

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROKSİÜRE TÜREVİ 1,3,4-TİYADİAZOL BİLEŞİKLERİNİN ANTİTÜMÖR
VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf KARAGÖZOĞLU

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

MART-2010

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROKSİÜRE TÜREVİ 1,3,4-TİYADİAZOL BİLEŞİKLERİNİN
ANTİTÜMÖR VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf KARAGÖZOĞLU

Enstitü No:07117111

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa KARATEPE

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 11/03/2010

MART-2010

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROKSİÜRE TÜREVİ 1,3,4-TİYADİAZOL BİLEŞİKLERİNİN
ANTİTÜMÖR VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf KARAGÖZOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:11/03/2010

Tezin Savunulduğu Tarih:19/03/2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa KARATEPE

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Aysel SARI

Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

MART-2010

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarım süresince destek ve ilgisini esirgemeyen bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Mustafa KARATEPE' ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca sentez çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Memet ŞEKERCİ ve Arş Gör. Zuhale ERGİN'e de sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hücre kültürü çalışmalarımızda desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Süleyman SANDAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında bana her türlü desteği veren, çalışmalarım süresince göstermiş oldukları sabır ve desteklerden dolayı aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Yusuf KARAGÖZOĞLU

ELAZIĞ - 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Hidroksiüre Türevi 1, 3, 4-Tiyadiazol Bileşiklerinin Biyolojik Özellikleri.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	4
2.1.1. Serbest Radikaller	4
2.1.2. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu.....	4
2.1.3. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları.....	8
2.1.4. Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları	9
2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	9
2.3. Antioksidan Tanımı ve Çeşitleri	10
2.3.1. Serbest Radikallerle Antioksidan İlişkisi.....	11
2.3.2. E Vitamininin Antioksidan Etkisi	12
2.3.3. A Vitamininin Antioksidan Etkisi	13
2.3.4. C Vitamininin Antioksidan Etkisi.....	13
2.4. Çalışmanın Amacı.....	14
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Hayvan Materyali.....	15
3.1.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar.....	15
3.1.3. Kan örneklerinin Alınması.....	16
3.2. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler.....	16
3.3. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler	17
3.4. MCF-7 Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi.....	17
3.5. Kullanılacak hücre sayısı ve madde dozlarının belirlenmesi	18
3.6. Örneklerin Analizleri	18
3.6.1. C Vitamini ve MDA Analizi.....	18

	<u>Sayfa No</u>
3.6.2. A ve E Vitamini Analizi	19
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	19
4. BULGULAR.....	20
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	23
6. KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	32

ÖZET

Bu araştırmada, hidroksiüre türevi 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerinin ve bunların metal komplekslerinin deri altına enjeksiyonu ile ratların, lipid peroksidasyonunun derecesini gösteren serum MDA konsantrasyonu, antioksidan A, E, C vitaminlerinin düzeyleri üzerine olan etkisi ve antitümör özellikleri araştırıldı.

Deney grupları arasındaki karşılaştırmalarda serum C, A ve E vitaminleri konsantrasyonlarının istatistiksel olarak değiştiği, fakat serum MDA düzeyinin istatistiksel olarak değişmediği gözlemlendi. Bununla beraber, tiyadiazol bileşiklerinin ve metal komplekslerinin *in vitro* antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: 1,3,4-Tiyadiazol, Biyolojik Aktivite, Hidroksiüre, Antitümör Aktivite, Antioksidan Vitaminler(A,E,C), MDA

SUMMARY

AN INVESTIGATION OF ANTITUMOR AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HYDROXYUREA DERIVATIVE 1,3,4-THIADIAZOLES

In this research, the effect of hydroxyurea derivative 1,3,4-thiadiazoles and its metal complexes on the MDA concentration which is an indicator of lipid peroxidation, antioxidant vitamins A, E, C levels in serum of rats which is injected subcutaneously and antitumour activity in cell culture media were investigated.

In the comparison done among groups, it was observed that serum concentrations of vitamins C, A and E were statistically changed, but the serum level of MDA wasn't statistically changed. In addition to this, cell viability experiments show that thiadiazole components and its metal complexes have effective *in vitro* antitumor activity.

Key Words: 1,3,4-Thiadiazole, Biological Activity, Hydroxyurea, Antitumor Activity, Antioxidants Vitamins (A,E,C), MDA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Oksijen atomunun orbital yapısı ve Oksijen molekülünden türeyen oksidan moleküller	3
Şekil 2. Oksidan ve antioksidan denge	7
Şekil 3. Uygulamalarda kullanılan bileşikler	17
Şekil 4. (1).Gün İçin MCF-7 Hücrelerinin Süreye ve Doza Bağlı Canlılık Durumları	20
Şekil 5. (2).Gün İçin MCF-7 Hücrelerinin Süreye ve Doza Bağlı Canlılık Durumları	21
Şekil 6. Serum MDA ve antioksidan vitaminler A, E, C düzeyleri	22

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	11
Tablo 2. Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerin süreye ve doza göre canlılık durumları	20
Tablo 3. Maddelerle muamele edilmiş ratların serum MDA, antioksidan vitaminler C, A, E düzeylerine ait sonuçlar.....	22

KISALTMALAR

CAR	: β – Karotenin
Cd	: Kadmiyum
Cr	: Krom
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
HClO₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Mangan
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat(Redükte)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TocOH	: Tokoferol

1. GİRİŞ

1.1.Hidroksiüre Türevi 1, 3, 4-Tiyadiazol Bileşiklerinin Biyolojik Özellikleri

Tiyazoller, beşli halkada hetero-atom olarak azotla birlikte kükürt içeren bileşiklerdir. Tiyazol halkası peptid alkaloidler, siklopeptidler gibi doğal ürünlerin yapısında bulunmaktadır. Çeşitli farmakolojik aktivitelerinden dolayı kimya, biyoloji ve farmakoloji bilim dallarında büyük ilgi görmektedir [1]. Tiyazol türevi bileşiklerin; antifungal [2], antibakteriyal [3], antimikrobiyal [4], antitümör [5], antikonvulzant [6] özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunu [7], protein oksidasyonunu [8] engelleyerek antioksidatif aktivite gösterdiği de belirtilmektedir. Yine bu tür bileşiklerin lokal anestetik aktiviteleri [9], kas gevşetici etkileri, sinir sistemi depresanı [10,11], sitotoksikite ve *in vitro* antituberküloz aktiviteleri araştırılmıştır [12,13].

Son yıllarda 1,3,4-tiyadiazollerin biyolojik aktiviteleri araştırma konusu olmuştur [14]. Özellikle N-substitue 2-amino-1,3,4-tiyadiazol türevlerinin antiproliferatif aktivite gösterdiği araştırılmıştır [15]. Tiyadiazol ligandlarının karbonik anhidraz enzimini (CA, EC 4.2.1.1) inhibe ettiği *in vivo* çalışmalarda gözlenmiştir [16]. Benzer şekilde Cu(II) ve Zn(II) metal komplekslerinin antiepileptik etki gösterdiği çalışmalarda belirtilmiştir [17].

Yapılan bir çalışmada 1,3,4-tiyadiazol türevi Co(II), Ni(II), Cu(II) metal kompleksleri sentezlenmiştir. Bu metal komplekslerinin *Aspergillus* ve *Candida* gibi fungi türlerine karşı antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçta *in vitro* çalışmalar bu kompleks bileşiklerinin *Aspergillus* and *Candida* türlerine karşı fungitoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [2,18].

Bazı tiyadiazol türevlerinin (2,2-bis-1,3,4-tiyadiazol) yapılan *in vivo* olarak BALB/3T3 farelerinde; L1210 lösemi 6C3HED/OG lenfosarkoma, C1498 miyeloid lösemi, Ehrlich karsinoma, sarkoma 180, B16 melanoma ve X5563 miyeloma gibi lösemi türlerine karşı antitümör ve immünoşüpresif aktivite gösterdiği belirlenmiştir [5,19].

Başka bir çalışmada bazı tiyadiazol türevi bileşikler ratlara uygulandığında, lipid metabolizmasında peroksizom proliferatör aktive edici olduğu belirlenmiştir [20]. Ayrıca serbest yağ asidi miktarını düşürdüğü [21], karaciğerdeki ünsilin değerini arttırdığı belirlenmiştir [22].

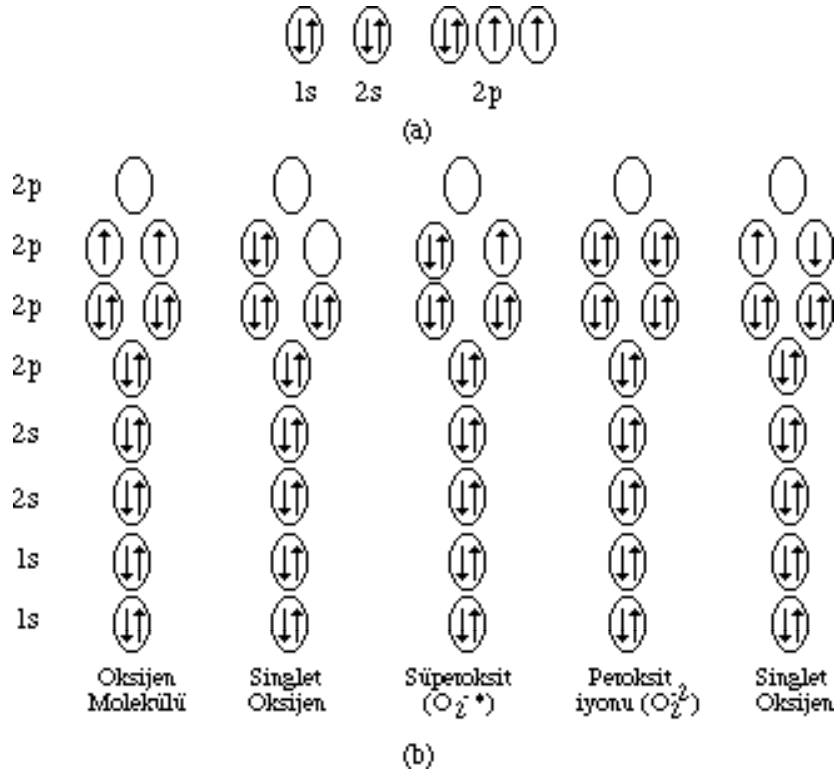
Yakın zamanlarda hazırlanan 2,6-ditersiyeer bütill fenol gruplarının 2-amino ve 2-hidroksi-1,3,4-tiyadiazol bileşiklerine 5 pozisyonundan bir metilenoksi yada etilenoksi köprüsüyle bağlı bileşiklerin siklooksigenaz(COX) ve 5-lipooksigenaz(5-LOX) enzimlere karşı seçimli inhibitör özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Hem siklooksigenaz hem de lipooksigenaz enzimlerinin araşidonik asitten lökotrienlerin, prostoglandienlerin biyosentezindeki ara basamakları katalizleyen enzimler olduğu gözönüne alınırsa 1,3,4-tiyadiazollerin biyokimyasal önemi daha rahat anlaşılabilir [23].

Çeşitli 5-aril substitue tiyadiazollerin elde edilmesiyle ilgili bir çalışmada bazı tiyadiazol bileşiklerinin, inosin-5-monofosfat dehidrogenaz(IMPD) inhibisyonu ile guanosin trifosfat(GTP) seviyesini azalttığı ve böylece potansiyel bir aktivitenin ortaya çıktığı belirtilmektedir [24].

2. GENEL BİLGİLER

Oksijen, aerobik yaşayan tüm canlıların temel yaşam kaynağı olan ve doğadaki moleküler oksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısı ile ilişkilidir. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde “singlet O_2 ” oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse oksijen radikalleri ortaya çıkar (Şekil.1) [25,26].

Moleküler oksijen kendi başına serbest bir radikaldır veya daha doğru olarak iki eşleşmemiş elektron içeren bir biradikaldır. Oksijenin reaktivitesi ayrı orbitallerde bulunan ve paralel spine sahip olan iki eşleşmemiş elektronu dolayısıyla sınırlanmaktadır. Bu, atomları kısıtlamaktadır. Kendisi antiparalel spine sahip iki eşleşmemiş elektronu ile atomlara okside olabilmektedir. Oksijen, başlıca diğer radikallerle reaksiyona girerek bir elektron almaya eğilimlidir. Radikaller genellikle eşleşmemiş elektronu ifade eden bir nokta ile gösterilirler [27].



Şekil 1. (a) Oksijen atomunun orbital yapısı, (b) Oksijen molekülünden türeyen oksidan moleküller

2.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.1.1.Serbest Radikaller

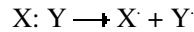
Serbest radikaller; paylaşılmamış elektron çifti bulunduran, oksidatif strese neden olan, kimyasal reaksiyonlara karşı çok duyarlı, aktif kimyasal parçalardır. Organizmada oksidanlarla antioksidanlar arasında oluşan dengesizliğin oksidanlardan yana ağır basmasıyla lipid, protein, DNA gibi önemli yapı taşlarında hasarlar ve buna bağlı hastalıklar oluşmaktadır. Bu tanımdan da anlaşılacağı gibi serbest radikaller hücreyi hasara uğratar, kolaylıkla okside olarak hücrenin yapısını bozarlar. Orbitallerinde bulundurdıkları paylaşılmamış elektron sayesinde kolaylıkla reaksiyon verebilirler ve bu yüzden de oldukça reaktiftirler. Serbest radikallere, oksidan moleküller veya en doğru adlandırma ile "Reaktif Oksijen Partikülleri" de denilmektedir [28,29].

2.1.2.Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu

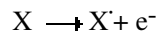
Reaktif Oksijen Türleri, zincir serbest radikal reaksiyonunu başlatarak birçok biyomolekülle kolayca reaksiyona girebilirler. Bu zincir reaksiyonunu durdurmak için, yenice oluşmuş bir radikal ya diğer bir serbest radikal ile eşleşmemiş elektronları elimine ederek reaksiyona girmeli ya da bir serbest radikal süpürücü, zincir kırıcı veya primer antioksidan ile reaksiyona girmelidir [26,29].

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşabilmektedir.

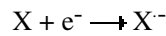
1. Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik kopması sonucu eşlenmiş elektronlardan herbirinin ayrı parçada kalması ile meydana gelebilmektedir.



2. Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu oluşabilmektedir.



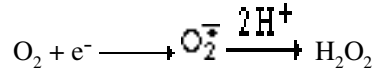
3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile elde edilebilmektedir.



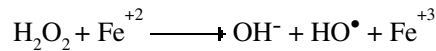
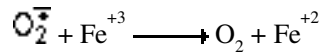
Oksijen radikalleri, eşleşmemiş tek elektronları nedeniyle çok kararsızdırlar ve hızla ortamdan kaybolurlar. Ancak ortamdan kaybolmadan önce sahip oldukları tek elektronu bir başka moleküle vererek (oksidasyon) veya başka bir molekülden elektron alarak (redüksiyon) elektronları çift olarak bulundurma eğiliminde bulunurlar. Bunların sonucunda etkiledikleri non radikal durumdaki yapı radikal yapıya dönüşür. Bu özellikleri nedeni ile reaktif oksijen molekülleri radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki grupta incelenebilir [25].

Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronların eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksine, bir serbest oksijen radikaline dönüştürür. Serbest radikallere yaygın birkaç örnek olarak merkezinde oksijen bulunan süperoksit anyonu (O_2^-), kükürt bulunan tiyil ($RS^\cdot$), karbon bulunan triklorometil ($CCl_3^\cdot$) ve çiftleşmemiş elektronun her iki atom arasında delokalize olduğu nitrikoksit (NO) verilebilir [30].

Bir serbest radikalın başlangıç ürünü moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyon radikalidir ($O_2^{\cdot-}$). Hidrokinonlar, flavonlar, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi çok sayıda biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar. Bir serbest radikal, çiftleşmemiş elektrona sahip bir atom veya moleküldür. Bu ürün kararsız bir yapıdır ve çevresindeki bir organik veya inorganik yapıya saldırabilir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir. Peroksit anyonu çözeltiden iki proton alarak hidrojen peroksit'e dönüşür. Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen peroksit'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir. SOD tarafından katalizlenen bu tepkime "dismutasyon tepkimesi" olarak adlandırılır [31,32,].



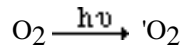
Hidrojen peroksit tek başına serbest radikal olmamasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir ve daha da önemlisi hidroksil radikali üretebilir ki, bu da oksijen yapısındaki radikallerin en toksik olanıdır. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni; demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Canlı sistemlerde oksijen radikalının zararlı etkilerine dikkat edilmesi ve bu radikallerin oluşumu ile hemen etkilerinin uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde bunlar Fe veya Cu gibi iki değerli katyonları katalizleyerek daha etkili bir serbest radikal olan hidroksil radikalini oluştururlar [33].



Ferrik demir (Fe^{+3}) önce süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek ferröz demire (Fe^{+2}), ardından da hidroksi radikali oluşturmak için yeniden H_2O_2 ile oksitlenmektedir. Bu iki basamaklı reaksiyon süperoksit ile oluşan Fenton Reaksiyonu olarak bilinir [34].

HO• radikali, canlı sistemlere çok zararlı olabilecek çok güçlü bir radikaldir. Birçok hastalıklara sebebiyet verebilecek biyokimyasal değişimleri oluşturulabilir. Hidroksil radikali hücreler için tek yıkıcı tür olmamakla birlikte kimyasal yapısı sayesinde kendisine komşu molekülleri kolaylıkla okside edebilir. Ayrıca aktivitesi de yüksek olduğundan herhangi bir molekülle hızla reaksiyon vererek mitokondrial DNA, membran lipidleri ve karbonhidratlara da zarar verir. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur [35].

Oksijenin diğer bir metaboliti de singlet oksijendir (¹O₂). Bu molekül oksijenin enerji yakalamasıyla şekillenir.



Singlet oksijen serbest radikal değildir [25]. Ancak biyokimyasal olaylarda önemlidir ve doku hasarlarına yol açabilir. Bu zararlarının ortadan kalkışı, vitamin A ve diğer retinoitler veya β-karoten ve diğer karotenoidler gibi antioksidanların kimyasal değişmeksizin enerji absorbe eden bileşikler olarak singlet oksijeni biyolojik sistemlere zarar vermeden O₂'ye dönüştürmesiyle olur [36].

Bu açıklamalara göre oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde bileşenler (non-radikaller) olmak üzere 2 grupta toplanırlar [37].

1. Radikaller

- Süperoksit radikali ($\dot{O}_2^-$)
- Hidroksil radikali (HO•)
- Alkoksil radikali (LO•)
- Peroksit radikali (LOO•)
- Semikinon radikal (HQ•)
- Hemoproteine bağlı serbest radikaller

2. Non-Radikaller

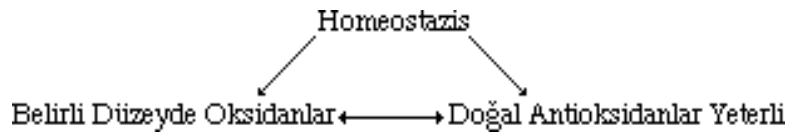
- Hidrojenperoksit (H₂O₂)
- Lipid hidroperoksitler (LOOH)
- Hipoklorik asit (HOCl)
- Hipohalöz asid (HOX)
- N-halojenli aminler (R-NH-X)

- Singlet oksijen (O_2)
- Ozon (O_3)
- Azot dioksit (NO_2)

Serbest radikaller, organik ya da anorganik yapıli molekülleler olabilir. Stabil olmayıp sisteme yoğun bir kararsızlık veren yük dengesizliklerini gidermek için yani elektron konfigürasyonlarını pozitif yüke dengeleyebilmek için oldukça aktif bir yapı özelliğı gösterirler. Radikallerin aktif olma özelliğı, başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir. Ancak hidroksi ($\cdot OH$) radikali son derece yüksek aktif özellikte olduğundan meydana geldiğı hücre bölümünden daha uzağı difüzyona gerek kalmadan oluştuğı yerde derhal reaksiyona girer. Buna karşılık süperoksit radikali, hidroksi radikalinden daha az reaktif olduğuna için açığı çıktığı hücre bölümünden daha uzak noktalara rahatlıkla diffüze olabilir. Ancak bu difüzyon hücre içindeki SOD'ın yüksek konsantrasyonu ile sınırlıdır. Hidrojen peroksit ise mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolayca diffüze olarak toksik etkisini açığı çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir [38].

Çok kısa yaşam süreleri olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Serbest radikaller hücrenin hedef olarak seçtiğı farklı bölgelerinde farklı hasarlara neden olurlar. Nükleik asid ve bazıları hedef aldıklarında sonuç hücre döngüsünde hasar ve çeşitli mutasyonlar olurken, doymamış ve tiol içeren aminoasitler hedef olduğunda proteinde natürasyonu, çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değışiklikler meydana gelir. Eğer serbest radikallerin hedefi DNA ise, DNA zincir kırıkları ve baz değışiklikleri meydana gelebilmektedir [39,40].

Oksidan maddelerin önemli bir kısmını etkisizleştiren antioksidan savunma sisteminin işleyişi ile bu oksidan maddelerin oluşumları arasında daima bir denge vardır. Ancak bu dengenin oksidan baskının artması yönünde bozulması hücrelerde veya tüm organizmada meydana gelebilecek bir hasarla sonuçlanabilir [41]. Bu hasarın büyüklüğü de hasarlayıcı maddenin oluşum hızı ile oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan yada kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalar arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Oksidanlar, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu sırasında olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum ve "endojen antioksidanlar" adı verilen molekülleler tarafından sürekli etkisizleştirilme süreci içindedirler. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge (homeostazis) içindedir [42].



Şekil 2. Oksidan ve antioksidan denge

Alzheimer, hungtington, parkinson, kanser, romatoit artrit, katarakt, , retrolental fibroplazi, arterosikleroz, şeker hastalığı, ülserativ kolon iltihabı ve yaşlanma süreci oksidan moleküllerin etkin olduğu kabul edilen hastalıklar arasında sayılmaktadır [43,44].

İn vivo olarak bu reaktif oksijen türlerinin (ROT) bazılarının enerji üretimi, fagositoz ve hücre büyümesinin düzenlenmesi ve hücreler arası haberleşme veya biyolojik olarak önemli bileşiklerin sentezi gibi rolleri vardır. Ancak, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonunu indükleyebildikleri, membran hasarına neden oldukları, membran akışkanlığını azalttıkları ve DNA mutasyonu ile kansere yolaçtıkları için ROT'lar çok zararlı olabilmektedirler. ROT'lar tüm aerobik organizmalar tarafından oluşturulup parçalanarak ya normal hücre fonksiyonları için gerekli olan fizyolojik konsantrasyonları oluştururlar ya da fazla miktarlarda oluşarak "oksidatif stres" adı verilen bir durum ortaya çıkarırlar. Reaktif oksijen türleri teriminin ifade ettiği gibi, bu oksijen ara ürünlerinin intrasellüler üretimi proteinler, lipidler ve ayrıca ateroskleroziste yer alan lipoproteinler, DNA gibi birçok biyomolekülde hücrel hasar meydana getirir [45].

2.1.3.Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları:

I - Normal biyolojik işlemler

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

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a-) İn hale edilenler
 - b-) Alışkanlık yapan maddeler
 - c-) ilaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
 - a-) Ksantin oksidaz
 - b-) İndolamin dioksigenaz
 - c-) Triptofan dioksigenaz
 - d-) Galaktoz oksidaz
 - e-) Siklooksigenaz
 - f-) Lipooksigenaz
 - g-) Monoamino oksidaz
- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara [42].

2.1.4. Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları:

- Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksisgenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücresinin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar [46].

2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle; başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler [47].

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri, poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali ($L^{\bullet}$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($L^{\bullet}$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO^{\bullet}$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ($LOO^{\bullet}$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder [41].

Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L^\bullet$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO^\bullet$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Oksijen molekülü hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlerde 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 ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [29,36].

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. 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 [38]. Malondialdehit (MDA), biyolojik sistemde lipitlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Radikaller hücre membranına zarar vererek oksidatif stres oluştururlar. Radikallerin hücrede oluşturduğu lipit oksidasyonu sonucunda da hücrede MDA oluşmaktadır [47]. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinogenik 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 [48].

2.3. Antioksidan Tanımı ve Çeşitleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.

Antioksidanlar; serbest radikallerin oluşumunu yok eden ya da azaltan ve zararlı etkilerini yok etmeye çalışarak oluşabilecek biyolojik hasarları önlemeye çalışan bileşiklerdir. Bu bileşikler; oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini önleyerek serbest radikallerin vereceği hasarı

en aza indirmeye çalışırlar. Endojen (doğal) ve eksojen (ilaçlar) antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler [42,49].

Tablo 1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

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

2.3.1. Serbest Radikallerle Antioksidan İlişkisi

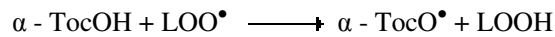
Son yıllarda antioksidanların birçok hastalığa karşı önemi son derece artmıştır. Serbest radikallerin keşfiyle kanser, diyabet, kalp hastalıkları, otoimmün hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar v.b. birçok hastalık ilişkisi belirtilmiştir. Tıbbi bitkilerde antioksidan özellikli maddelerin keşfiyle sağlık alanında kullanımı artmıştır ve birçok hastalığın tedavisinde kullanımı belirtilmiştir.

Serbest radikaller son derece reaktif moleküller olup oksidatif strese sebep veren maddelerdir. Oksidatif stres hücrede lipitlere, proteinlere, enzimlere, karbonhidratlara ve DNA'ya zarar verir. DNA moleküllerine, enzimlere ve proteinlere bağlanarak proteinlerin parçalanması sonucunda hücre büyük zarar görür. Bunun sonucunda da hastalıklar ortaya çıkar [45].

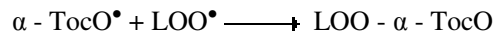
İnsan antioksidan savunma sisteminde enzimatik savunma sistemleri dediğimiz süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz enzimleri vardır. Bunların yanında hidrofilik savunuculardan askorbat, ürat, glutatyon ve flavonoidler vardır. Lipofilik radikal savunucularından ise tokoferoller, karotenoidler ve ubiquinon vardır. Metabolizma sistemi için sentezlenen maddelerin yanında dışarıdan diyetle alınan önemli antioksidan türevli maddeler vardır. Bunlar içerisinde en önemli olanları askorbik asit, lipoik asit, polifenoller ve karotenoidlerdir. [50]. Hastalıkların oluşumunda ROS karşı savunma zayıf olursa oksidatif hasarın artışıyla hücrede tahribatlar meydana gelir. Bu durumda dışarıdan alınan bu antioksidanlar oksidatif stresin oluşturduğu hasarları azaltmakta kullanılmaktadır. Epigallocatechin-3-o-gallate (EGCG), likopen, quersetin, genistein, ellagik asit, ubiquinon ve indole-3-karbinol, askorbik asit, vitamin E önemli antioksidanlar olarak bilinir. Bu maddeler hastalıkların engellenmesi için de kullanılmaktadır [51].

2.3.2. E Vitamininin Antioksidan Etkisi

Vitamin E çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E; süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir. E vitamini diğer biyolojik moleküllerden daha fazla peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önler ve hücre yapısını koruyarak güçlü bir antioksidan etki gösterir [47]. Lipid peroksidasyonunda oluşan peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek çok fazla zayıf ve etkisiz bir radikal olan tokoferoksil radikalini oluşturur.



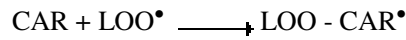
Daha sonra tekrar ikinci bir radikalle reaksiyona girerek radikal olmayan bir ürün olan LOO - TocO'yi oluşturur.



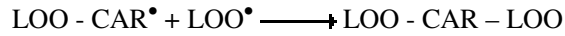
Böylece her tokoferol molekülü, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını önleyerek antioksidan etkisini gösterir [52].

2.3.3. A Vitamininin Antioksidan Etkisi

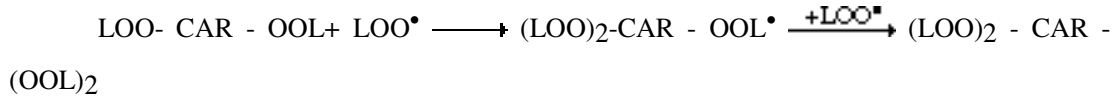
Vitamin A'nın ön maddesi olan β - karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır. Karotenoitler, lipid peroksidasyonu esnasında ortaya çıkan radikalleri önlemede etkilidir ve aktif oksijen çeşitlerini durdurmada etkili olan pigmentler olarak görülürler. Karotenoitlerin uzun, konjuge, çift bağlı sistemleri radikal saldırılarına karşı onları üstün hale getirmektedir. β - karotenin (CAR) peroksil radikali ile direkt olarak reaksiyona girebileceği ve karbon merkezli radikal oluşturarak rezonans kararlı hale geleceği belirtilmektedir [53].



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



Bununla birlikte bu antioksidan etki burada bitmez. Aşağıda gösterildiği gibi çoklu rezonans kararlılığı ile bir karoten molekülü, karbon merkezli radikaller oluşturarak iki peroksil radikale daha etki eder. [48].



β - karoten ile peroksil radikalinin reaksiyonundan oluşan ürünlerin bazıları son zamanlarda ESR ile tarif edilmiştir. Ürünler bazı epoksitler ile β - karotenin karbonil türevleridir [51,52].

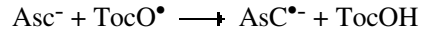
2.3.4. C Vitamininin Antioksidan Etkisi

C vitamini (askorbik asit) bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Suda çözünebilen vitaminlerden olan askorbik asit bağırsaklarda kolayca emilir ve kana karışır [46,49].

Vitamini güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet -}$) ve hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. C vitamininin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir. [54]. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile

etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir [55].

Ayrıca C vitamini askorbat radikali oluşturarak, radikalik tokoferollerin yenilenmesini sağlar [50].



2.4. Çalışmanın Amacı

Çalışmada 1,3,4-Tiyadiazol ve bunun metal komplekslerinin biyolojik etkilerini incelemektir. Bunun için, bileşikler ratlara deri altı enjekte edildikten sonra, alınan kan ve doku örneklerinde HPLC cihazı ile A, E, C vitaminlerini ve MDA analizleri yapılarak antioksidan prooksidan özellikleri ve *in vitro* antitümör etkilerini incelendi.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada 12-14 haftalık ortalama 250 g ağırlığında erişkin Wistar cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deneysel çalışmada kullanılan erişkin Wistar cinsi erkek ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)’nden temin edildi ve aynı yerde deneysel uygulama gerçekleştirildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Deney süresince herhangi bir ağırlık değişimi gözlenmemiş olup hiçbir nedenle denek ölümü yaşanmadı.

3.1.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Araştırmada kullanılacak ratlar 1 kontrol, 4 uygulama grubundan oluşturuldu ve her grupta 7’şer denek olmak üzere toplam 35 rat yer aldı.

İlgili literatür taramasından sonra ligand ve komplekslerinin molekül yapıları (büyüklük) göz önüne alınarak uygulamaların kontrol ve denek grupları için 0. gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün olacak şekilde 3 gün ara ile yapılmasına karar verildi ve 15 gün uygulandı [56].

Uygulama maddelerinin dozları literatürden faydalanılarak kararlaştırıldı ve şartlara uygun olarak 25 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde önce DMSO’te çözüldü ve DMSO miktarı % 10’un altında olacak şekilde mısır özü yağı ile seyreltildikten sonra hayvanlara deri altından uygulandı.

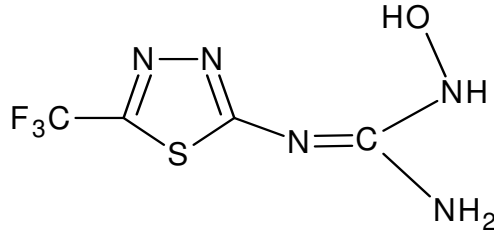
Kontrol gruplarına, DMSO miktarı % 10’un altında olacak şekilde yağ hazırlanarak 0,5 ml çözelti deri altına enjekte edildi. Uygulama gruplarına ise 0,5 ml çözelti içerisindeki ligand ve metal kompleksleri derişimi 25 mg/kg vücut ağırlığı dozunu ihtiva edecek şekilde hazırlanan çözeltiler deri altına enjekte edildi [57,58].

3.1.3. Kan örneklerinin Alınması

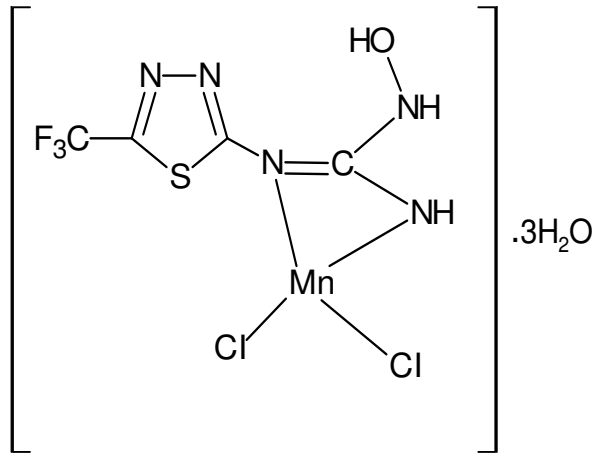
Uygulama sürelerinin sonunda hayvanlar eter ile anesteziye alınarak göğüs kafesleri açıldı ve kalplerinden yeterli miktarda (4-8 ml) kan alındı. Alınan kan örnekleri safrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç üç gün içerisinde analizlendi. Analiz anına kadar serum örnekleri -20°C'de bekletildi.

3.2. Uygulamalarda Kullanılan Bileşikler

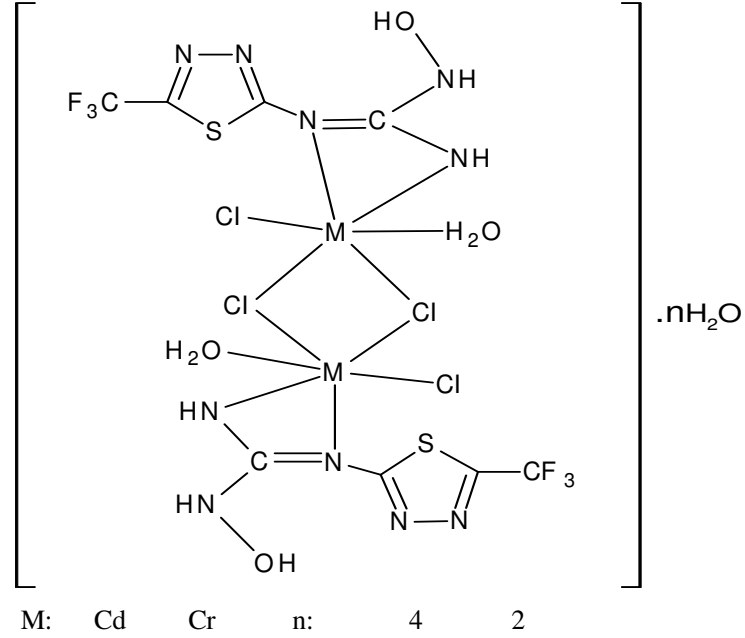
Uygulamalarda, hidroksiüre türevi 1,3,4-tiyadiazol bileşikleri ve bunların metal kompleksleri kullanıldı. Bu ligandların ve Mn, Cd ve Cr metal kompleksleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir [59]. Ligandların ve komplekslerinin yapısı aşağıdadır.



[1-hidroksi-2-(5-(trifluorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)guanidin] Ligandın Şekli



a) Mn(II) kompleksinin şekli



b) Cd ve Cr komplekslerinin şekli

Şekil 3. Ligandın ve Komplekslerinin Şekli

3.3. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler

Bu çalışmada MCF-7 (insan göğüs kanseri) hücreleri kullanıldı.

3.4. MCF-7 Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi

Hücre kültür bankasından (ATCC, ABD) aldığımız donmuş haldeki MCF-7 (insan göğüs kanseri hücreleri) oda sıcaklığında çözündürülerek 75 ml flask içerisine aktarıldı. Flask'ın içerisine daha önceden hazırlanmış olan DC₅ (25 ml) ilave edildi ve flasklar, Nuair marka bir %5 CO₂ - %95 O₂ inkübatörüne (*Playmouth, MN, ABD*) yerleştirildi. Günlük olarak hücrelerin durumu Soif marka (*Soif Optical Inc., Çin*) bir inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi ve üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC₅ çekilerek taze siyle değiştirildi. Bu işlem üç gün aralıklarla sürekli tekrar edildi.

Sayıları artmaya devam eden hücreler flaskın tabanını tamamen kaplayarak üst üste tabakalar oluşturmaya başladılar. 15. günün sonunda flasklardaki medyum çekildi ve yerine 3 ml tripsin ilave edilerek inkübatöre yerleştirildi. 2-3 dakikada bir flasklar hafifçe sallanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmalrı sağlandı. Tüm hücreler flaskın yüzeyinden ayrıldıktan sonra flaskların içerisine 12 ml DC₅ ilave edildi ve dikkatli şekilde tritürasyon (süspansiyonun pipet içerisine çekilip boşaltılarak yapılan ayrıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılması sağlandı.

Hücreler bir hemositometre kullanılarak sayıldı. Her flaska 5×10^6 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu konulup üzerlerine DC₅ ilave edildi (toplam hacim 25 ml olacak şekilde) ve tüm flasklar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin ekimleri, beslenmeleri ve deneyler steril bir Class II Laminair Flow (Biolaf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi [60].

3.5. Kullanılacak hücre sayısı ve madde dozlarının belirlenmesi

MCF-7 göğüs kanseri hücreleri, flasklara tripsin ilave edilerek yerlerinden söküldü ve hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edildi. Tüplerdeki tripsin-medyum karışımı alınarak yerine DC₅ ilave edildi ve tritürasyon ile hücrelerin *single cell suspension* haline gelmeleri sağlandı. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı MCF-7 hücre deneyleri için 1×10^6 / ml hücreye ayarlandı. Dozların belirlenmesinde ön denemeler yapıldı ve aşağı yukarı yöntemi kullanıldı. Bu şekilde dozların 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM olmasına karar verildi [61].

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM konsantrasyonlarda ilave edildi. Negatif kontrol tüplerine aynı miktarda serum fizyolojik, *vehicle* tüplerine de aynı miktarda DMSO ilave edildi ve tüpler inkübatöre yerleştirildi. Hücre süspansiyonlarındaki DMSO miktarı %1'den fazla değildi. 24 saat sonra tüpler inkübatörden çıkarılarak tritürasyon yapıldı ve hücre süspansiyonu % 0,4 tryphan blue ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak rasgele seçilen 100 adet hücre hemositometrede sayıldı. Hücre canlılığı oranı yüzde olarak ifade edildi. Aynı işlem 48 saat sonra da tekrar edildi ve deney sonlandırıldı.

3.6. Örneklerin Analizleri

3.6.1. C Vitamini ve MDA Analizi

Serum örneğinden 0,3 ml alınıp üzerine 0,3 ml 0,5 M HClO₄ ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Daha sonra bu karışım vortekslendikten sonra üzerine saf su ilave edilerek toplam hacim 1 ml tamamlandı. Karışım 15 dakika santrifüjlendikten (2500 devir /dak) sonra örneklerin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20µl alınarak HPLC'de analiz edildi. Askorbik asit ve MDA Karatepe(2004)'ye göre HPLC 'de analiz edildi [62].

Analizler hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 82,5 – 17,5; pH:4) karışımında 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu kullanılarak akış hızı 1 ml/dk yapıldı.

3.6.2. A ve E Vitamini Analizi

Derin dondurucudan alınan serum örnekleri çözünme işlemi yapıldıktan sonra 0,3 ml serum örneği üzerine %1 'lik H_2SO_4 ihtiva eden etil alkolden 0,3 ml ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Karışım vortekslendikten sonra 2500 devirde 5 dakika santrifüjlendi. Sonra örnekler üzerine 250 µl n-hegzan ilave edildi. Hegzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hegzan fazına ekstakte edildi. Hegzan ilave edildikten sonra tekrar vortekste karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hegzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine 250 µl n- hegzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hegzan fazı cam tüpteki hegzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hegzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalıntı 100 µl metanolde çözüldü [63]. HPLC'de analiz edildi. Örneklerdeki E vitamini 296 nm ve A vitamini 326 nm dalga boyunda İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu ve asetronitril : metanol : diklormetan: kloroform: hegzan (60 : 10 : 15: 10: 5) hareketli fazında akış hızı 1 mL/dak. olacak şekilde analizlendi. A vitamini için geri kazanım % 92, E vitamini için ise % 96 olarak bulundu [64,65].

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler, SPSS istatistik program ile yapıldı. Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler One-way Anova analizi Tukey testi yapılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

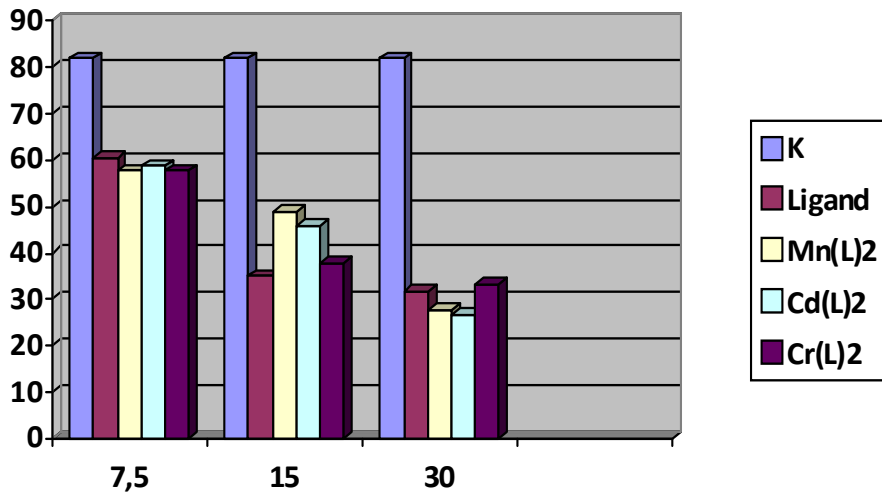
Elde edilen bulgular parametrelerin her birinde uygulama boyunca grupların kontrol grubu ile kıyaslarını gösterecek tablolar halinde verildi. Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücreleri ait canlı hücre sayımı sonuçları Tablo 2’de, yine maddelerle muamele edilmiş ratların serum MDA, antioksidan vitaminler C, A, E düzeylerine ait sonuçlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 2. Maddelerle muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin süreye ve doza göre %’de olarak canlılık durumları.

a) 24 Saat

Gruplar n=6	24saat 7,5µM	24 saat 15µM	24saat 30µM
K	81,83±1,833	81,83±1,833	81,83±1,833
Ligand	60,33±1,606 ^a	35,00±2,516 ^a	31,50±3,013 ^a
Mn(L)2	57,67±2,011 ^a	49,00±1,471 ^a	27,75±3,682 ^a
Cd(L)2	58,67±2,044 ^a	46,00± 4,708 ^a	26,75±3,092 ^a
Cr(L)2	57,67±2,201 ^a	37,75±1,796 ^a	33,25±2,136 ^a

L:Ligand, P< 0.05 göre anlamlı fark vardır; a: Kontrol grubuna göre anlamlı çıkan farklılıkları belirtmektedir.

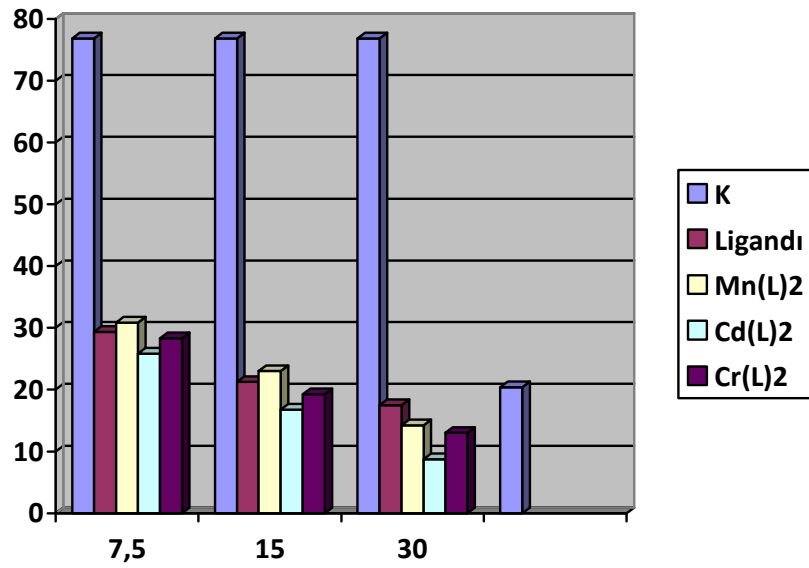


Şekil 4. (1).Gün İçin MCF-7 Hücrelerinin Süreye ve Doza Bağlı Canlılık Durumları

b) 48 Saat

Gruplar n=6	48 saat 7,5µM	48 saat 15µM	48 saat 30µM
K	76,83±2,120	76,83±2,120	76,83±2,120
Ligand	29,33±2,565 ^a	21,25±7,192 ^a	17,50±3,068 ^a
Mn(L)2	30,83±1,352 ^a	23,00±1,957 ^a	14,25±0,816 ^a
Cd(L)2	25,83±1,222 ^a	16,75±4,767 ^a	8,75±3,567 ^a
Cr(L)2	28,33±4,752 ^a	19,25±2,250 ^a	13,00±0,577 ^a

L: Ligand, P< 0.05 göre anlamlı fark vardır; a: Kontrol grubuna göre anlamlı çıkan farklılıkları belirtmektedir.

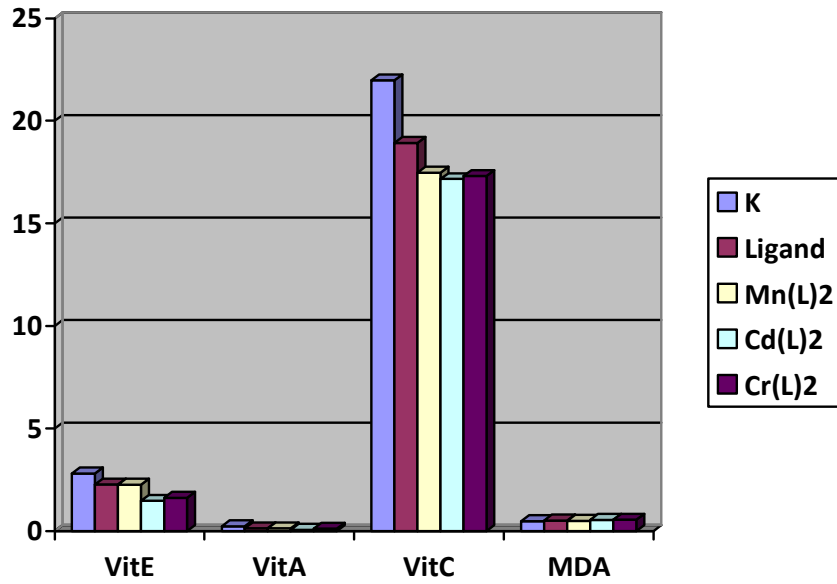


Şekil 5. (2).Gün İçin MCF-7 Hücrelerinin Süreye ve Doza Bağlı Canlılık Durumları

Tablo 3. Maddelerle muamele edilmiş ratların serum MDA, antioksidan vitaminler A, E, C düzeyleri.

Maddeler (n=7)	Vitamin E (mg/lt)	Vitamin A (mg/lt)	Vitamin C (mg/lt)	MDA (mg/lt)
K	2,808±0,139	0,231±0,018	21,977±1,891	0,481±0,0106
Ligand	2,277±0,138 ^a	0,134±0,003 ^a	18,922±0,347 ^a	0,510±0,0117
Mn(L)2	2,267±0,126 ^a	0,135±0,008 ^a	17,471±0,275 ^a	0,500±0,0127
Cd(L)2	1,472±0,140 ^a	0,055±0,004 ^a	17,161±0,227 ^a	0,546±0,0264
Cr(L)2	1,631±0,107 ^a	0,122±0,004 ^a	17,308±0,237 ^a	0,549±0,0249

L: Ligand, P< 0.05 göre anlamlı fark vardır; a: Kontrol grubuna göre anlamlı çıkan farklılıkları belirtmektedir.



Şekil 6. Serum MDA ve antioksidan vitaminler A, E, C düzeyleri.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücresel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücresel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [43].

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranlarına zarar verirler ve değişik hastalıklarla etkilerini gösterirler. Organizmada bu bileşiklerin zararlı etkilerine karşı küçük molekül ağırlıklı radikal tutucuları ve enzimlerden oluşan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin reaktif yapıları ve çok kısa ömürlü olmaları doğrudan tayinlerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir [66].

Bu araştırmada, MCF-7 uygulaması yapılan hidroksiüre türevi 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerinin ve bunların metal komplekslerinin süre ve doza bağımlı antitümör aktivitesinin ve ratların serum antioksidan ve oksidan parametrelerin düzeyleri üzerinde olan etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında farklı etkilere sahip oldukları görüldü.

Tablo 2' ye bakıldığında, maddelerin ve metal komplekslerinin hücrelerin canlılık durumlarında istatistiksel olarak farklılıklar oluşturduğu gözlemlendi. Maddelerin etkili bir antiümör aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 3'e bakıldığında yapılan çalışmada kontrol grubu ile ligandlar ve metal komplekslerinin kıyaslamalarında serum MDA düzeyinde istatistiksel bir fark görülmedi. Fakat antioksidan vitaminler A, E ve C düzeylerinde anlamlı istatistiksel farklılıklar gözlemlendi.

Ölçülen biyokimyasal değerlere bakıldığında, deneylerde kullanılan hidroksiüre türevi 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerinin ve metal komplekslerinin verilen dozlarda (25 mg/kg) ölçülen antioksidan vitamin düzeyleri üzerinde etkili olmuştur. Bu etkilerini serum vitamin düzeylerini azaltarak göstermişlerdir. Serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyi ve GSH-Px enzim aktivitesinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olur [39, 67, 68].

Jeon ve diğ. (2002) antioksidan özellik gösteren maddeleri (naringin ve probukol) diyet ile tavşanlara verdiklerinde bu maddelerin plazma MDA ve A vitamini düzeyini etkilemediğini, E vitamini düzeyini ise, kullanımını azaltarak yükselttiğini gözlemişlerdir [69].

Brandt ve diğ. (1997) sürekli stres altındaki ratların plazma vitamin A düzeylerini ölçmüşler ve on günlük süreç içerisinde vitamin A düzeylerinin $p<0.001$ düzeyinde azaldığını gözlemişlerdir [70].

Yapılan bir çalışmada tiyosemikarbazon türevi ihtiva eden Schiff bazı türevi ve Cd(II) metal kompleksi ratlara yüksek dozlarda deri altına enjekte edildiğinde, Cd(II) metal kompleksinin oksidatif stres oluşturarak, serumda antioksidan vitaminlerden A ve E'nin düzeylerinde azalma, serum MDA düzeyinde ise yükselme meydana getirdiği, testis dokusunda ise hasar oluşturduğu görülmüştür [71].

Başka bir çalışmadaysa, bu Schiff bazı türevi ile Zn(II) ve Cu(II) metal kompleksleri deri altı uygulandığında, ligandın antioksidan parametreleri etkilemediği, Cu(II) kompleksinin Cd(II) kompleksinde olduğu gibi serum vitamin düzeylerini azaltıp, MDA düzeyini ve ayrıca eritrosit GSH-Px enzim aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Zn(II) kompleksinin ise herhangi bir oksidatif stres oluşturmadığı ve serum E vitamini düzeyinde ise bu vitaminin kullanımını azaltarak artışa neden olup bir antioksidan gibi davrandığı, fakat tüm bileşiklerin serumda metiyonin ve izolösin gibi bazı esansiyel amino asitlerin düzeylerini artırdığı ve karaciğer, böbrek ve adren dokularında herhangi bir hasar oluşturmadığı belirlenmiştir [72].

Salisilaldehitden türevlendirilmiş Schiff bazının iki farklı türevi ve metal kompleksleri kullanılan başka bir çalışmadaysa, bu bileşiklerinde özellikle Cu komplekslerinin MCF-7 hücrelerine karşı düşük dozlarda bile antitümör aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu maddelerle muamele edilmiş hücre lizatlarında MDA, vitamin A, E, C düzeyleri ölçülmüş ve genel olarak bu maddelerin hücrelerde oksidatif hasar oluşturduğu tesbit edilmiştir. Özellikle Cu komplekslerinin ortamda oksidatif stres oluşturarak serbest radikal oluşumunu artırdığı görülmüştür. Cu-komplekslerinde Cu(II)'nin indirgenme-yükseltgenme potansiyelinin kompleksin indirgenme-yükseltgenme potansiyelini etkileyerek serbest radikal üretimini tetiklediği daha muhtemel görülmektedir. Burada kullanılan iki tip Cu kompleksinde, birinci tipte, kompleksin yapısına iki molekül ligand girmekte, ikinci tipte ise ligand ve Cu birebir etkileşerek kompleksi oluşturmuştur. Buda aynı konsantrasyonda ikinci tip kompleksde daha az bakır olacağı anlamına gelmektedir. Buradan ligandın yapısının en az bakır toksisitesi kadar etkili olabileceği sonucuna varılmıştır [73].

Tarafter ve ark, Schiff bazı ve onun Cu(II), Zn(II), komplekslerinin antimikrobiyal sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Cu(II) ve kompleksleri T-lymphoslastic lösemi hücresine karşı (CD_{50} 2.20 ve 2.30 $\mu\text{g/ml}$ değeri ile güçlü sitotoksik etki yaparken Schiff bazı (CD_{50} 5,90 μgml^{-1}) değeri ile sitotoksik etki yapmıştır. Aynı zamanda Cu(II) kompleksi kolon kanserine karşıda etkili olmuştur. S- benziltiokarbazat α -tocoferol (vitamin E) ile karşılaştırıldığında da güçlü bir antioksidan olmuştur [74].

Çalışmamızda, ölçülen parametreler ve deney süresince hücrelerin canlılık durumlarına bakıldığında; 24. saat'in 7,5 μM 'lık değerlerinde kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli ölçüde istatistiksel fark gözlemlendi. 24. saat'in 15 μM 'lık değerlerinin ligand ile kontrol grubu ve metal komplekslerinin kıyaslanmasında, 24. saat'in 30 μM 'lık değerlerinin kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli ölçüde istatistiksel fark gözlemlendi. 48 saat'in 7,5 μM 'lık değerlerine bakıldığında kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli ölçüde istatistiksel fark gözlemlendi. 48. saat'in 15 μM 'lık değerlerinin ligand ile kontrol grubu ve metal komplekslerinin kıyaslanmasında, 48. saat'in 30 μM 'lık değerlerinin ligand ile kontrol grubu ve metal komplekslerinin kıyaslanmasında önemli istatistiksel farklılıklar gözlemlendi.

Sonuç olarak, serum MDA ve antioksidan vitamin düzeylerinde, Cd kompleksinin uygulandığı grupta antioksidan vitamin A ve E düzeylerinin oldukça düşük çıktığı görüldü. Ayrıca Cd kompleksinin MCF-7 göğüs kanseri hücrelerine karşı en yüksek antitümör aktivite sergilediği görülmektedir. Bu sonuçlar, bileşiklerin ratlardaki antioksidan parametrelerin serum düzeylerini azaltmasına paralel olarak, antitümör aktivitesini sergilemelerinde, oksidatif hasar oluşturan bir mekanizma ile sitotoksik etki gösterdikleri düşüncesine götürebilir.

Hidroksiüre türevi 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerinin araştırılan birçok farmakolojik özelliklerine ilave olarak araştırdığımız bu parametrelerinde literatür bilgisine katkıda bulunacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

- [1] **Kikelj D., Urleb U.**, 2002, Houben-Weyl methods of molecular transformations. Category 2, Hetarenes and related ring systems, Five-membered hetarenes with one chalcogen and one additional heteroatom. 5th ed. Stuttgart: Thieme; New York: Thieme, Thiazoles, Science of Synthesis, 11; 627-835.
- [2] **Diurno, M.V., Mazzoni, O., Piscopo, E.**, 1993, On antimicrobial activity of 3-phenylspiro[3H-indole-3,2-thiazolidine]-2,4(1H)-diones, *Farmaco*, 48(3);435-441.
- [3] **Amorim, E.L.C., Brandao, S.S.F., Cavalcanti, C.O.M.**, 1992, Synthesis and structure of substituted bromo and nitrobenzyl benzylidene imidazolidinediones and thiazolidinediones *Ann. Pharm. Fr.*, 50(2); 103-111.
- [4] **Amir, M., Dhar N., Tiwari S.K.**, 1997, Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Some New Indole and Indazole Derivatives *Indian J. Chem. Sect B.*, 36; 96-98.
- [5] **Jackson, T., Lawrence Woog, L.W., Trusselle, M.N.**, 2007, Dual aromatase-sulfatase inhibitors based on the anastrozole template: synthesis, in vitro SAR, molecular modelling and in vivo activity, *Org. Biomol. Chem.*, 5;2940- 2952.
- [6] **De Lima, J.G., Perrissin, M., Chantegrel, J., Luu-Duc, C., and Narcisse, G.**, 1994, Synthesis and pharmacological evaluation of some 3-phenacyl-5-benzylidene-thiazolidine- 2,4-diones. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, 44(22);831-834.
- [7] **Devasagayam, T. P. A., Pushpendran, C. K., Eapen, J.**, 1983, Differences in lipid peroxidation of rat liver rough and smooth microsomes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 750; 91-97.
- [8] **Yoshikawa, T., Toyokuni, S., Yamamoto, Y., Naito, Y** (editors), 2000, Free radicals in Chemistry, Biology and Medicine OICA International, London, 580 p.
- [9] **Mazzone, G., Pignatello, R., Panico, A., Penisi, G., Castana, R.**, 1993, Synthesis and local anesthetic activity of alkylaminoacyl derivatives of 2-amino-1,3,4-thiadiazole, *Farmaco*, 48;1207.
- [10] **Flaherty, P. T., Greenwood, D., Manheim, A. L., Wolfe, J. F.**, 1996 , Synthesis and evaluation of N-(Phenylacetyl)trifluoromethanesulfonamides as anticonvulsant agents. *J. Med. Chem.*, 39;1509- 1513.
- [11] **Gravier, D., Dpin, P., Casadebaig, F., Hou, G., Boisseau, M., Bernard, H.**, 1992, Pyrido[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives and 1,2,3,4-tetrahydropyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives: Synthesis and in vitro study of their activity against platelet aggregation, *Pharmazie.*, 47;91- 94.

- [12] **Costa, K., Correa Lima, D.L.B., Galdino, S.L.,** 1995, Substituted imidazolidinediones and thiazolidinediones: synthesis, structure and cytotoxic activity ,J.Pharm.Belg., 50 (1); 5-10.
- [13] **Foroumadi, A., Mirzaei, M., Shafiee, A.,** 2001, Antituberculosis agents II.Evaluation of in vitro antituberculosis activity and cytotoxicity of some 2-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazoles. IL Farmaco.,. 156; 621.
- [14] **Supuran, C.T., Barboiu, M., Luca, C., Pop, E., Brewster, M.E.,** 1996, Syntheses of mono and bis pyridinium salt derivatives of 2-amino-5-(2-aminoethyl)- and 2- amino-5-(3-aminopropyl)-1,3,4-Thiadiazole and their interaction with isozyme II.Eur. J.Med. Chem., 31;597-606.
- [15] **Stewart, J. A., Cythia, C., Ackerly, C., Myers, C.F.,** 1986, Clinical and clinical pharmacologic studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole J. Cancer Chemother., Pharmacol.,16; 287–291.
- [16] **Borras, J., Cristea, T., Gheorghe, A., Supuran, C.T., Tudor, V.,** 1996, Complexes With Biologically Active Ligands. Part 6 Ni(II) Coordination Compounds of Hydrazine and Heterocyclic Sulfonamides as Inhibitors of the Zinc Enzyme Carbonic Anhydrase.Metal Based Drugs., 3;143-148.
- [17] **Alzuet, G., Ramirez, J. A., Borras, J., Carugo, J.,** 1995, Metal Complexes of the Carbonic Anhydrase Inhibitor Methazolamide (Hmacm): Crystal Structure of the $\text{Zn}(\text{macm})_2(\text{NH}_3)_2$. Anticonvulsant Properties of the $\text{Cu}(\text{macm})_2(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})$, J. Inorg. Biochem.,57;219-234.
- [18] **Bennett, J. E ., Rall, T.W., AS Nies, and P . Taylor., Editors, Goodman and Gilman's,** 1990, "Antifungal agents", in"The pharmacological Basis of Therapeutics", 8th.Edition, Pergamon Press,Newyork., pp;1165-1181.
- [19] **Matsumoto, T., Ootsu.K., and Okada, Y.,**1974, Effects of 2,2-(Methylenediimino)bis-1,3,4-thiadiazole (NSC-143019) on Tumor Growth and Immune Responses in Mice., Cancer Chemotherapy Rept., 58;331-334.
- [20] **Steppan, C.M., Lazar, M.A.,**2002, Resistin and obesity-associated insulin resistance.,Trends in Endocrinology &Metabolism .,13(1);18-23.
- [21] **Miyazaki, Y., Glass, L., Triplitt, C.,** 2001, Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in type 2 diabetic patients. Diabetologia, 44;2210-2219.
- [22] **Law, R.E., Meehan, W.P.,** 1996, Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. J.Clin.Invest., 98;1897-1905.

- [23] **Glev, R.W., Dewlin, T.W.,** 1992, Textbook of Biochemistry with clinical Correlation, Second Edition, A Willey and Sons, New York.
- [24] **Ram, V.J., Nath, M.,** 1994, Benzylmalononitriles, a versatile synthon for the synthesis of azoles and azines as antimalarials, Indian Journal of Chem, 33;1048-1052.
- [25] **Halliwell, B., Gutteridge, JMC.,** 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. Biochem J., 219: 1-14.
- [26] **Finkel, T.,** 1998, Effects of Free Radicals on Coronary Artery, Oxygen radicals and signaling. Curr. Opin. Cell. Biol., 10: 248-253.
- [27] **Fantel, A.G.,** 1996, Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. Teratology, 53: 96-217.
- [28] **Poeggeler, B., Pappolla, M. A., Hardeland, R., Rassoulpour, A., Hodgkins, S., Guidetti, P., Schwarcz, R.,** 1999, Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. Brain Res., 815:382-8.
- [29] **Nordberg, J., Arner, E.S.J.,** 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biol. Med., 31: 1287-1312.
- [30] **Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A.,** 1996, Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. Radiat. Res., 145: 532-541.
- [31] **Fridovich, I.,** 1997, Superoxide anion radical ($O_2^- \bullet$), superoxide dismutases, and related matters. J. Biol. Chem., 272: 18515-18517.
- [32] **Rhee, S.G.,** 1999, Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger., Exp. Mol. Med., 31: 53-59.
- [33] **Keithahn, C., Lerchl, A.,** 2005, 5-hydroxytryptophan is a more potent in vitro hydroxyl radical scavenger than melatonin or vitamin C. J. Pineal Res., 38:62-66.
- [34] **Hong, L., Chuan, W., Xiangzhong, L., Xiaoli, X., Chengchun, J., Hua'nian, C.,** 2007, A Novel Electro-Fenton Process for Water Treatment: Reaction-controlled pH Adjustment and Performance Assessment Environ. Sci. Technol., 41(8): 2937-42.
- [35] **Biaglow, J. E., Manevich, Y., Uckun, F., Held, K. D.,** 1997, Quantitation of Hydroxyl Radicals Produced by Radiation and Copper-Linked Oxidation of Ascorbate by 2-Deoxy-d-Ribose Method. Free Radical Biology and Medicine, 22(7):1129-1138.
- [36] **Halliwell, B.,** 2006, Reactive species and antioxidants, Redox biology is a fundamental theme of aerobic life., Plant. Physiol., 141: 312-322.
- [37] **Fridovich, I.,** 1999, Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann. N. Y. Acad. Sci., 893: 13-18.
- [38] **Reiter, R. J., Guerrero, J. M.; Garcia, J. J. Acuna-Castroviejo, D.,** 1998, Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. Ann. NY. Acad. Sci., 854: 410-24.

- [39] **Slater TF.**, 1984, Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.*, 22:1-15.
- [40] **Mc Cord, JM, Fridovich I.**, 1978, The biology and pathology of oxygen radicals. *Annals. Int. Med.*, 89:122-127.
- [41] **Hochstein P., Atallah AS.**, 1988, The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat. Res.*, 202:363-375.
- [42] **Bagchi, K., Puri, S.**, 1998, Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal.*, 4(2):350-360.
- [43] **Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R.**, 2001, Oxidative Stress and Antioxidants in Epilepsy, *Clinica Chimica Acta*, 303, 19-24.
- [44] **Griffiths, H.R., Lunec, J., In Arouma, O.I., Halliwell, B.**, 1998, (Eds.) *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*. London: Oica International, s: 327-366.
- [45] **Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.**, 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol.Interact.*, 160:1-40.
- [46] **Akkuş, İ.**, 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri ,MimozaYayınları , Konya.
- [47] **Surapaneni, K.M., Venkataramana, G.**, 2007, Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients withosteoarthritis. *Indian J. Med. Sci.*, 61:9-14.
- [48] **Dawn BM, Allan DM, Colleen MS., Lippincott Williams & Wilkins.**, 1996, *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*. Baltimore, Maryland.
- [49] **Thomas, M.J.**, 1995, The Role of Free Radicals and Antioxidants.Critical Reviews in Food and Science Nutrition., 35(1-2):21-39.
- [50] **Erenel G., Erbaş D., Arıcıoğlu A.**, 1992, Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi*, 3: 243-50.
- [51] **Harri,E.D.**,1992, Regulation Of Antioxidant Enzymes,Faseb Jour, 6:2675.
- [52] **Aras, K., Erşen, G., Karahan, S.**, 1976, Tıbbi Biyokimya, Vitaminler., A.Ü.Diş.Hek. Fak.,Yayınları, Sayı:4.Ankara.
- [53] **Stratton S.P., Liebler D.C.**,1997, Determination of singlet oxygen-specific versusradical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers:effects of beta-carotene and alpha-tocopherol.*Biochemistry*,36(42):1291-20.
- [54] **Niki, E.**, 1991, Vitamin C as an Antioxidant., *World Rev.Nutr.Diet.*,64:3- 30
- [55] **Levine, M.**,1997, New Concepts in Biology and Biochemistry of Ascorbic Acid.*New Engl. J. Med.*, 314:892-901.
- [56] **Skehan P., Storeng R, Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyol M.R.**, 1990, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening ,*J. Natl. Cancer Inst.*,82:1107–1112.

- [57] **Varvaresou, A., Tsantili-Kakoulidou, A., Siatra-Papastaikoudi, T., Tiligada, E.,** 2000, Synthesis and biological evaluation of indole containing derivatives of thiosemicarbazide and their cyclic 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole analogs. *Arzneimittelforschung.*, 50:48-54.
- [58] **Cesur N., Birteksöz S., Ötük G.,** 2002, Synthesis and Biological Evaluation of some new thiosemicarbazide, 4-thiazolidinone, 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole-3-thione derivatives bearing imidazo[1,2-a]pyridine moiety. *Acta Pharm., Turcica*; 44: 23-41.
- [59] **Turan, N.,** 2008, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [60] **Rostom S. A. F.,** 2006, Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some indeno[1,2-c]-pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 6475-6785.
- [61] **Durore, J.M., and Barth., E,** 1983, Quantitative cell survival from growth curves following anti-neoplastic drug treatment. *Mutat. Res.*, 122;391-396.
- [62] **Karatepe, M.,** 2004, "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC/UV." *LC-GC North America*. 22, 362-5; April.
- [63] **Stocks, J., Gutteridge J.M.C., Sharp, R.J., Dormandly T.L.,** 1974, The Inhibition Of Lipid Autoxidation By Human Serum And Its Relationship To Serum Proteins And Alpha-Tocopherol. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 47:223.
- [64] **Catignani, G.L.,** 1983, Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plasma by Liquid Chromatography, *Clin. Chem.*, 29:14, 708-712.
- [65] **Henning, S.M., Swendseid, M.E., Ivandic, B.T., Liao, F.,** 1997, Vitamins C, E and A and Hemoglobin oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic. Biol. Med.*, 23(6):936-42.
- [66] **Matez, J.M., Gomez, P.C., Casto, N.I.,** 1999, Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clin. Biochem.*, 32, 595-603.
- [67] **Bott, A.B., Green, M.A.,** 1991, Effect of Glutathione Depletion on The Biodistribution of Cu (PTSM) in Rats, *Int. J. Rad. Appl. Inst. B.*, 18 (18), 865-9.
- [68] **Novelli, E.L., Silva, A.M., Monteiro, J.P., Sacomani, L.B., Novellif, J.L.,** 1997, Free Radical Production by Azomethine H : Effects on Pancreatic and Hepatic Tissues, *Free Radic. Res.*, 26 (4), 319-324.
- [69] **Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S.,** 2002, Comparison of Antioxidant Effects of Naringin and Probucol in Cholesterol-Fed Rabbits, *Clin. Chimica Acta*, 317, 181- 190.

- [70] **Brandt, R.B., Doyle, B.A., Chan, W., Poland, J.L., Seibel, H.R.,** 1997, The Effect of Running Stress on Plasma Vitamin A Levels in Rats, *Food and Chemical Tox.*, 35, 459-463.
- [71] **Öner, H. , Karatepe, M., Karatas, F., Öner, J., Yilmaz, İ., Cukurovalı, A.,** 2005, “Effects on the Rat Testes of Thiosemicarbazone Derivative Schiff Base (4-(1-Phenyl-Methylcyclobutane-3-yl)-2-(2-ydroxybenzylidenehydrazino)Thiazole) and its Cadmium (II) Complex.” *Cell Biochem. and Function*, 23(6), 427-433.
- [72] **Karatepe, M., Karatas, F.,** 2006, Antioxidant, Pro-Oxidant Effect of the Thiosemicarbazone Derivative Schiff Base (4-(1- Phenylmethylcyclobutane-3-yl)-2-(2 Hydroxybenzylidenehydrazino)Thiazole) and its Metal Complexes on Rats.” *Cell Biochem. And Function*, 24(6), 547-554.
- [73] **Çakmak, H.,** 2008, 1,2-Bis(P-Aminofenoksi)Etan Türevi Schiff Bazları Ve Metal Komplekslerinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [74] **Tarafder, M.T.H., Kasbollah, A. Crause, K.A., Ali, A.M., Yamin, B.M., Fun, H.K.,** 2002, Synthesis and Chelation of Zn (II) and Cd (II) Complexes of S-benzyl-β-N(2-pyridyl)methylendithiocarbamate (HHNS) biactivity of HHNS Schiff base and its Zn (II), Cu (II) and Cd (I) Complexes and the X-ray Structure of the [Zn(NNS)₂] Complexes, *Polyhedron*, 20(18);2363-2370.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girerek 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans'a başladım. 2009 yılının ocak ayında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.