve kortikosteroidlerden oluşan ilaçların değişik kombinasyonlarını kullanan 55 astımlı hastada yaptıkları çalışmada, tam kan ve plazma GSH-Px ve selenyum düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğunu, bu düşüklüğün astım şiddeti ile korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Selenyuma bağımlı olmayan ise H_2O_2 yıkımını katalize etmez, ancak lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır. GSH-Px karaciğer, böbrek korteksi ve iskelet kasında bulunur. GSH-Px enziminin katalize ettiği reaksiyon ile membran lipidlerinin ve hemoglobinin peroksitler tarafından oksidasyonu önlenir. Bu reaksiyon hemoglobinin methemoglobine oksidasyon oranını azaltarak eritrositin ömrünü uzatır [84]. Radikal hasar karşısında organizmayı daha etkili korumak amacı ile antioksidan enzimlerin kooperativite gösterdiği bilinmektedir [85]. SOD ve GSH-Px'in sinerjistik etki gösterdikleri ve C ve E vitaminlerinin de antioksidan enzim sistemleri ile sinerjistik çalıştıkları bildirilmiştir [86].

2.8. Serbest Radikaller ve Toksik Etkileri

Serbest radikal, orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan herhangi bir bileşiktir. Bu radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif ve toksik bileşiklerdir. Serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını eşleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışmaktadırlar [87].

Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler oksidan veya "prooksidan" olarak tanımlanır. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamına "prooksidan veya oksidan madde" olarak tanımlanmıştır [88, 89]. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir [90, 91].

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller, radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksiste ortaya çıkmaz. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır. Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkar. Özellikle eklem ve beyin omurilik sıvılarında antioksidan savunmanın yetersiz olması nedeniyle, bu bölgelerde serbest radikallere bağlı yıkımın daha fazla olduğu gözlenmektedir. Oksijenli solunum yapan canlılarda, serbest oksijen radikallerinin oluşması kaçınılmazdır. Bu oksijen kaynaklı radikaller; süperoksit

radikali, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikalleridir. Bu radikaller özellikle hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Bilhassa hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri bunlar için çok iyi bir hedeftir. Reaktif madde miktarındaki artışların hücresel iç dengenin (homeostazi) olumsuz etkilemesini vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve “antioksidan” olarak isimlendirilen bazı faktörler önleyebilir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır [92, 93].

Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Lipit peroksitler, indirgenmiş glutatyona (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim olan GSH-Px tarafından lipid alkollere çevrilerek inaktive edilir. Ayrıca süperoksit gruplarıyla fazla miktarda lipit peroksitlerin şekillendirilmesi ve gerek selenyum eksikliği ve gerekse ortamdaki GSH'nın tükenmesine neden olabilen dietilmaleat, dioksin gibi maddelerin bulunması, lipit hidroperoksitlerinden serbest lipit grupların oluşmasına yol açar. Serbest lipit grupları da, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipit hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölge olup, serbest radikaller santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarı meydana getirirler. Serbest oksijen türleri, toksisite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler homeostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı meydana getirirler [94, 95].

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre

membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın azot bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [96, 97].

Oksidatif stres; kalıtsal bozukluklar, hasarlar, ağır fiziksel aktiviteler, çevredeki fiziksel ve kimyasal (ozon, sigara dumanı ve güneş ışığı) etkilere maruz kalma ile dengesiz beslenme gibi çeşitli şartların artmasıyla meydana gelir. Strese yol açan bu faktörler ise serbest oksijen radikallerini (SOR) büyük ölçüde arttırmaktadır [98]. Son zamanlarda biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin birçok hastalıkla ilişkili olduğunun tespit edilmesi özellikle antioksidanlara karşı olan ilgiyi arttırmıştır [99].

Sonuç olarak; organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanım sayesinde, fizyolojik aktivitenin doğal sonucu olarak serbest radikal nitelikli biyokimyasal ürünleri “oksidan-antioksidan denge” olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmayı başarır. Tehlikeli olan durum, radikallerin varlığından daha çok oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin oksidanlar lehine bozulmasıdır [88, 98, 100].

2.9. Antioksidanlar ve Metabolizma için Önemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlara kısaca “antioksidanlar” denilmiştir. Antioksidanlar bu amaçla reaktif maddeleri ve reaksiyonlarını bir dengede tutabilmek üzere sürekli aktivite gösterirler [101]. Organizmada süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenirken, antioksidan olarak bilinen bileşikler de oksijen radikallerinin yok edilmesini sağlarlar. Bu kimyasal bileşikler arasında A, E, C vitaminleri ve selenyum önemli bir rol oynamaktadır [102].

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak, ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin A, E ve C, β -karoten, metallothionein, poliaminler, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q, ürat, ubiquinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenosil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, GSH, GSH-Px, katalaz, süperoksit dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrik-oksit sentaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz bu gruba girer. Diyetle alınan α - tokoferol lipid peroksidasyona karşı korur ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir [103]. Bunlara karşın Krajcovicova ve ark. [104], vitamin C ve E'nin artmış lipid

peroksidasyon ve serbest radikallere karşı savunmada yetersiz kaldığını belirtmişlerdir. İnsanlarda serebrovasküler hastalıklarda kullanım alanı bulan idebenonun, serbest radikal yok edicisi gibi etki gösterdiği ve lipit peroksidasyona karşı mitokondrial membranı koruduğu belirlenmiştir. Yine anestezi dozlarında kullanılan propofolun, hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu sınırlandırabildiği veya durdurabildiği gösterilmiştir [105].

Amaç: Benzofuran ve benzimidazol halkası içeren bileşikler birçok ilacın bileşiminde bulunmaktadır. Bu nedenle, sentezlenmiş ve karakterize edilmiş orijinal 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) ratların antioksidan vitaminleri (A, E ve C), GSH ve GSSG ile lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA)'in düzeylerine ayrıca GSH-Px enzim aktivitesine etkilerini belirlemek ve bu parametreler arasındaki ilişkileri araştırmak amaçlanmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali

Araştırmalarımızda Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen 14-15 haftalık ortalama 250 gr ağırlığında erişkin Wistar cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deneylerimizde kullandığımız hayvanlara FÜDAM 'ın optimize ettiği şartlar uygulanmış olup, 12 saat ışık, 12 saat karanlık olarak ışık düzenlemesi ile ortamın ısısı oda şartlarında sabit tutulmuştur (24-26 °C). Elazığ Yem Fabrikasından hayvanların yemi (*ad libitum*), Elazığ şehir şebekesinden de suları sağlandı.

3.2. Grupların Oluşturulması

Fırat Üniveristesi etik kurulunda alınan 2007/22 nolu raporda belirtildiği gibi bu araştırmada kontrol grubu, 1. uygulama, 2. uygulama ve 3. uygulama grubu olmak üzere 4 grup oluşturuldu ve her grupta 10 rat olmak üzere toplam 40 rat kullanıldı. Uygulama gruplarında kullanılan **2-(1H-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE)** tamamen orijinal sentezlenmiş bir kimyasal olduğu için rat ölümlerinin olabileceği düşünülerek gruplardaki rat sayısı biraz yüksek (10 rat) tutuldu. Uygulamalar aynı saatte yapıldı. Uygulamalarda kullanılan ratlarda uygulama tamamlanıncaya kadar ölüm gözlenmedi.

Kontrol grubuna; Kontrol grubu dışındaki gruplara enjekte edilen **2-(1H-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE)**, Dimetilsülfoksit (DMSO) çözüldüğü için; kontrol grubuna 5.2 ml DMSO alınarak alınarak toplam hacmi 52 ml olacak şekilde üzerine mısırözü yağı ilave edilerek %10 DMSO çözeltisi hazırlanmış oldu. Daha sonra kontrol grubundaki her bir rata bu %10 DMSO ihtiva eden yağ karışımında 0.5 ml subkutan (deri altına) olarak enjekte edildi.

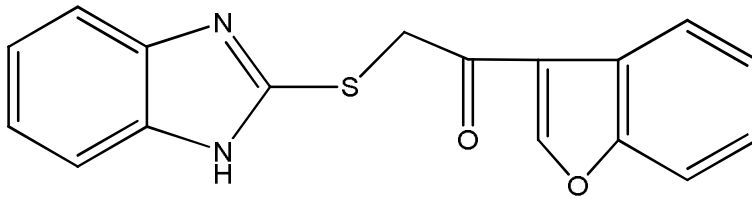
1. Uygulama gruba 10 mg/kg doz uygulaması ; Bunun için 249.6 mg **2-(1H-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE)** tartılarak, 5.2 ml DMSO da iyice çözüldü ve daha sonra toplam hacmi 52 ml olacak şekilde üzerine mısırözü yağı ilave edildi. Daha sonra bu çözeltiden her bir rata 0.5 ml enjekte edildi. Bu şekilde ortalama ağırlığı 240 gr olarak kabul edilen her bir rata %10 DMSO ve 2.4 mg BIBE içeren (10 mg BIBE /kg rat) karışım enjekte edildi.

2. Uygulama gruba 20 mg/kg doz uygulaması ; Bunun için 499.2 mg BIBE tartılarak, 5.2 ml DMSO da iyice çözüldü ve daha sonra toplam hacmi 52 ml olacak şekilde üzerine mısırözü yağı ilave edildi. Daha sonra bu çözeltiden her bir rata 0.5 ml enjekte edildi. Bu şekilde ortalama

ağırlığı 240 gr olarak kabul edilen her bir rata %10 DMSO ve 4.8 mg BIBE içeren (20 mg BIBE /kg rat) karışım enjekte edildi.

3. Uygulama gruba 30 mg/kg doz uygulaması ; Bunun için 748.8 mg BIBE tartılarak, 5.2 ml DMSO da iyice çözüldü ve daha sonra toplam hacmi 52 ml olacak şekilde üzerine mısırözü yağı ilave edildi. Daha sonra bu çözeltiden her bir rata 0.5 ml enjekte edildi. Bu şekilde ortalama ağırlığı 240 gr olarak kabul edilen her bir rata %10 DMSO ve 7.2 mg BIBE içeren (30 mg BIBE/kg rat) karışım enjekte edildi. Her rata toplam 10 enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyon uygulamaları mümkün olduğunca aynı saate gün aşırı deri altına uygulandı.

Uygulamalarda kullanılan, şekil 3.1'deki bileşik **2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE)**'nun literatürde olmayıp ilk defa bölümümüz laboratuvarlarında Süleyman Servi ve arkadaşları tarafından sentezlenerek, karakterize edilmiştir.



Şekil 3.1. 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE)

3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Uygulamalar tamamlandıktan sonra (21. günün sonunda) ratlar eter ile hafif bayıltılıp başları giyotin ile kesilirken boyun bölgesinden akan kanlar huni yardımı ile tüplere alındı. Her hayvandan alınan kanlardan bir kısmı EDTA'lı tüplere diğer kısmı ise normal plastik tüplere aktarıldı. EDTA'lı tüplere alınan kanlardan GSH-Px aktivitesi ile GSH ve GSSG miktarları belirlendi. Normal tüplere alınan kanlar ise santrifüjlenerek serumları ayrıldı ve bu serumlardan da vitaminler (A, E ve C) ile MDA miktarları tayin edildi. Yine aynı ratlardan MDA, vitamin C, vitamin A ve vitamin E çalışmak üzere karaciğer örnekleri alındı. Serumlar polietilen tüplerde, karaciğer örnekleri ise alüminyum folyo ile sarılarak analizleninceye kadar (en fazla üç gün) - 20°C'da muhafaza edildi. GSH-Px aktivitesinde spektrofotometre, diğer tüm analizlerde ise HPLC kullanıldı.

3.4. Doku Örneklerinin (Karaciğer) Hazırlanması

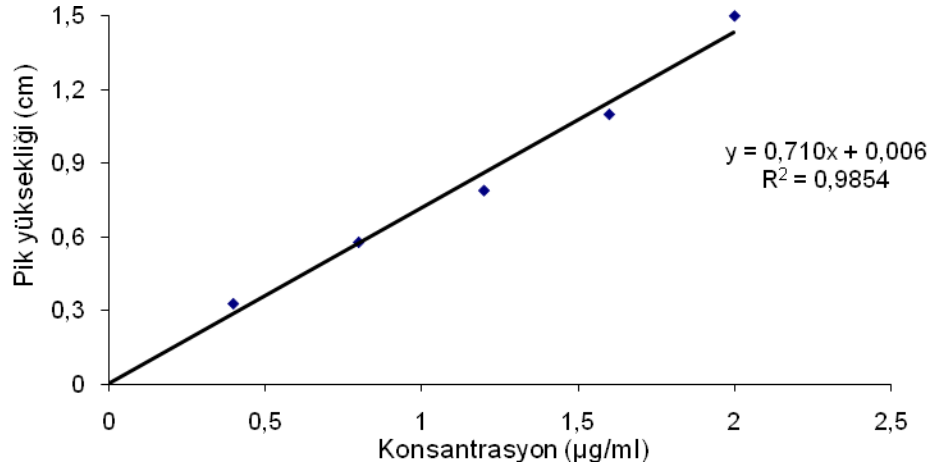
Karaciğer örnekleri homojenizatörde homojen hale getirildikten sonra 0.2 g tartım alınarak serum örneğine uygulanan işlemlerin aynısı doku örneklerine de uygulandı.

3.5. Metot

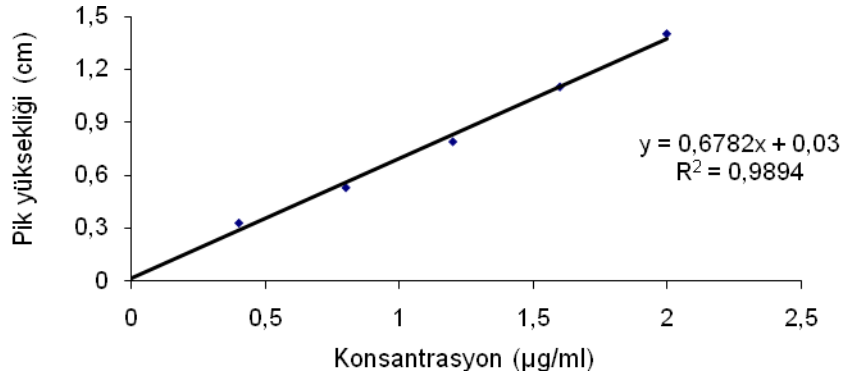
3.5.1. A ve E Vitamini Tayini

Derin dondurucudan alınan serum ve karaciğer örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra, serum örneğinden 0.3 ml, karaciğer dokusu ise homojenizatörde iyice homojen hale getirildikten sonra her birinden 0.2 gram tartılarak plastik tüpe alındı. Her bir tüp üzerine 2 ml etanol ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Süzülerek ayrılan süzüntü üzerine 0.3 ml % 95 n-hegzan ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek üstteki hegzan fazı ayrıldı. Her bir örnek için hegzanla ekstraksiyon işlemi iki defa tekrarlandı. Böylece, serum içindeki A ve E vitamininin tamamı hegzan fazına alındı. Ayrılan hegzan fazı azot gazı altında kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler tekrar 0.15 ml % 99.5 metanolde çözümlenerek analize hazır hale getirildi. Bu metanol çözeltisinden 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de Techsphere ODS-2 (5 µm partikül and 80 °A por büyüklüğü) kolon (250x4.6 ID)'unda hareketli faz olarak metanol: asetonitril: kloroform (47: 42: 11) karışımı kullanıldı. Vitamin A (retinol) 326, vitamin E (α-tokoferol) ise 296 nm'lik dalga boylarında tayin edildi [106, 107].

Örneklerdeki A ve E vitamin miktarlarını belirlemek için her birinin ayrı ayrı değişik konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanarak bu çözeltilerin pik yükseklikleri belirlendi. Daha sonra belirlenen bu pik yüksekliklerine karşı derişim (konsantrasyon) grafiğe alınarak çalışma grafiği çizildi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Her çalışmada yeni bir çalışma grafiği çizilerek o çalışmanın vitamin verileri o günkü çalışma grafiğinin doğru denkleminde hesaplandı. Doğru denkleminde y yerine örneğin pik yüksekliği yazılarak x bulundu ve eğer seyreltme yapılmışsa seyreltme faktörü ile çarpıldı.



Şekil 3.2. Vitamin A'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi.

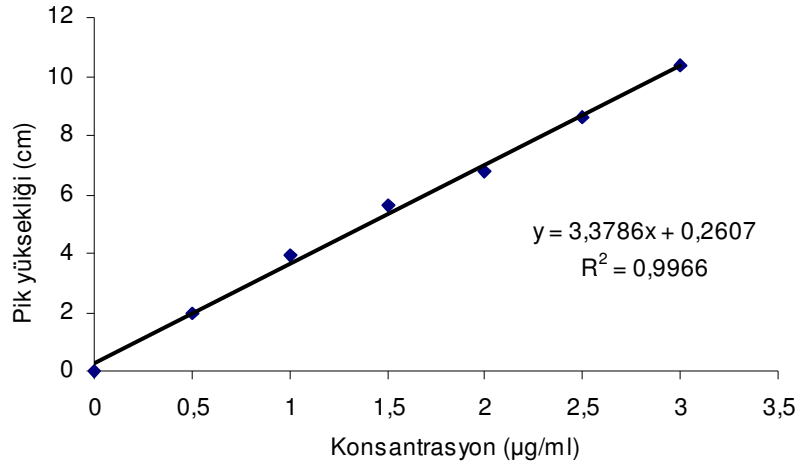


Şekil 3.3. Vitamin E'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.

3.5.2. C Vitamini Tayin

Serum örneklerinden 0.3 ml alınarak üzerlerine 0.5 M HClO₄'den 0.3 ml, homojenize hale getirilmiş karaciğer örneklerinden ise 0,25 gram alınarak her biri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.5 ml ilave edilerek 2 dk vortekslendi ve proteinler çöktürüldü [108]. Sonra tüm örnekler ultrasonik su banyosunda 50 °C'de 5 dk bekletilerek iyice parçalanma gerçekleştirildi. Daha sonra serum örneklerinin toplam hacmi saf su ile 2 ml'ye, karaciğer örneklerinin hacmi ise saf su ile 5 ml'ye tamamlanarak, 4500 rpm 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen çözeltiden çökelek ve süzüntünün ayrılması sağlandı. Daha sonra üstteki süzüntüden 20 µL alınarak HPLC'de Supelcosil LC-18-DB kolonunda (3 µm partikül büyüklüğü 250 x 3.9 ID) mobil faz : 3.7 mM KH₂PO₄ (pH: 4, H₃PO₄ ile) tamponu 1ml dk⁻¹ akış hızında, 245 nm dalgaboyu kullanılarak C vitamini tayin edildi [109].

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan stok C vitamini çözeltilerinin pik yükseklikleri ölçülerek çalışma grafiği çizildi (Şekil 3.4). Çalışma grafiğinin doğru denklemi yardımıyla C vitamini miktarları belirlendi. Serum örnekleri 5 kat seyreltildiği için seyrelme katsayısı 5 kabul edildi. Şekil 3.4’ de görüleceği üzere konsantrasyon-pik yüksekliği çalışma grafiğinde elde edilen doğrusallık kabul edilebilir limitler içerisinde.

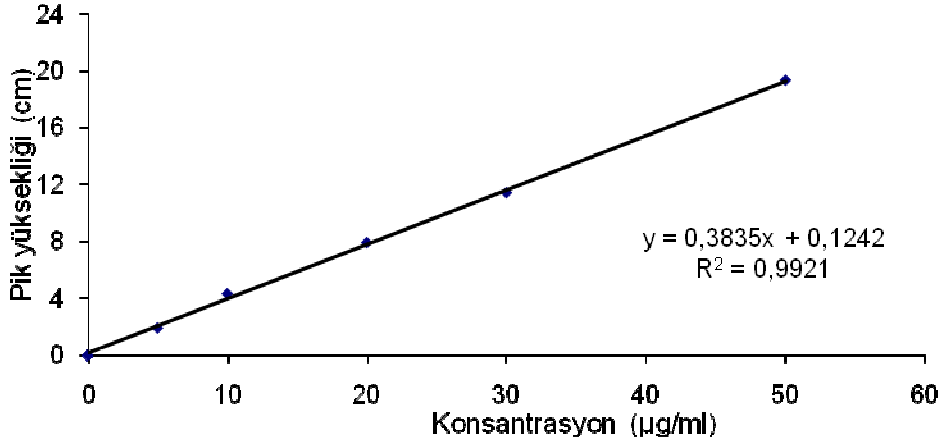


Şekil 3.4. Vitamin C'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.

3.5.3. MDA Tayini

Oda sıcaklığına kadar ısınmış örneklerden serumdan 0.30 ml, homojenize hale getirilmiş karaciğer örneklerinden ise 0.25 g tartımlar plastik tüplere alındı. Serum örnekleri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.3 ml, karaciğer örneklerinin her biri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.5 ml ilave edilerek 2 dakika boyunca vortekslendi ve proteinler çöktürüldü. Sonra tüm örnekler ultrasonik su banyosunda 50 °C'de 5 dk bekletilerek iyice parçalanma gerçekleştirildi. Daha sonra serum örneklerinin toplam hacmi saf su ile 2 ml'ye, karaciğer örneklerinin hacmi ise saf su ile 5 ml'ye tamamlanarak, 4500 rpm 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen çözeltilerden çökelek ve süzüntünün ayrılması sağlandı. Daha sonra üstteki süzüntüden 20 µL alınarak HPLC'de Supelcosil LC-18-DB kolonunda (3 µm partikül büyüklüğü ve 250 x 3.9 ID) mobil fazı 30 mmol KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%65-%35, H₃PO₄ ile pH=4) olan ve akış hızı 1.3 ml/ dk'ya ayarlanarak 254 nm HPLC'ye enjekte edildi [110]. MDA standardı olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropanın (TEP) çözeltisi kullanıldı. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan MDA çözeltilerinin pik yükseklikleri ölçülerek pik yüksekliğine karşı gelen konsantrasyon

değerlerinin çalışma grafiği çizildi (Şekil 3.5). Çalışma grafiğinin doğru denklemi yardımıyla MDA miktarları belirlendi.



Şekil 3.5. MDA'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi

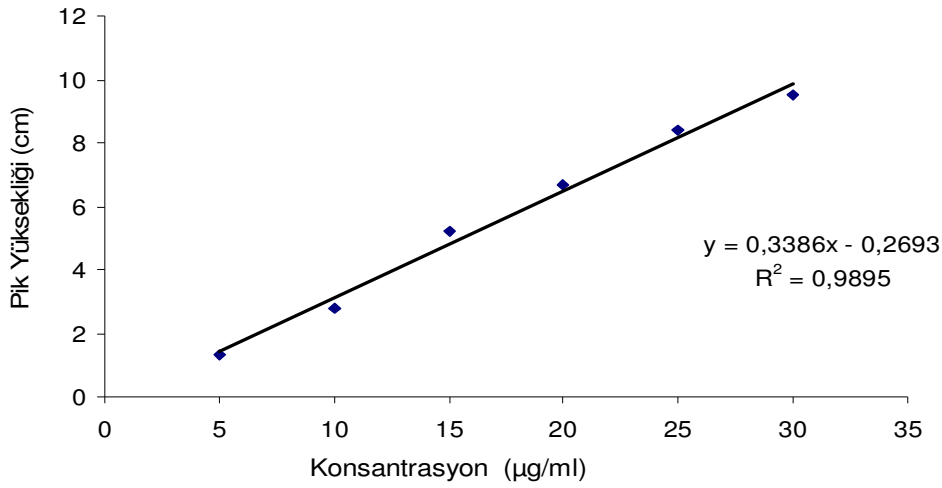
3.5.4. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyonun Tayini

GSH ve GSSH miktarlarının belirlenmesi için EDTA'lı tüplere alınarak derin dondurucudan bekletilen (yaklaşık 2 gün) 1 ml kan örnekleri soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar ısınması için bekletildi. Bu kan örneklerinden 0.5 ml alınıp her birinin üzerine 0.75 ml 0.5 M HClO₄ ilave edilerek vortekslendi. Vortekslenen bu örneklerle 2.75 ml saf su ilave edilerek 4500 rpm 10 dk. santrifüjlenip proteinler çöktürüldü. Santrifüjlenen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µl alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de SGE Walkosil 11 5C18 RS kolonu ve mobil faz olarak da çözücü olarak 0.1% H₃PO₄ kullanılarak hazırlanmış olan 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldı. Mobil fazın akış hızı:1.3 ml/dk ayarlanarak 215 nm'de 5.3 dk'da indirgenmiş ve 22.0 dk'da ise yükseltgenmiş glutasyon tayin edildi [111].

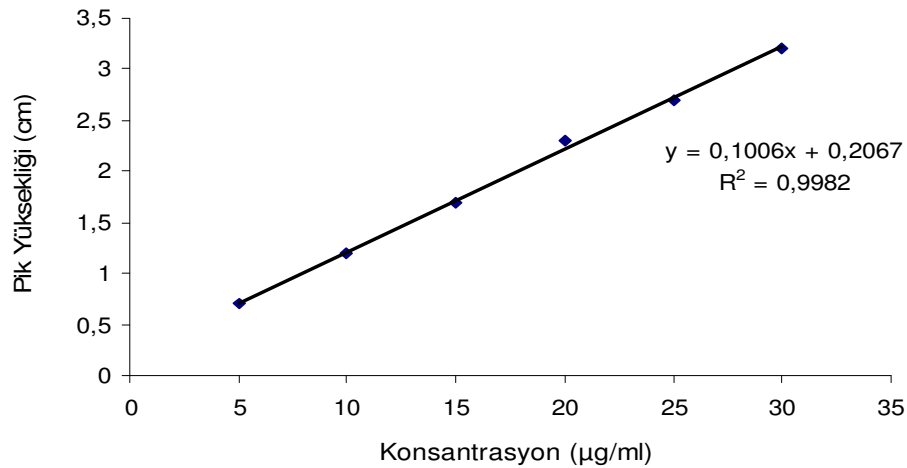
Standart indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon çözeltilerinin hazırlanması: 5 ml'lik balon jöjeye 10 mg indirgenmiş glutasyon ve üzerine de 1ml 0.5 M HClO₄ ilave edilerek iyice çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 5 ml'ye tamamlanarak, 2000 µg/ml'lik indirgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlandı. Bu 2000 µg/ml'lik stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/ml'lik indirgenmiş glutasyon çözeltileri hazırlandı. Standart stok yükseltgenmiş glutasyon çözeltileri de indirgenmiş glutasyon çözeltilerinin hazırlandığı şekilde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi ve bu pik

yüksekliklerine karşı konsantrasyonlar grafiğe alınarak, çalışma grafikleri çizilip, doğru denklemleri oluşturuldu (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).

Her çalışmada yeni bir çalışma grafiği çizilerek o çalışmanın indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon verileri o günkü çalışma grafiğinin doğru denkleminde hesaplandı. Doğru denkleminde y yerine örneğin pik yüksekliği yazılarak x bulundu ve yapılan seyreltme göz önünde bulundurularak seyreltme faktörüyle çarpıldı.



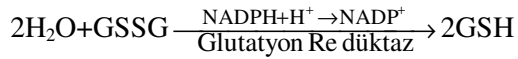
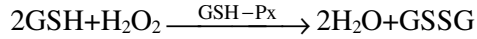
Şekil 3.6. İndirgenmiş Glutatyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi



Şekil 3.7. Yükseltgenmiş Glutatyonun Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi

3.5.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini

Prensip: GSH-Px, hidrojen peroksit (H-O-O-H) varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. H₂O₂'in bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz (GSH-Red) ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir.



GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür.

3.5.5.1. Hemolizat Hazırlanması

EDTA'lı tüplere alınan 1 ml'lik kan örnekleri 3 defa soğuk % 0.9'luk NaCl ile yıkandı. Oluşan hücre süspansiyonundan 0.2 ml alınıp üzerine 0.8 ml soğuk saf su ilavesiyle lizat elde edildi ve 15 dakika derin dondurucuda eritrositlerin tamamen parçalanması için bekletildi. Bu lizat diğer peroksidazların pozitif inhibisyonunu önlemek için eşit miktarda çift güçlü drabkin çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımın 0.1 ml'sine içerisinde 0.005 M EDTA bulunan pH : 7'de 0.05 M fosfat tamponundan 2.58 ml eklendi ve böylece enzim kaynağı hazırlanmış oldu [112].

Deneyde Kullanılan Reaktifler

GSH (150 mM) = 50 mg GSH 1 ml tamponda çözülür

NaN₃ (1 M) = 65 mg sodyum azid 1 ml tamponda çözülür.

NADPH (3 mM) = 10 mg NADPH 2 ml tamponda çözülür.

GSH - Redüktaz = Ticari preparatdan (U/mL, spesifik aktivite) direkt olarak seyreltme yapılmaksızın kullanıldı.

H₂O₂ (50 mM) = 15 µl H₂O₂ alınıp hacim 5 ml'ye tamponla tamamlandı.

Tampon (pH : 7.5), 50 mM fosfat tamponu = 600 ml A + 400 ml B + 2.08 gr NaEDTA ile hazırlandı.

A : Na₂HPO₄, 50 mM, 7.1 gr/L B : KH₂PO₄, 50 mM, 6.8 gr/L

Deneyin Yapılışı

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu (ml)	2.66	2.68
Redükte GSH (ml)	0.10	0.10
NADPH (ml)	0.10	0.10
GSH - Redüktaz (ml)	0.01	0.01
NaN ₃ (ml)	0.01	0.01
Numune (eritrosit) (ml)	0.02	-

Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında (25°C) 30 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.1 ml H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede 5 dakika süre ile takip edildi. İlk absorbens - son absorbens değeri alınarak 5'e bölündü ($\Delta A / \text{dakika}$).

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$E = 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} = \text{NADH ve NADPH için molar absorplama katsayısı}$

$V_T = \text{Toplam Hacim (ml)}$

$V_n = \text{Toplam hacimdeki numune hacmi}$

$l = \text{Küvet çapı (1 cm)}$

$\Delta A/t = \text{Dakikadaki absorbens}$

10^6 = Molü mikromole dönüştürme sabiti

$$U(\mu mol/dakika) = \frac{(\Delta A/t) \times V_T \times 10^6}{E \times V_n \times l} = \frac{(\Delta A/5) \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times l} = \frac{(\Delta A/5) \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

He λios α UV-Visilol marka spektrofotometre ile okumalar yapıldı. Hemoglobin, Drabkin ile ölçülerek GSH-Px enzim aktivitesi U / gr Hb olarak belirlendi [113].

3.5.5.2. Hemoglobin Tayini

Hemoglobin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanür ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okundu [114].

Ayırıcılar:

1. Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN + 200 mg $K_3 Fe(CN)_6$ + 1 g $NaHCO_3$ alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanan çözelti renkli şişede ve oda ısısında 1 yıl süreyle saklanabilir.

2. Hemoglobin Satandartı: 18g/dl

İşlem:

	Kör	Standart	Örnek
Drabkin Çözeltisi(ml)	5.0	5.0	5.0
Hb standartı (ml)	-	0.02	-
Hemolizat (ml)	-	-	0.02
Distile su (ml)	0.02	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm'de köre karşı absorbansları okundu [115].

Hesaplama:

18gr/dl Hb=0.49 absorbans değerini verir.

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek absorbans}}{S \text{ standart absorbans}} \times \text{Standart Konsantrasyonu eşitliğinden}$$

$$\text{Standart konsantrasyonu} = 18\text{g/dl}$$

$$\text{Standart absorbansı} = 0.49$$

$$\text{Buradan; Faktör} = \frac{S \text{ standart konsantrasyonu}}{S \text{ standart absorbansı}} = \frac{18}{0.49} = 36.73$$

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \text{Örnek absorbansı} \times 36.73$$

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadaki tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 bilgisayar programı ile yapıldı. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Independent-Samples T-testi ve gruplar arası karşılaştırmalarda ise One-Way Anova testi (Post Hoc Tests (Tukey) kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

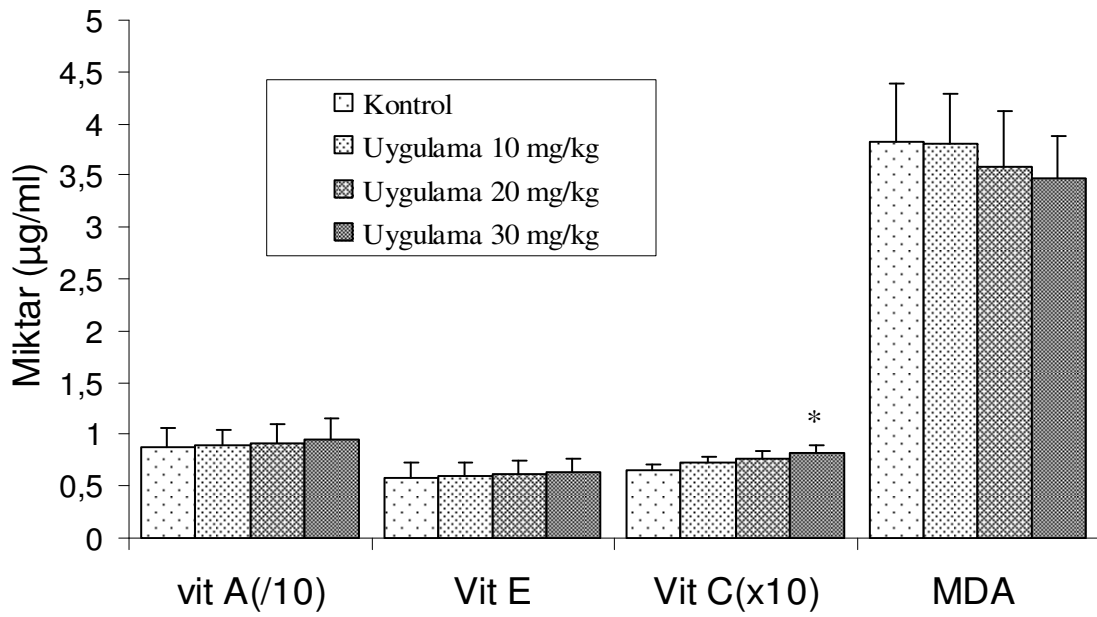
4. BULGULAR

Tablo 1 ve Şekil 4.1.'deki sütun grafiğine göre BIBE uygulanan ratların, doz artışına paralel olarak kan serumundaki A ve E vitamini miktarlarındaki artış ($p>0.05$) anlamsız iken, C vitamini miktarlarında anlamlı artma ($p<0.05$) olduğu, MDA miktarında ise uygulanan doz miktarına paralel olarak kontrol grubuna göre anlamsız azalma olduğu ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Tablo 1. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon'nun (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait serum vitamin A, E, C, MDA ile kan GSH, GSSG miktarları ile GSH/GSSG oranı ve eritrosit GSH-Px aktivitesinin değerleri.

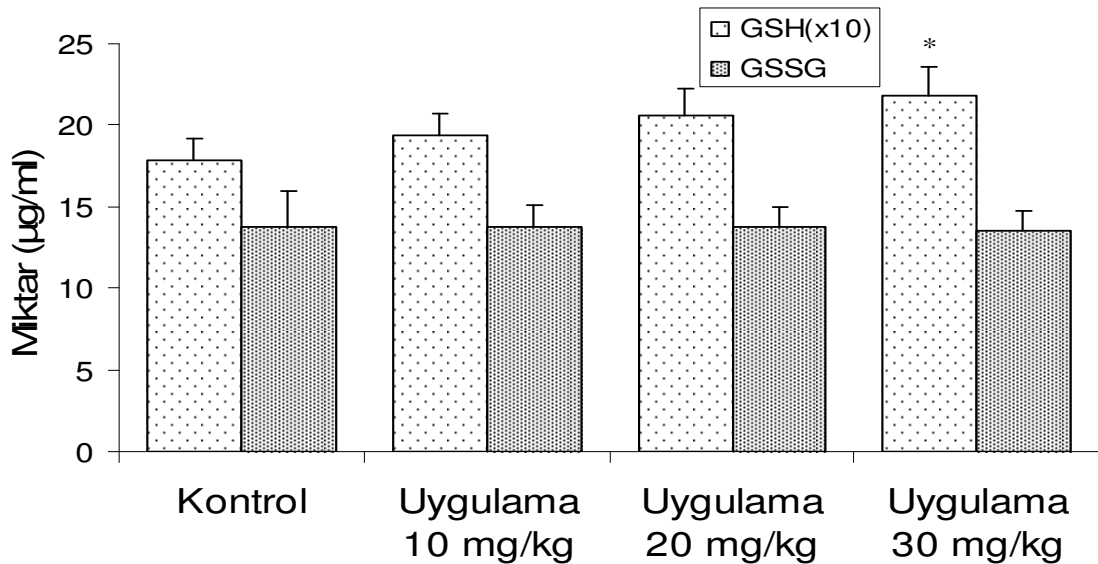
	Kontrol (n=10)	Uyg. 10 mg/kg (n=10)	Uyg. 20 mg/kg (n=10)	Uyg. 30 mg/kg (n=10)
Vitamin A (µg/ml)	0.090 ± 0.018 ^a	0.090 ± 0.015 ^a	0.092 ± 0.017 ^a	0.096 ± 0.019 ^a
Vitamin E (µg/ml)	0.57 ± 0.15 ^a	0.59 ± 0.14 ^a	0.62 ± 0.12 ^a	0.63 ± 0.14 ^a
Vitamin C (µg/ml)	6.55 ± 0.54 ^a	7.24 ± 0.66 ^{a,b}	7.71 ± 0.70 ^{a,b}	8.23 ± 0.77 ^b
MDA (µg/ml)	3.83 ± 0.56 ^a	3.80 ± 0.50 ^a	3.59 ± 0.54 ^a	3.47 ± 0.41 ^a
GSH (µg/ml)	178.40±12.99 ^a	193.40±14.06 ^{a,b}	206.00 ±16.36 ^{a,b}	217.80 ± 17.78 ^b
GSSG (µg/ml)	13.82 ± 2.11 ^a	13.73 ± 1.39 ^a	13.77 ± 1.26 ^a	13.50 ± 1.22 ^a
GSH / GSSG	13.08 ± 1.54 ^a	14.21 ± 1.80 ^{a,b}	15.01 ± 1.24 ^{a,b}	16.21 ± 1.52 ^b
GSH-Px (U/g Hb)	8.58 ± 1.56 ^a	8.50 ± 1.41 ^a	8.36 ± 1.50 ^a	8.04 ± 1.61 ^a

Her bir parametredeki farklılıklar aynı satırda değişik harflerle gösterilmiştir (a ve b gibi).



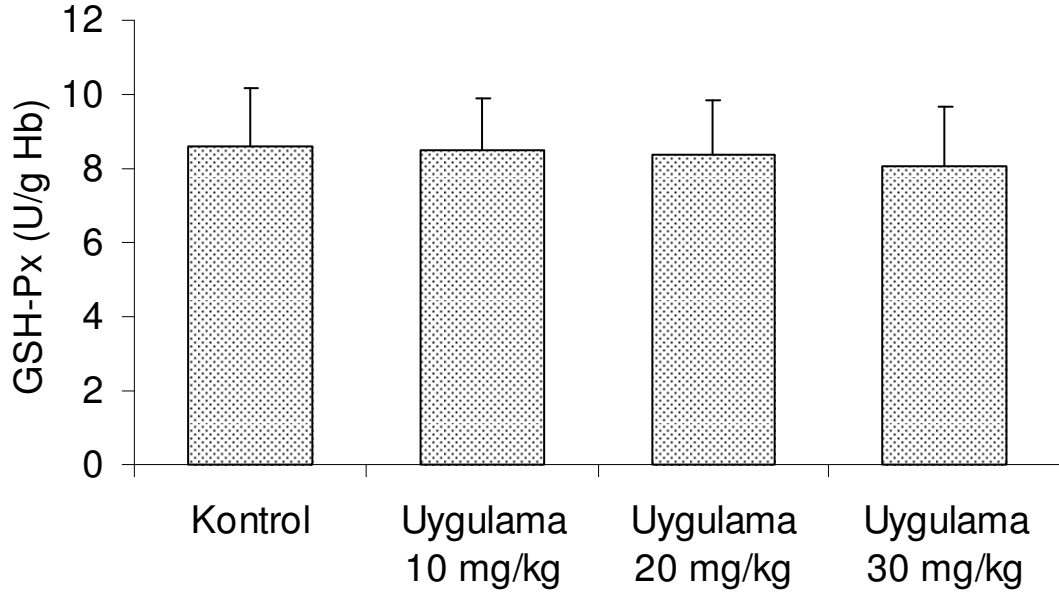
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait serum vitamin A. E. C ile MDA miktarlarının sütun grafiği [Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında $p < 0.05$ için (*) kullanıldı]

Tablo 1 ve Şekil 4.2.'deki sütun grafiğine göre BIBE uygulanan ratların, doz artışına paralel olarak kanlarındaki GSH miktarının kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p < 0.05$) gösterdiği, GSSG miktarlarının ise kontrol grubuna göre anlamsız bir azalış ($p > 0.05$) gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait GSH ve GSSG miktarlarının sütun grafiği [Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında $p < 0.05$ için (*) kullanıldı]

Tablo 1 ve Şekil 4.3.'deki sütun grafiği'ne göre BIBE bileşiği verilen ratların GSH-Px miktarındaki azalmanın ($p>0.05$) uygulanan doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı görülmüştür.



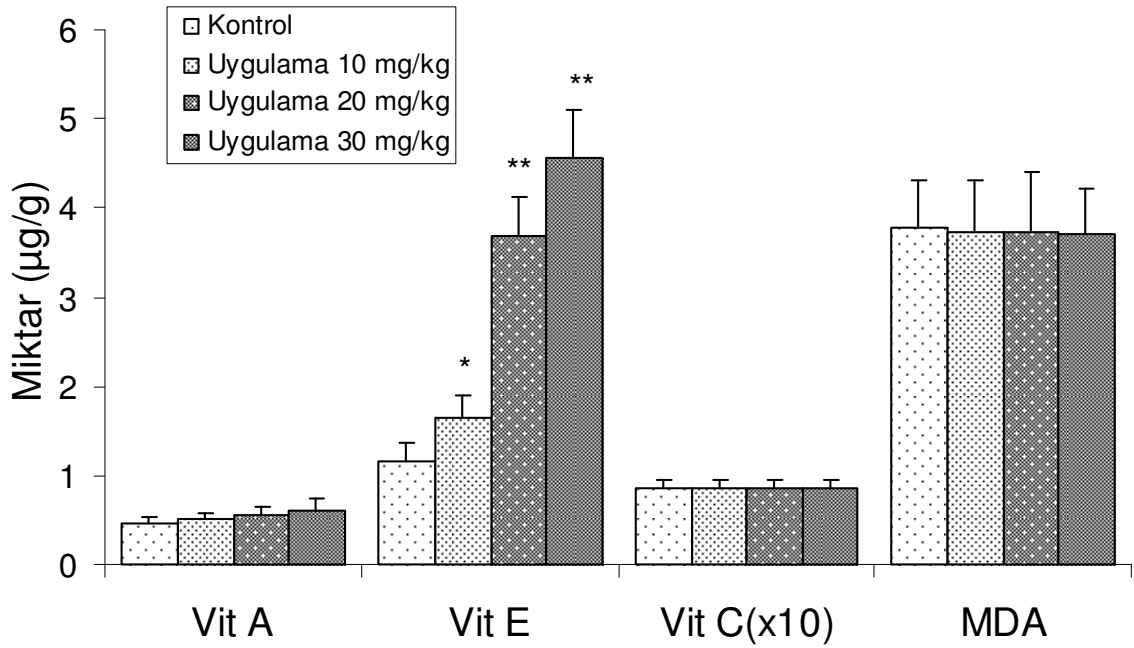
Şekil 4.3. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratların GSH-Px aktivitesinin sütun grafiği

Tablo 2 ve Şekil 4.4.'deki sütun grafiğine göre BIBE bileşiği verilen ratların karaciğer vitaminlerinde; uygulanan doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna göre A ve C vitaminlerinin miktarlarında anlamlı artış olmazken ($p>0.05$), E vitamini miktarlarında anlamlı artış ($p<0.05$), MDA miktarında uygulanan doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamsız azalma ($p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait karaciğer vitamin A, E, C ve MDA miktarları

	Kontrol (n=10)	Uyg. 10 mg/kg (n=10)	Uyg. 20 mg/kg (n=10)	Uyg. 30 mg/kg (n=10)
Vitamin A (µg/g)	0.46 ± 0.077 ^a	0.50 ± 0.082 ^a	0.550 ± 0.093 ^a	0.610 ± 0.12 ^a
Vitamin E (µg/g)	1.16 ± 0.21 ^a	1.64 ± 0.27 ^a	3.68 ± 0.45 ^b	4.56 ± 0.53 ^c
Vitamin C (µg/g)	8.63 ± 0.87 ^a	8.58 ± 0.89 ^a	8.62 ± 0.85 ^a	8.68 ± 0.76 ^a
MDA (µg/g)	3.78 ± 0.53 ^a	3.72 ± 0.59 ^a	3.73 ± 0.66 ^a	3.71 ± 0.50 ^a

Her bir parametredeki farklılıklar aynı satırda değişik harflerle gösterilmiştir (a, b ve c gibi).



Şekil 4.4. Kontrol grubu ve 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiyo)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE) üç farklı dozda uygulandığı ratlara ait karaciğer vitamin A, E, C ve MDA miktarlarının sütun grafiği [Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında p<0.05 için (*), p<0.005 için ise (**) kullanıldı]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [116]. Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde oksijenin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmemektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az ya da çok parçalanması ile sonuçlanan hücre lipitlerinin peroksidasyonudur [71]. Lipid peroksidasyon yapıları hücre membranlarının dejenerasyonuna neden olan serbest radikallere sahiptirler. Bu serbest radikaller hücre yapısında bulunan yağ, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi önemli hücre yapılarını etkilerler. Lipit peroksidaz yapıları çok hızlı bir biçimde hücrede bozulup reaktif karbon bileşiklerini oluştururlar. Oluşan önemli karbon yapılarından biri olan MDA, lipid peroksidasyon sisteminde indikatör olarak rol alır [117].

Bindoli ve arkadaşları da Benzofuran türevi bileşiklerin lipit peroksidasyonu sonucu oluşan oksidanları ve sülfhidril grup oksidanlarıyla etkileşerek bu oksidanları berteraf ettiğini ve dolayısıyla antioksidan olduğu [35, 36] bildirmişlerdir. Bulgularımızda ise 2-(1H-benzimidazol-2-iltiy)-1-(benzofuran-3-il) ethanon (BIBE) 'nin uygulanan doza bağlı olarak ratların hem serum hemde karaciğer MDA düzeylerini kontrol grubuna göre azaldığı ($p>0.05$) gözlemlendi. Bulgularımız Ateş ve arkadaşları ile Bindoli ve arkadaşlarının bulguları ile uyum halindedir. Hem serum hemde karaciğerde MDA'nın miktarının azalması uygulanan BIBE'nin antioksidan özellik göstererek lipit peroksidasyonu azaltmış olması ile açıklanabilir. Antioksidan maddelerden β -karoten ve retinol antioksidan aktivitesini, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ve ortamdaki radikalleri toplayarak gerçekleştirmektedir [118]. A ve C vitaminleri singlet oksijen temizleyici özellikleri nedeniyle diğer oksijen radikallerine karşı da koruyucu etki yaparak (süperoksit, hidroksil, hidroperoksil, lipit peroksil ve alkoksil) onları ortamdaki temizleyerek antioksidan etkisini gösterebileceği bildirilmektedir [119, 120]. C vitamini güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların inaktive edilmesinde rol oynar [121]. Vitamin E (α -tokoferol)'de antioksidan aktiviteyi lipit peroksidasyonunun erken aşamasında serbest radikal türlerini yok ederek ya da oluşumlarını engelleyerek ve serbest radikalleri kararlı hale getirip peroksidasyon zincirini kırarak göstermekte olup, bu işlemde α -tokoferol, α -tokoferoksil radikaline dönüşür [122, 123]. Bir başka çalışmada E vitamini eksikliği olan deneklerde metabolik aktivite sonucu oluşan hidroperoksitler, aldehydler ve diğer

oksidasyon ürünlerinin arttığı, buna karşın E vitamini verilen deneklerde ise lipid peroksidasyonuna sebep olan serbest radikal oluşumunun azaldığı gözlenmiştir [124]. Bulgularımızda ise BIBE enjekte edilen ratların kan serumu A ve E vitaminlerin miktarlarında doza bağlı olarak anlamsız artış ($p>0.05$), C vitamini miktarlarında ise kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0.05$) olduğu belirlendi. Aynı şekilde BIBE uygulanan ratların doza bağlı olarak karaciğerlerindeki A ve C vitaminleri miktarlarındaki artış ($p>0.05$) anlamsız iken, E vitamini miktarında doza bağlı olarak kontrol grubuna göre artışın ($p<0.05$) anlamlı olduğu belirlendi. Uygulama gruplarında doza bağlı olarak serumdaki C vitamini ve karaciğerdeki E vitamini miktarının anlamlı şekilde artmış olması BIBE'nin karaciğerde bu iki vitamine dönüşebileceği sorusunu akla getirmektedir. Karaciğerdeki C vitamini miktarında kontrol grubuna göre artışın olmaması ise C vitamininin suda çözünür olup karaciğerde stoklanmaması ile açıklanabilir. Bu durumda antioksidan vitaminlerin miktarlarının artmış olması, BIBE'nin antioksidan özellik göstererek diğer vitaminlerin harcanmasını engellemiş olması veya BIBE'nin E ve C vitaminlerine dönüşmüş olması ile açıklanabilir.

Ambrosio ve Gordin yapmış oldukları araştırmalarında oksidatif stres sonucu ROS oluşumunun hücre hasarına yol açtığını ve bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyonun indirgenmiş formunun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlandığını belirtmişlerdir. Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'nin enzim aktivitesi için esas olduğunu ortaya koymuşlardır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSG (Glutatyon disülfid) ise glutatyon redüktaz isimli enzim aracılığıyla ile geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olduğunu belirtmişlerdir [65, 67]. Cochrane ve Ambrosio araştırmalarında; hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aştığını ve oksidatif strese neden olduğunu ifade etmişlerdir [65,71]. Oksidatif strese cevapta GSH miktarlarında azalma ve GSSG miktarında artma olabilir. GSH ve GSSG konsantrasyonlarındaki karşılıklı değişim oksidatif stresin işaretlerinden biri olarak düşünülen GSSG/GSH oranıyla ifade edilmektedir [125]. Bu nedenle radyasyonun sebep olduğu biyolojik hastalıklarda eritrositlerdeki GSH/GSSG oranının hızlı bir indikatör olabileceği önerilmiştir [126]. Bulgularımızda ise BIBE uygulanan ratlarda doz artışına bağlı olarak eritrosit GSH miktarında kontrol grubuna göre artma ($p<0.05$) ve GSSG miktarında ise azalma ($p>0.05$) olduğu belirlendi. GSH miktarının artışı GSSG nin azalması GSH/GSSG oranında artırmaktadır. Bu bulgular BIBE'nin antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

GSH-Px metabolizmanın enzimatik savunma sistemlerinden bir tanesi olup, hastalık veya oksidatif durumlarda enzimin aktivitesinde artma olduğu bilinmektedir [127]. Bulgularımızda BIBE bileşiği enjekte edilen ratlarda uygulanan doz artışına paralel olarak kontrol grubuna göre GSH-Px miktarında anlamlı bir fark olmamasına rağmen çok düşükte olsa

bir azalma($p>0.05$) olduğu gözlemlendi. Bu durumda BIBE'nin oksidatif özelliğinin olmadığını kanıtlar görünmektedir.

Tüm bu sonuçlardan 2-(1*H*-benzimidazol-2-iltiy)-1-(benzofuran-3-il) etanon (BIBE)'nin uygulandığı ratlarda doz artışına bağlı olarak, serumdaki C vitamininde artış olması ($p<0.05$), karaciğerde ise E vitamini miktarında anlamlı artış olması ($p<0.005$), MDA miktarındaki anlamsız azalma ($p>0.05$) ve bunun yanında ratların eritrosit GSH miktarında anlamlı artma ($p<0.05$), GSSG miktarındaki anlamsız azalma ($p>0.05$) ile GSH/GSSG oranındaki artış ve GSH-Px enzim miktarındaki anlamlı bir farkın olmaması BIBE'nin oksidatif strese sebep olmadığı göstermektedir. Literatür çalışmalarına paralel olarak bulgularımız bu bileşiğin antioksidan potansiyelinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. En önemlisi de BIBE'nin karaciğerde metabolize olarak C ve E vitaminine dönüşmüş olabileceği sorusudur. Bu konunun aydınlatılması için ileriki çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Lopez-Rodriguez M.L., Benhamu B., Morcillo M.J., 1999, Benzimidazole derivatives. 2. Synthesis and structure-activity relationships of new azabicyclic benzimidazole-4-carboxylic acid derivatives with affinity for serotonergic 5-HT₃ receptors. J. Med. Chem. 42, 5020-5028.
2. Roth T., Morningstar M.L., Boyer P.L., 1997, Synthesis and biological activity of novel nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 2-aryl-substituted benzimidazoles. J. Med. Chem. 40, 4199-4207.
3. Bishop M.J., 2002, α_1 - Adrenoceptor Agonists: The identification of novel α_{1A} subtype selective 2'- heteroaryl -2- (phenoxyethyl) imidazolines. Bioorganic & Chem. Lett, 471-475.
4. Paglietti G., Pirisi M.A., Loriga M., Grella G.E., Sparatore F., Satta M., Manga P., 1998, Preparation and pharmacological activity of 2-(4'-phenyl)-5R-benzimidazoles and 2-(4'-pyridinyl)-5R benzimidazoles. Analgesic activity and effects on acquisition of a conditioned avoidance response. Farmaco Ed.Sci., 43, 215-226.
5. Dunwell D.W., Evans D., Smith C.E., Williamson W.R.N., 1975, Synthesis and anti-inflammatory activity of some 2-substituted- α -methy-5-benzimidazoleacetic acids. J. Med.Chem.,18, 692-694.
6. Kusano A.S., Matsui S.N., Muramatsu Kawada S., 1978, Substituted benzimidazole fungicides. Japan Kokai Appl. 78, 934-1078.
7. Komssarov I.V., Flippov I.T., Prokop'eva T.M., Dalli V., Litvineko L.M., Simenenko Y.U.S., 1982, Effect of structural factors on the spasmolytic activity of some imidazole and benzimidazole derivatives. Khim.Farm.Zh.,16(5), pp. 570-573.
8. Haskell T.H., Peterson F.E., Watson D., Plessas N.R., Culbertson T., 1970, Nevraminidase inhibition and viral chemotherapy. J. Med. Chem., 13, 697-704 1970.
9. Abuzar S., Sharma S., 1982, Synthesis of substituted benzimidazoles as potential anthelmintics. 2. Arch. Pharm. 315, 866-871.
10. Mousseron M., Kamenka J.M., Stenger A., 1968, Active structures in the 2-aminoethyl benzimidazoles series. J. Med. Chem. 11, 889-894.
11. Ateş Z., Suzen S., Büyükbingöl E., Can-Eke B., Iscan M., 1997, Effects of a benzimidazole compound on mono oxygenase activities. Farmaco. 52, 703-706.

12. Tanaka A., Ito K., Nishino S., Motoyama Y., Takasugi H., 1991, 2Studies on anti-platelet agents. II. Synthesis and platelet inhibitory activity of 5-methyl-4-(3-pyridyl)-2-(substituted benzimidazol-5-yl) imidazoles. Yao Xue Xue Bao. 26, 741-746.
13. Srivastava Y.K., Batra S., Gupta S., Katiyar Y.C., Srivastava V.M., 1991, Effects of anthelmintics on the antioxidant system of *Nippostrongylus brasiliensis*. Farmakol. Toksikol. 54, 42-44.
14. Coles GC., Jackson F., Pomroy WE., Prichard RK., Von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor MA., Vercruysse J., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol, 136, 167-185.
15. Mottier L., Alvarez L., Ceballos L., Lanusse C., 2006, Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. Exp Parasitol. 113, 49-57.
16. EMEA, 2002, Committee for Veterinary Medical Products: Oxyclozanide. EMEA/MRL/340/98.
17. Andrews SJ., 2000, The efficacy of levamisole, and a mixture of oxfendazole and levamisole, against the arrested stages of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep. Vet Parasitol. 88, 139-146.
18. Dardonville C., Brun R., 2004, Bisguanidine, bis(2-aminoimidazoline), and polyamine derivatives as potent and selective chemotherapeutic agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Synthesis and in vitro evaluation. J. Med. Chem. 47, 2296-2307.
19. Radl S., Hezky P., Konvicka P., 2000, Synthesis and analgesic activity of some substituted 1-benzofurans and 1-benzothiophenes. Collect. Czech. Chem. C. 65, 1093-1108.
20. Smati S., Chevallet P., Flandre O., 1984, Synthesis and antiinflammatory and analgesic activities of 2-(2h-benzofuran-3-one) iminoxyalkanoic acids. Eur. J. Med. Chem. 19, 551-554.
21. Babu V.H., Mana S.K., Srinivasan S.K.K., 2004, Synthesis and biological evaluation of 1,3,5-trisubstituted pyrazolines bearing benzofuran. Indian J. Heterocyclic Chem. 13, 253-256.
22. Koca M., Servi S., Kirilmis C., 2005, Synthesis and antimicrobial activity of some novel derivatives of benzofuran: part 1. Synthesis and antimicrobial activity of (benzofuran-2-yl)(3-phenyl-3-methylcyclobutyl) ketoxime derivatives. Eur. J. Med. Chem. 40, 1351-1358.
23. Demizu S., Kajiyama K., Takahashi K., 1988, Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice-isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. Chem. Pharm. Bull. 36, 3474-3479.

24. Hishmat O.H., Atta S.M., Atalla M.M., 1986, Synthesis and antimicrobial activity of some benzofuran derivatives. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 35, 1, 784-786.
25. Khan M.W., Alam M.J., Rashid M.A., 2005, A new structural alternative in benzo[b]furans for antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 4796-4805.
26. Papadakivaliraki A., Todoulou O., Filippatos E., 1993, Synthesis and antiviral activity of some new benzofuran derivatives. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 43, 2, 1363-1364.
27. Masubuchi M., Ebiike H., Kawasak, E., 2003, Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 4463-4478.
28. Singh D.V., Mishra A.R., Mishra R.M., 2005, Synthesis and fungicidal activity of benzofuran incorporated substituted pyrimidines. *Indian J. Heterocy. Ch.* 14, 319-322.
29. Baraldi P.G., Romagnoli R., Pavani M.G., 2002, Benzoyl and cinnamoyl nitrogen mustard derivatives of benzoheterocyclic analogues of the tallimustine: Synthesis and antitumour activity. *Bioorg & Med. Chem.* 10, 1611-1618.
30. Hayakawa I., Shioya R., Agatsuma T., 2004, Thienopyridine and benzofuran derivatives as potent anti-tumor agents possessing different structure-activity relationships. *Bioorg & Med. Chem. Lett.* 14, 3411-3414.
31. Radl S., Konvicka P., Vachal P., 2000, A new approach to the synthesis of benzofuro[3,2-b]quinolines, benzothieno[3,2-b]quinolines and indolo[3,2-b]quinolines. *J. Heterocyclic. Chem.* 37, 855-862.
32. Connor D.T., Cetenko W.A., Mullican M.D., 1992, Novel benzothi-ophenecarboxamidotetrazole, benzofurancarboxamidotetrazole, and Naphthalene- carboxamidotetrazole as potential antiallergy agents. *J. Med. Chem.* 35, 958-965.
33. Davis L., Agnew M.N., Effland R.C., 1983, 2,3-Dihydro-3-(1 Pyrrol)Spiro [Benzofuran-2,4'-piperidine]s and 2,3-dihydro-3-(1-pyrrol)spiro [benzofuran-2,3'-pyrrolidine]s-novel antihypertensive agents. *J. Med. Chem.* 26, 1505-1510.
34. Ohno M., Miyamoto M., Hoshi K., 2005, Development of dual-acting benzofurans for thromboxane A(2) receptor antagonist and prostacyclin receptor agonist: Synthesis, structure-activity relationship, and evaluation of benzofuran derivatives. *J. Med. Chem.* 48, 5279-5294.

35. Grisar J.M., Bolkenius F.N., Petty M.A., 1995, 2,3-Dihydro-1-benzofuran-5-ols as analogs of α -tocopherol that inhibit in-vitro and ex-vivo lipid autoxidation and protect mice against central-nervous-system trauma. *J. Med. Chem.* 38, 453-458.
36. Bindoli A., Rigobello M.P., Musacchio E., 1991, Protective action of a new benzofuran derivative on lipid-peroxidation and sulfhydryl-groups oxidation. *Pharmacol. Res.* 24, 369-375.
37. Cowley D.J., Lukovic L., Petty M.A., 1996, Reduces cerebral infarction and free radical concentrations in rats subjected to ischaemia and reperfusion. *Eur. J. Pharm.* 298, 227-233.
38. Kirilmis C., Ahmedzade M., Servi S., Koca M., Kizirgil A., Kazaz C., 2008, Synthesis and antimicrobial activity of some novel derivatives of benzofuran: Part 2. The synthesis and antimicrobial activity of some novel 1-(1-benzofuran-2-yl)-2-mesitylethanone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 43, 300-308.
39. Keha E. E., Küfrevioğlu Ö. İ. *Biyokimya*, 2000, sf:235,236,237,239,245,2467
40. <http://tr.wikipedia.org/wiki/vitaminler>.
41. <http://www.google.com.tr/vitaminler>.
42. Padayatty SJ., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee JH., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta SK., Levine M., 2003, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*, 22,18–35.
43. Tamayo C., Richardson MA., 2003, Vitamin C as a cancer treatment: state of the science and recommendation for research *Altern Ther Health Med*, 9, 94–101.
44. Gonzalez MJ., Miranda-Massari JR., Mora EM., Guzman A., Riordan NH., Riordan HD., Casciari JJ., Jackson JA., Roman-Franco A., 2005, Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integrative Cancer Therapies*, 4, 32–44.
45. Cameron E., Pauling L., 1978, Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 75, 4538-42.
46. Yeom CH., Jung GC., Song KJ., 2007, Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *J Korean Med Sci.* Feb, 22, 7-11.
47. Fısu Ü., Tahan V., Akaya A., Ve ark. Primer., 1999, Akciğer kanserinde lipit peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktivitesi. *Tüberkiloz ve Toraks Dergisi*, 47, 31-35.

48. Nordberg J., Arner E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. and Med.*, 31, 11, 1287-1317.
49. Halliwell B., Gutteridge W.M.C., 1999, Free radicals in biology and medicine. Oxford Medicine Press, 246-351.
50. Tamer L., Polat G., Eskandari G., Ercan B., Atik U., 2000, Serbest radikaller. *Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi*, 1, 52-58.
51. Akgül E., İlhan M., Halifeoğlu İ., 1999, Tip 2 diabetes melitus da lipit peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri. *Biyokimya Dergisi*, 24, 28-33.
52. Meister A., Anderson ME., 1983, Glutathione, *Ann Rev. Biochem*, 52, 711-760.
53. Meister A., 1994, Glutathione, ascorbate and cellular protection, *Cancer Res. Suppl*, 954, 1969-1975.
54. Deneke SM., Fanburg BL., 1989, Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, 257, L163-L173.
55. Meister A., 1983, Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-477.
56. Ası T., 1996, Tablolarda Biyokimya, cilt I, sf: 222.
57. Bayşu M., 1979, Temel Biyokimya, sf:174,217.
58. Deneke SM., Fanburg BL., 1989, Regulation of cellular glutathione, *Am J., Physiol.*, 257, L163-L173.
59. Ambrosia G., Santora G., Tritto I., 1992, Effects of is chemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress, *Am J. Physiol*, 262, H23-H30.
60. Meister A., 1983, Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 427-477.
61. Meister A., Anderson ME., 1983, Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52, 711-760.
62. Meister A., 1994, Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl*, 954, 1969s-1975s.
63. Ambrosio G., Santoro G., Tritto I., 1992, Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *Am J Physiol*, 262, H23-H30.
64. Das D., Banerjee RK., 1993, Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem*, 125, 115-125.

65. Goldin E., Ardite E., Elizalde JL., 1997, Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, 112, 855-863.
66. www.google.com.tr/www.sabah.com.tr.
67. Gözükara E., 2001, *Biyokimya*, cilt 1, sf : 709-712.
68. Menguy R., 1981, Role of gastric mucosal energy metabolism in the etiology of stress ulceration. *World J Surg*; 5, 175-180.
69. Mozsik GY., Kraly A., Suto G., 1992, ATP breakdown and resynthesis in the development of gastrointestinal mucosal damage and its prevention in animals and human. *Acta Physiol Hung*, 80, 39-80.
70. Mutoh H., Hiraishi H., Ota S., 1990, Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology*, 98, 1452-1459.
71. Cochrane CG., 1991, Cellular injury by oxidants. *Am J Med*, 3C23S-3C30S.
72. Scherer NM., Deamer DW., 1986, Oxidative stress impairs the function of the sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphhydryl groups in the Ca^{++} -ATPase. *Arch Biochem Biophys*, 246, 589-601.
73. Ishikawa T., Zimmer M., Sies H., 1986, Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett*, 200, 128-132.
74. Menguy R., Desbaillets L., Masters YF., 1974, Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology*, 66, 46-55.
75. Aan NL., Tezcan EF., 1992, Glutatyon redüktaz. *Biyokimya Dergisi*, 17, 67-83.
76. Gutteridge JMC., Halliwell, B., 1988, The Deoxsiriboz Assay: An assay both for free radical and for sitespecific hydroxyl radical production. *Biochem*, 253-953.
77. Yöntem M., Akkuş İ., Şekeroğlu MR., Vural H., Öztok İ., Kolak S., Koyiğit A., 1993, Erkeklerde orta derecede alkol alımının eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine olan etkisi. *S.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 9, 339-344.
78. Candell AR., Tappel AL., 1983, Evidence for suitability of GSH-Px as a protective enzyme: studies of oxidative damage, renaturation. and proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 223, 2,407-416.

79. Underwood EJ., 1997, Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York, pp:302-346.
80. Oldfield SE., 1987, The two faces of selenium. J. Nutrition, 117, 2002-2008.
81. Kutsky RJ., 1981, Hand book of vitamins, mineral and hormones. 2th Ed. VMR, New York. 157-207.
82. Pearson DJ., Suarez-Mendez VJ., 1990 Abnormal platelet hydrogen peroxide metabolism in aspirin hypersensitivity. Clin Exp Allergy, 20, 157-63.
83. Flatt A., Pearce N., Thomson CD., 1990, Reduced selenium in asthmatic subjects in New Zealand. Thorax, 45, 95-9.
84. Halliwell B., 1994, Free radical antioxidants in human disease. Curiosity, cause or consequence. Lancet, 344, 721-724.
85. Wayner DDM., Burton GW., Ingold KU., Barclay LRC., Locke SJ., 1987, The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. Biochim Biophys Acta, 924, 408-419.
86. Jacques PF., Chylack LT., McGandy RB., Hartz SC., 1988, Antioxidant status in persons with and without senile cataract. Arch Ophthalmol, 106, 337-340.
87. Gutteridge J.M.C., and Halliwell B., 1988, The deoxysiriboz assay : An assay both for free radical and for site- specific hydroxyl radical production. Biochem., 253, 932.
88. Karlsson J., Ronneberg R., Semb B., 1997, Vitamins Q and E, extracorporeal circulation and hemolysis. Mol. Cell. Biochem., 173, 1, 2, 33-41.
89. Mecoci P., Beal M.F., Polidori M.C., Cherubini A., Chiosne F., 1997, Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain. Mol. Chem. Neuropathol. 31, 1, 53-64.
90. Janssen Y.M.W., Houten B.V., Borm P.J.A., Mossman B.T., 1993, Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. Lab. Invest., 69, 261-274.
91. Özdem S.S., Sadan G., 1994, Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg., 11, 63-71.
92. Sinclair A.J., Barnett A.H., Junec J., 1990, Free radicals and antioxidant systems in health and disease. British J. Hosp. Med., 43, 334-344.

93. Slater T.F., 1987, Free radicals in tissue injury. *Br. J. Cancer.*, 55, 5-10.
94. Facchinetti F., Dawson V.L., Dawson T.M., 1998, Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 18, 667-682.
95. Güven A., Erginsoy S., Kaya N., 2003, Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9, 131-136.
96. Kalender S., Kalender Y., Ögütçü A., Uzunhisarcıklı M., Durak D., Açıkgöz F., 2002, Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202, 227-235.
97. Porter N.A., 1984, Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105, 273-283.
98. Aslan R., Şekeroğlu M.R., Tarakçıoğlu M., 1997, Investigation of MDA formation and antioxidant enzyme activity in stored bloom. *Haematologia*, 28, 4, 233.
99. Diplock A.T., 1991, Antioxidant nutrients and disease prevention: An Overview. *Am. J. Chim Nutr.*, 53, 1895-1935.
100. Aalt B., Haenen R.M., Doelman J.A., 1991, Oxidants and antioxidants : State of the Art. *The American Journal of Medicine*, 91, 3, 3-13.
101. Byung P.Y., 1994 Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews*, 74, 1, 139-172.
102. Join S.K., Levine S.N., 1995, Free radical *biol. Med.*, 18, 2, 337-341.
103. Swierczynski J., Kochan Z., Mayer D., 1997, Dietary α -tocopherol prevents ehydropiandrosterone induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. *Toxicol. Lett.*, 92, 129-136.
104. Krajcovicova-Kudlackova M., Paukova V., Bacekova M., Dusinska M., 2004, Lipid peroxidation in relation to vitamin C and vitamin E levels. *Cent. Eur. J. Public Health.*, 12, 46-48.
105. Bao Y.P., Williamson G., Tew D., Plumb G.W., Lambert N., Jones J.G., Menon D.K., 1998, Antioxidant effects of propofol in human hepatic microsomes: concentration effects and clinical relevance. *British J. Anaesth.*, 8, 584-589.

106. Miller K.W., Lorr N.A., Yang C.S., 1984, Simultaneous Determination of Plasma Retinol α -Tocopherol, Lycopene, α -Carotene, and β -Carotene by High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.*, 138, 340-345.
107. Catignani G.L., 1983, Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 29, 708-712.
108. Cerhata D., Bauerova A., Ginter E., 1994, Determination of ascorbic acid in blood serum using high performance liquid chromatography and its correlation with spectrophotometric (colorimetric) determination]. *Ceska Slov Farm.*, Slovak, 43, 166-168.
109. Tavazzi B., Lazzarino G., Di-Pierro D., Giardina B., 1992, Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free-Radic-Biol-Med.*, 13, 75-78.
110. Karataş F., Karatepe M., Baysar A., 2002, Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 311, 76-79.
111. Dawes, P., Dawes, E., 2000, SGE Chromatography Products Catalog, pg: 182.
112. İlhan N., 1998, Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan koyalarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ.
113. Paglia DE., Valentine WN., 1967, Studies on the quantitative and qualitative of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Klin. Med.*, 70, 158-168.
114. Tietz N.W., 1986, Textbook of Clinical Chemistry W.B., Saunders Company, 1532-1534.
115. Fairbank VK., Farias RN., 1986, Biochemistry Aspects of Hematology. Ed. NW. Tietz, In: Textbook of clinical chemistry. Saunders Company. WB P., 1506-1507.
116. Sudha K., Ashalatha V.R., Anjali R., 2001, Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clinica Chimica Acta*, 303, 19-24.
117. Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P., 1997, Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, 43, 1209-1214.
118. Aalt B., Haenen R.M., Doelman J.A., 1991, Oxidants and antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med.*, 91, 3-13.

- 119.** Thomas M.J., 1995, The Role of Free Radicals and Antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Res., 27, 122-138.
- 120.** Kılınç K. 1985, Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları, toksik etkileri. Biyokimya Dergisi 10, 60-89.
- 121.** Granado F., Olmedilla B., Gil-Martinez E., 1998, Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. Clin. Sci.(Colch) 94, 189-95.
- 122.** Tanaka K., Hashimoto T., Tokumaru S., Iguchi H., Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. J. Nutr., 127, 2060-2064.
- 123.** Ognjanovic BJ., Pavlovic SZ., Maletic SD., 2003, Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. Physiol Res, 52, 563– 70.
- 124.** Chow CK., 1991, Vitamin E and oxidative stress. Free Radic Biol Med, 11, 215-32.
- 125.** Jones D.P., Mody Jr., V.C., Carlson J.L., Lynn M.J., Sternberg Jr. P., 2002, Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. Free Radical Biology and Medicine. 33, 1290–1300.
- 126.** Navarro J., Obrador E., Pellicer J.A., Asensi M., Vina J., Estrela JM., 1997, Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. Free Radical Biology and Medicine, 22, 1203-1209.
- 127.** Karatas F., Kara H., Servi S., Kıran T.R., Saydam S., 2008, Investigation of oxidative status of the 2-furan-2-yl-1*H*-benzimidazole in rats. Biological Trace Element Research., 126, 214-221.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ ili. Karakoçan ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Karakoçan'da tamamladım. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladım.

İlyas SARI