

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBONİL VE İMİN GRUBU TAŞIYAN
SİKLOFOSFAZEN TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN QUERSETİN
VE RESVERATROL GİBİ ANTİOKSİDANLARLA
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Zehra GÖKÇE

Anabilim Dalı: Biyoloji
Program: Zooloji

TEMMUZ-2010

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBONİL VE İMİN GRUBU TAŞIYAN SİKLOFOSFAZEN TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN QUERSETİN VE RESVERATROL GİBİ
ANTİOKSİDANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehra GÖKÇE
(07210104)

Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Zooloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:14 Haziran 2010

TEMMUZ-2010

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARBONİL VE İMİN GRUBU TAŞIYAN SİKLOFOSFAZEN TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN QUERSETİN VE RESVERATROL GİBİ
ANTIOKSİDANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Zehra GÖKÇE

(07210104)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14 Haziran 2010

Tezin Savunulduğu Tarih: 7 Temmuz 2010

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Orhan GÖRGÜLÜ (F.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU (F.Ü)

TEMMUZ- 2010

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını bana öneren, çalışmalarım esnasında beni yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ'a, teşekkür ederim. Tezimde kullandığım fosfazen bileşiklerin sentezini gerçekleştiren, Harran üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Fatih ASLAN ile Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali İhsan ÖZTÜRK'e ve fosfazenlerin sentezinde desteği olan Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof Dr. Mustafa ARSLAN'a, teşekkür ederim. Ayrıca fosfazenlerin antimikrobiyal etkilerinin ortaya çıkarılmasında yardımlarını esirgemeyen Pınar ERECEVİT ve Ayşe Nilay ÖNGANER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana her türlü maddi, manevi destek veren ve sabır gösteren aileme içtenlikle teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmamın bir kısmını TBAG-107T407 no'lu projeye destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Bu çalışma, TBAG-107T407 no'lu proje ile desteklenen araştırmanın bir kısmını oluşturmaktadır. Araştırmamıza TBAG-107T407 no'lu proje ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Zehra GÖKÇE
ELAZIĞ-2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Fosfazenlerin Tarihçesi.....	2
1.2. Schiff Bazı Oluşum Reaksiyonu.....	3
1.3. Fosfazenlerin Kullanım Alanları ve Önemi.....	3
1.4. Quersetin.....	5
1.5. Resveratrol.....	7
1.5.1. Biyolojik Aktivite.....	8
1.5.2. Antioksidan Aktivite.....	9
1.5.3. Anti-Karsinojen Aktivite.....	9
2. MATERYAL ve METOT.....	11
2.1. Kullanılan Malzeme Araç ve Gereçler.....	11
2.2. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi.....	11
2.3. <i>In vitro</i> Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	12
2.4. <i>In vitro</i> Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) ölçümü.....	12
2.5. Deneysel Ortamlardaki LPO Miktarının HPLC ile Analizi.....	13
2.6. Reaksiyon ortamındaki yağ asitlerinin izolasyonu ve metilasyonu.....	13
2.7. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi.....	13
2.8. Antimikrobiyal Aktivite.....	14
2.9. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması.....	14
2.10. İstatistik Analiz.....	14
2.11. TBAG 107T407 Nolu TÜBİTAK Proje Kapsamında Sentezlenen ve <i>In Vitro</i> Deneyde Kullanılan Fosfazenlerin Moleküler Yapıları.....	15
3. BULGULAR.....	36
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
5. KAYNAKLAR.....	50
6. ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Quersetinin moleküler yapısı.....	5
Şekil 2. Resveratrol'ün kimyasal yapısı ve DPPH radikalini etkisizleştirilmesi.....	7
Şekil 3. DPPH radikalinin etkisizleştirilmesi.....	12
Şekil 4. Hekza (4-formilfenoksi)Siklotrifosfazen (PHFOS)	15
Şekil 5. 4-aminobenzonitril (PHF1).....	15
Şekil 6. 2. 2-aminobifenil (PHF2)	16
Şekil 7. 2-amino-4-klorofenol (PHF3).....	16
Şekil 8. 4-aminoasetofenon (PHF4)	17
Şekil 9. 2-aminofenol (PHF5)	17
Şekil 10. 4-aminofenol (PHF6)	18
Şekil 11. Hekza(2-Formilfenoksi)Siklotrifosfazen (SFOS)	18
Şekil 12. 4-aminobenzonitril (SF1)	19
Şekil 13. 2-aminobifenil (SF2).....	19
Şekil 14. 2-amino-4-klorofenol (SF3).....	20
Şekil 15. 4-aminoasetofenon (SF4).....	20
Şekil 16. 2-Aminofenol (SF5).....	21
Şekil 17. 4-aminofenol (SF6)	21
Şekil 18. Hekza[2-metoksi-4-(p-siyanofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VFOS).....	22
Şekil 19. Hekza [2-metoksi-4-(o-feilfenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF1).....	22
Şekil 20. Hekza[2-metoksi-4-(4-asetofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF2)	23

Şekil 21. Hekza[2-metoksi-4-(2-hidroksi-4-klorofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF3)	23
Şekil 22. Hekza[2-metoksi-4-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF4).....	24
Şekil 23. Hekza[2-metoksi-4-(4-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF5)	24
Şekil 24. 4-(2-aminoetil)morfolin (VF6)	25
Şekil 25. Hekza(4-Bromo-2-Formil-Fenoksi)Siklotrifosfazen (BrFOS).....	25
Şekil 26. 1. 4-aminobenzonitril (BrF1).....	26
Şekil 27. 2. 2-aminobifenil (BrF2).....	26
Şekil 28. 2-amino-4-klorofenol (BrF3)	27
Şekil 29. 4-aminoasetofenon(BrF4)	27
Şekil 30. 2-aminofenol (BrF5).....	28
Şekil 31. 4-aminofenol (BrF6)	28
Şekil 32. Hekza[2-(4-merkaptofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (SHF).....	29
Şekil 33. Hekza[2-(5-izoquinolinilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (QF).....	29
Şekil 34. Hekza[2-(6-(1H-indazol)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (INDF).....	30
Şekil 35. Hekza[2-(2-(9H-fluoren)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (FLF).....	30
Şekil 36. Hekza[2-(2-(1,3-benzotiazol)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (BNF).....	31
Şekil 37. Hekza[4-bromo-2-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HPF).....	31
Şekil 38. Hekza[4-bromo-2-(4-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HPFF).....	32
Şekil 39. 4-aminobenzoik asit (ABAF).....	32

Şekil 40. Hekza[4-bromo-2-(p-siyanofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (SYPF).....	33
Şekil 41. Hekza[4-bromo-2-(o-feilfenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (BFF).....	33
Şekil 42. Hekza[4-bromo-2-(2-hidroksi-4-klorofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HKFF).....	34
Şekil 43. Hekza[4-bromo-2-(4-asetofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (AFF).....	34
Şekil 44. 4-(2-aminoetil)morfolin (AEMF).....	35
Şekil 45. Yağ asitlerinin GC kromatogramı.....	36
Şekil 46. Vanilya süstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin LPO oluşumu engelleme üzerine etkileri.....	38
Şekil 47. Süstitüe salisilat grubu taşıyan ve OH grubu bulunduran SF3, SF5, SF6 fosfazenler ile Resveratrol'ün MDA-TBA oluşumunu etkilemesi ile ilgili karşılaştırma.....	40

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. PHID grubu taşıyan fosfazenlerin MDA-TBA ve yağ asidi düzeyleri üzerine etkileri.....	36
Tablo 2. PHID grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri.....	37
Tablo 3. Salisilât grubu taşıyan fosfazenlerin MDA-TBA üzerine etkileri ve DPPH [•] radikalini temizleme aktiviteleri.....	37
Tablo 4. Yapılarında OH grubunu taşıyan salisilât sübstitüe fosfazenlerin MDA-TBA ve yağ asidi düzeyleri üzerine etkileri	38
Tablo 5. Yapılarında OH grubunu taşıyan salisilât sübstitüe fosfazenlerin MDA-TBA ve yağ asidi düzeyleri üzerine etkileri	39
Tablo 6. Sübstitüe vanilin grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri	39
Tablo 7. Salisilât grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri.....	40
Tablo 8. Sübstitüe gruplarında brom bulunduran fosfazenlerin MDA-TBA ve DPPH [•] radikalini temizleme aktiviteleri.....	41
Tablo 9. Sübstitüe gruplarında brom bulunduran fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri....	41
Tablo 10. Farklı sübstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin doymamış yağ asitlerinin kullanıldığı ortamda MDA-TBA oluşumu üzerine etkileri (nmol/ml).....	42
Tablo 11. Farklı sübstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri.....	42
Tablo 12. Farklı sübstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri	43

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARBONİL VE İMİN GRUBU TAŞIYAN SİKLOFOSFAZEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN QUERSETİN VE RESVERATROL GİBİ ANTIOKSİDANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Zehra GÖKÇE
Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2010, Sayfa: 57

Bu çalışmada, sübstitüe siklofosfazen bileşiklerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri araştırıldı. Ayrıca quersetin ve resveratrol gibi güçlü antioksidan aktiviteye sahip moleküllerle karşılaştırma yapıldı.

Bulgularımızda, sübstitüe gruplarında OH ve metoksi grubu (H₃CO) bulunduran fosfazen moleküllerin LPO oluşumunu etkili şekilde düşürdüğü saptandı (p<0.001). LPO düzeyinin azalışına bağlı olarak *in vitro* ortamdaki oleik asit (18:1, n-9), linoleik asit (18:2, n-6) ve linolenik asit (18:3, n-3)'ün miktarlarının hem fosfazen moleküllerin bulunduğu gruplarda hem de resveratrol grubunda korunduğu saptandı. Rutin ve quersetin gibi antioksidan moleküllerin, LPO düzeyini Fenton R grubuna göre belirgin düzeyde azaltmasına rağmen (p<0.001), yağ asidi üzerinde koruyucu etkiye sahip olmadığı belirlendi. *In vitro* ortamda LPO düzeyini azaltan fosfazen moleküllerin diğerlerine göre daha etkili şekilde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edildi. Aynı madde gruplarının hem antioksidan hem de antimikrobiyal etkiye sahip olmasını sübstitüe gruplardaki OH ve H₃CO gruplarından kaynaklandığı sonucuna varıldı. Diyetle bulunan bazı doğal antioksidanlar da moleküler yapılarındaki OH grupları sayesinde ortama elektron vererek serbest radikal moleküllerini etkisiz hale getirirler.

Sonuç olarak kimyasal olarak sentezlenen bileşik ya da bileşik gruplarının doğrudan canlı sisteme uygun olduğunu söylenemez. Ayrıca bu moleküller değişik biyolojik etkiye sahip olabilirler. Fosfazenler insan diyetinde kullanılamaz. Fakat bu bileşiklerin çoğunluğu canlı vücudu içerisinde değişik amaçlarla kullanılabilir. Yeni sentezlenmiş bir bileşik canlı sisteme uyum sağlayıp sağlamadığı bu tip çalışmalarla ortaya çıkarılıp kullanıldığı zaman herhangi bir sorun ile karşılanılmaz. LPO düzeyini artırıcı bir molekül canlı sistemde kullanılmaya kalkışıldığında, faydasından çok zararlı sonuçlar ortaya çıkarabilir. *In vitro* ortamda hücre içi şartlar oluşturularak yapılan bu araştırmanın sonucu doğrudan *in vivo* şartlar ile ilişkilidir. Sonuçlar, bu şekilde dikkate alındığında deney sonuçlarımızın bilime katkısı çok anlamlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Fosfazenler, Lipid peroksidasyon (LPO, MDA-TBA), Yağ asitleri, Resveratrol, Quersetin, Antioksidan kapasite, Antimikrobiyal etki, DPPH radikali.

SUMMARY

MSc Thesis

COMPARISON OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CYCLOPHOSPHAZENE ANALOGUE WHICH CARRY CARBONYL AND IMINE GROUP WITH ANTIOXIDANTS LIKE QUERSETIN AND RESVERATROL

Zehra GÖKÇE

Firat University Institute of Science

Department of Biology

2010, Page: 57

In this study, the effects of antioxidant and antimicrobial of substituted cyclophosphazene compounds were investigated. In addition, a comparison was made with molecules that have powerful antioxidant activity such as quersetin and resveratrol.

In our findings, phosphazene molecules that contain OH and metoksi groups (H_3CO) in substitute groups decrease LPO formation effectively ($p < 0.001$). Depending on the decrease of the level of LPO, it's detected that the quantities of oleic acid (18:1, n-9), linoleic acid (18:2, n-6) and linolenic acid (18:3, n-3) *in vitro* environment are protected both in the groups that phosphazene molecules exist and in the group of resveratrol. It's determined that antioxidant molecules such as rutin and quersetin have no protective effect on fatty acid, although they apparently decrease the level of LPO according to Fenton R group ($p < 0.001$). It's detected that the decrease of LPO level *in vitro* environment has antimicrobial effect in a more effective way than others. It is concluded that the same substance groups having both antioxidant and antimicrobial effect are because of the groups of OH and H_3CO in substituted groups. Some natural antioxidants in the foods also defuse free radical molecules by giving electrons to the environment owing to the OH groups in their molecular structures.

In conclusion, it can not be said that compounds or compound groups that are synthesized chemically are directly suitable to living organisms. In addition, these molecules may have different biological effects. Phosphazenes can not be used in human dieting. However, most of these compounds can be used in different aims, in the living system. When a newly synthesized compound brought out whether or not adjusted to living system by these kinds of studies is used, there appears no problem. When a molecule increasing the LPO level is tempted to be used in living system, it may bring out more harmful results than beneficial ones. The result of this experiment made with forming in-cell conditions *in vitro* is directly related to the conditions of *in vivo*. We think that when the results are handled in this way, our experiment results' contribution to science will be more meaningful.

Key Words: Phosphazene, Lipid peroxidation (LPO, MDA-TBA), Fatty acids, Resveratrol, Quersetin, Antioxidant capacity, Antimicrobial effect, The radical of DPPH.

1.GİRİŞ

Anorganik ve organik kimya arasında yer alan fosfazenler aynı grup azot ve fosfor atomlarının oluşturduğu $(R)_3 P=NR$ (R:halojen, alkoksi, amino, alkil ve aril) yapısındaki bileşiklere denir [1]. Fosforun azot ile yaptığı bileşikler üç ana grupta incelenebilir. P ile N arasındaki bağ sayısı tek olduğu zaman H_2N-PH_4 fosfazan, çift olduğu zaman fosfazen $HN=PH_3$, üç olduğu durumda fosfazin $N\equiv PH_2$ olarak adlandırılmaktadır. Fosfazenler de monofosfazenler, siklofosfazenler ve polifosfazenler olmak üzere üç grupta incelenebilir. Siklo veya polifosfazenler en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışmanın bulunduğu P-N bileşikleridir [2-5]. Bu bileşikler her fosfor atomuna iki tane süstitüentin bağlı olduğu halkalı veya düz zincirli bileşiklerdir. Azot üzerinde süstitüent bulunmamaktadır. Bu tür P-N yapısı daha büyük molekülü bileşikler oluşturmaya yatkındır. Gözlenebilen yapılar trimer, tetramer veya daha az olmakla beraber daha büyük halkalı fosfazenler şeklindedir. Süstitüent olarak halojen, amino, azido, alkoksi, ariloksi, alkil amino, alkil veya aril gibi organik gruplar veya bunların bir karışımı olabilir.

Monofosfazenler, $RN=PR_3$ yapısına sahiptirler. Monofosfazenler açık ortamda hemen bozunan ve en az çalışma yapılan bileşik türüdür [6]. Sentezi, izolasyonu ve çalışması genellikle zor olan bileşiklerdir. Fakat az da olsa çalışma yapılmıştır. Birçok temel özellikleri halkalı ve polimerik fosfazenlere benzer. Halkalı fosfazenlere göre daha kararsız yapıdadırlar. Bağ yapıları incelendiğinde halkalı ve polimerik fosfazenlerde görülen bağ yapısının hemen hemen aynısı olduğu söylenebilir. Polifosfazenler atmosferik oksijen ve neme karşı kararlı, elastomerik ve termoplastik yapılardır [7].

Yan grupta halojenlerin (F, Cl, Br) olduğu halo fosfazenlerin fosfor halojen bağı aktif olduğundan organik gruplarla nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarıyla (S_N^1 veya S_N^2) organofosfazenler sentezlenmektedir. Alkoller, fenoller, aminler, (primer veya sekonder), tiyoller, organometalikler, karboksilik asitler ve amidler gibi organik gruplarla fosfazenlerin reaksiyonları incelenmiştir. Bu reaksiyonların en fazla çalışma yapılan organik gruplar alkoller, fenoller ve aminlerdir. Karboksilik asitlerle ve amidlerle reaksiyonlarda istenilen süstitüe fosfazen bileşikleri elde edilememiştir. Bu reaksiyonlarda sentezlenen organofosfazenler poliorganofosfazen sentezi için birer monomerdirler.

Karbonil, imin, oksim gibi kromofor grup taşıyan organofosfazen bileşikler az sayıda sentezlenmiştir. Özellikle karbonil taşıyan fosfazen türevlerinden karbonil grubunun

indirgenmesi, yükseltgenmesi ve reaksiyonu sonucunda çok sayıda yeni fosfazen türetilir. Yan grubun yapısına bağılı olarak fosfazen türevinin özellikleri de farklılık gösterir.

1.1. Fosfazenlerin Tarihçesi

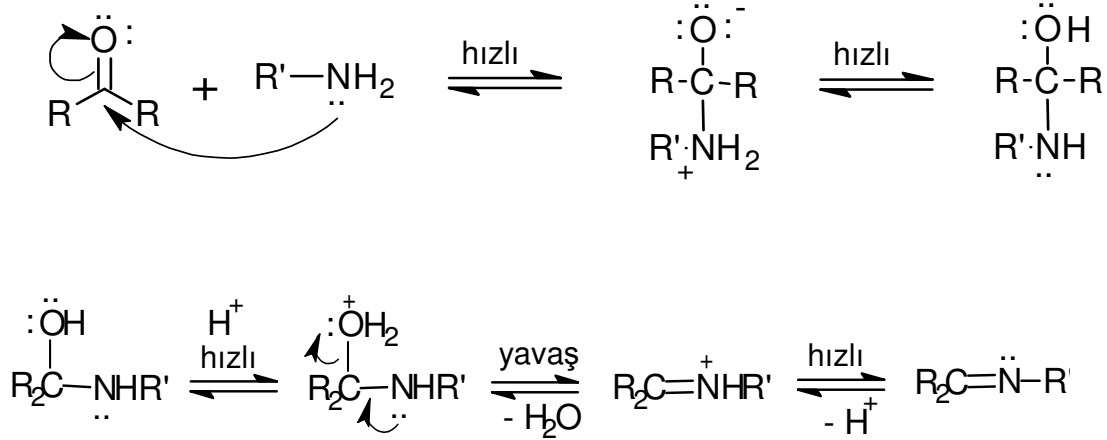
Sentez edilen ilk fosfazen bileşikler, amonyak (NH_3) ile fosfor pentaklorürün (PCl_5) reaksiyonundan oluşan, $(\text{NPCl}_2)_n$ klorofosfazenlerdir. Bu reaksiyon ilk olarak 1834’ de Fose, Wöhler ve Liebig tarafından çalışılmıştır.

1864’te Gerhardt ve Laurent molekül formülünün $(\text{NPCl}_2)_3$ olduğunu tespit etmişlerdir. Fosfazen kimyasındaki önemli gelişmeler 19. yüzyılın başlarında görülmüştür. Bu yıllarda Gladstone, Besson, Rossot ve Couldridge tarafından birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle Stokes, fosfazenlerin yer değiştirme, hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonları üzerinde çalışmıştır. 1924’te Schene ve Romer fosfor pentaklorür ve amonyum klorürden klorofosfazenleri sentezlediler. Bu reaksiyonun mekanizması 1960’lı yıllara kadar araştırılmamıştır. Benzer şekilde fakat farklı bir metotla florofosfazenler, $(\text{NPF}_2)_n$, 1956’da hazırlanmıştır. Bromofosfazenlerin ilk sentezi de bu yıllarda gerçekleştirilmiştir. 1950’li yılların ortasından sonra halofosfazenlerin yer değiştirme reaksiyonları üzerindeki çalışmalarda da hızlı bir artış olmuştur. İlk olarak bir fosfazenin x-ışınıyla yapısının aydınlatılması Meyer, Lotmer ve Pankow tarafından 1936’da gerçekleştirilmiştir. Onlar yüksek molekül ağırlıklı $(\text{NPCl}_2)_n$ polimerinin zincir uzunluğunu ölçmüşler ve bu değerden zincir açıları ve P-N bağının uzunluğunu hesaplamışlardır.

1939’dan sonra Ketelaar ve Vries, kloro-süstitüe tetramer’in, $(\text{NPCl}_2)_4$, x- ışınıyla yapısını aydınlatmış ve bu çalışma ile bağ uzunlukları ve bağ açılarını tam olarak bulmuşlardır. Trimerin yapısı Brockway ve Bright tarafından 1943’te elektron difraksiyon metodu kullanılarak incelenmiştir. Fakat 1958’de Wilson ve Carroll tarafından x-ışınları ile inceleninceye kadar yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sahada x-ışını metodunun kullanımı, çalışmaları hızlandırmıştır. Fosfazenlerin yapısının aydınlatılmasında kullanılan diğer teknikler IR, Raman, UV, NMR, ESR, Termal analiz ve Kütle spektroskopisi sayılabilir. Fosfazenlerdeki bağlanmaya ilişkin ilk önemli çalışmalar 1958 ve 1961 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde bağlanma özellikleri ve yapılarının aydınlatılması son derece kolaylaşmıştır.

1.2. Schiff Bazı Oluşum Reaksiyonu

NH₃ ile tepkimelerden elde edilen iminler, dayanıklı değildir ve bekletildiğinde polimerleşirler. Ancak amonyak yerine birincil aminler kullanıldığında, daha dayanıklı olan sübstitüe iminler (schiff bazı) meydana gelir. Aromatik aldehytlerle (benzaldehyt gibi) aril aminler (anilin gibi) daha dayanıklı iminleri oluştururlar, ancak diğer aldehyt, keton ve birincil aminler de kullanılabilirler.



İmin oluşumunun mekanizması, iki basamaklı bir işlemdir. İlk basamak, nükleofilik aminin kısmi pozitif yük taşıyan karbonil karbonuna katılması, sonra azotun bir proton kaybetmesi ve oksijene bir proton bağlanmasıdır. Şayet çözelti çok asidik ise amin derişimi ihmal edilecek kadar azalır. Böyle olduğunda, normalde hızlı olan katılma basamağı yavaşlar ve tepkime dizininde hız belirleyen basamak haline gelir. İkinci basamakta ise asit derişimin artması ikinci basamağın hızını artırır. OH kuvvetli bir baz ve zor ayrılabilir bir grup iken, H₂O⁺ zayıf bir baz ve kolay ayrılan bir grup olup, H₂O şeklinde kolayca ayrılabilir. Bu işlem için en uygun pH 4-5 aralığıdır [8].

1.3.Fosfazenlerin Kullanım Alanları ve Önemi

Schiff bazları ve kompleksleri, tersinir olarak oksijen bağlamaları [9-10] olefinlerin hidrojenlenmesindeki katalitik aktiviteleri [11], elektrokimyasal elektron transferi [12], foto kromik özellikleri [13] ve bazı toksik metallerle kompleks oluşturmaları [14] gibi önemli pek çok konuda çalışılan bir konudur. Ayrıca ligandların önemli bir sınıfıdır ve günümüze kadar koordinasyon kimyası içerisinde çok geniş bir çalışma alanına sahip olmuştur [15-17]. Bu bileşikler supramoleküler bileşiklerin eldesinde son derece önemlidir [18-22]. Schiff bazı türevlerinin biyolojide, klinik, farmokolojik ve analitik bakımdan çok önemli bileşikler

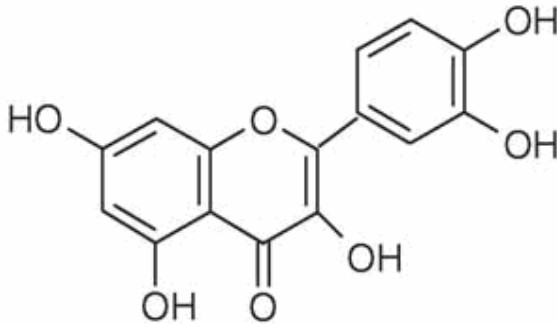
olduğu daha önceki çalışmalarda kaydedilmiştir [21]. 4-Aminoantipirin komplekslerinin kullanıldığı bazı ilaç aktif maddelerinin serbest organik bileşiklere nazaran bakteri ve mantarlarda daha yüksek bir aktivite gösterdiği bulunmuştur [21]. Polimerik olmayan halkalı ve lineer fosfazenler antikanserojen ajanlar, böcek öldürücü, pestisitler ve gübre gibi biyolojik olarak önemli maddelerdir [23]. Ayrıca bu fosfazenler katalizör, boyalar ve crown eter için destek; yer değiştirme reaksiyonları için faz transfer katalizörü; fosfazen dendimerleri için çıkış maddesi; anyonik polimerizasyon için termal başlatıcılar; ışığa hassas maddeler gibi birçok kullanım alanı vardır [23].

Organofosfazenlerin ve Schiff bazı bileşiklerinin birçok uygulama alanları olmakla birlikte özellikle antikanserojen, sitotoksik, anticonvulsant, antiproliferative, antifungal ve böcek ilaçları gibi biyolojik alanlarda kullanılmaktadır [23]. Bazı fosfazen türevleri sıvı kristal, gaz-sensör, faz transfer katalizörü, optik karakter ve biyomedikal madde olarak kullanılabilirler. Aminofosfazenler, silikatlarla yarı seramik madde, iplik, dokuma kumaş, ıslanmaya ve aleve dayanıklı kumaş yapımında, esnek film, kalp kapakğı ve vücudun diğer kısımları için yapay organ yapımında, antitümör aktivitesine sahip olduğundan antikanserojen ilaçlarda, sıvı kristal ve gaz-sensör özelliği gösteren malzeme ve ameliyatlarda dikiş ipliği olarak kullanılmaktadır [24-25]. Çalışmada kullanılacak bileşikler $-CH=N-$ bağı içeren ve genel olarak Schiff bazları grubuna ait bileşiklerdir. Bu tip bileşikler aldehit ve ketonların primer aminlerle reaksiyonları sonucu oluşan ve zayıf bazik özellik gösteren kondenzasyon ürünleridir. Schiff bazlarının kimyanın birçok alanında, tıpta, sanayide çok geniş kullanım alanı bulması, bu bileşiklere olan ilgiyi artırmış ve Schiff bazları ve metallerle oluşturdukları komplekslerin sentezine yönelik son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır. Schiff bazları boya sanayinde, kauçuk üretiminde, ilaç sanayinde, elektronik endüstrisinde, plastik sanayinde, sıvı kristal teknolojisinde, madeni yağlarda, oksijen bağlanmaya yatkın olduklarından oksijen taşıyıcı olarak, bitkilerde hastalıklara ve ürün kayıplarına neden olan patojen mantarlara karşı mücadelede, organizma için önemli olan K-amino asitlerin sentezinde, kimyada nitel ve nicel tayinlerde, radyoaktif maddelerin zenginleştirilmesinde, polimer ve pestisitlerin üretiminde son yıllarda büyük oranda kullanılmakta ve giderek önemi artmaktadır.

1.4. Quersetin

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücre veya organizmalar koruyucu mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir [26]. Antioksidanlar içinde, hücredeki çeşitli enzim molekülleri ve tiol bileşikler ile bitkisel kaynaklardan alınan vitaminler, polifenoller, karotenoidler ve bazı fitokimyasallar yer alır.

Polifenoller; antosiyanin, fenolik asid, lignans ve flavonoidleri ve stillbenleri içeren geniş bir antioksidan sınıfıdır. Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleridir ve bitki polifenoller, radikal yok ediciler olup çok etkili antioksidanlardır [27-28]. Polifenoller, yapısında iki veya daha fazla fenolik halka bulunduran kompleks yapılardır [29]. Polifenoller, flavonoidler ve taninler olarak bitkilerde özellikle meyvelerde renk pigmenti ve antioksidan olarak bol miktarda bulunurlar [30]. Flavonoidler, yüksek antioksidan aktiviteye sahip, yapısında fenil halkalarına bağlı bulunan hidroksil gruplarına göre adlandırılan ve sınıflandırılan büyük moleküllerdir [31-32].



Şekil 1. Quersetinin moleküler yapısı

Antioksidan aktiviteleri aromatik –OH gruplarının bağlanma yerleri ve sayılarına göre farklılıklar göstermektedir [33]. Flavonoidler elektron transfer reaksiyonları ile pirogallol, katekol, 4-okso ve 3-hidroksil gruplarının konjugasyonu ile 2,3-çift bağlı yapılar ve yer değiştirme ile değişik rezonans yapıları haline dönüşebilirler [34]. Flavonoidlerin elektrokimyasal ölçümler sayesinde antioksidanlar için fizikokimyasal ve kinetik parametrelerin (redoks potansiyeli, elektron transfer sayısı, hız sabiti vb.) belirlenmesi ve bu sayede antioksidan aktivitelerinin, reaksiyon mekanizmalarının belirlenmesi mümkündür [35]. Fenollerin oksidasyon mekanizmaları oldukça ilginç özellikler göstermektedir. Oksidasyon

sadece bir elektron üzerinden olabileceği gibi iki elektronun aynı anda kaybı veya iki basamaklı olarak birer elektron kaybı şeklinde de olabilir [36].

Flavonoidler bitkilerin ikincil metabolitleridir ve oldukça yaygın türlerdir [37-38]. Pek çok flavonoid türevlerinin kuvvetli antioksidan özellikleri vardır ve önemli bir biyolojik etkiye sahiptirler [39-40]. Çevremizde doğal şekilde okside olan bu türler biyolojik işlemler olarak radikalik reaksiyonlarla okside olurlar, bazı durumlarda bu oksidasyon ürünleri zararlıdır [40]. Flavonoid türevi bileşiklerin antioksidan kapasiteleri, sulu ortamda serbest radikal halinde bulunabilme ölçüleri ile değerlendirilir [41].

Sulu ortamda çalışmaları antioksidatif olarak daha doğru olmasına rağmen quersetin organik çözücüler ortamında da çalışılabilen bir flavonoid türevidir. Flavonoid türevlerinin organik veya sulu çözücülerde çözülmesi ile hazırlanan çözeltileri yardımı ile yapılan çalışmalar sonucunda oldukça zengin bir kimyasal bilgiye ulaşılmıştır [42]. Elektrokimyasal olarak da quersetinin antioksidan özellikleri ile ilgili olarak biyolojik aktiviteleri kullanılarak çalışmalar yapılabilmektedir. Literatürlerde ağırlıklı olarak flavonoidlerin sulu çözeltilerindeki elektrokimyasal özelliklerine ait bilgiler mevcuttur [43]. Quersetinin elektrokimyasal özellikleri çok da anlaşılır değildir, çünkü hem oksidasyon ürünleri hem de tersinirliği her zaman aynı değildir. Quersetin literatürlerde genellikle oksidasyon sonrası büyük oranda oluşan o-kinon ürün yapısı [43-45] veya nükleofilik katılma reaksiyonları sonucu oluşan ürünler ile molekülü yeniden düzenlenmiş halde verilir [46].

Sonuç olarak, flavonoidlerin çözeltileri hazırlanması sırasında su veya etanol gibi bir organik çözücü kullanılmasının antioksidan aktiviteye ve oksidasyon mekanizmasına özellikle de o-kinon yapısının oluşumuna büyük etkileri vardır [47]. Quersetin bitki alemi içerisinde flavonoid türevlerinin en bol bulunan molekülüdür. Quersetin bazı flavonoid türevlerinin, yapısına şeker molekülleri bağlanması ile temel yapılarını da oluşturur. Bu yapılar arasında, rutin, quersetin, izoquersetin ve hiperosit sayılabilir ve bu sayede molekülün aktivitesi çok keskin bir şekilde değişir ve genellikle de düşer. Flavonoidler üzerinde yapılan aktivite çalışmalarında hemen hemen her tür antioksidan aktiviteye sahip bulunurken hiçbir türün aktivitesi quersetin kadar büyük bulunamamıştır.

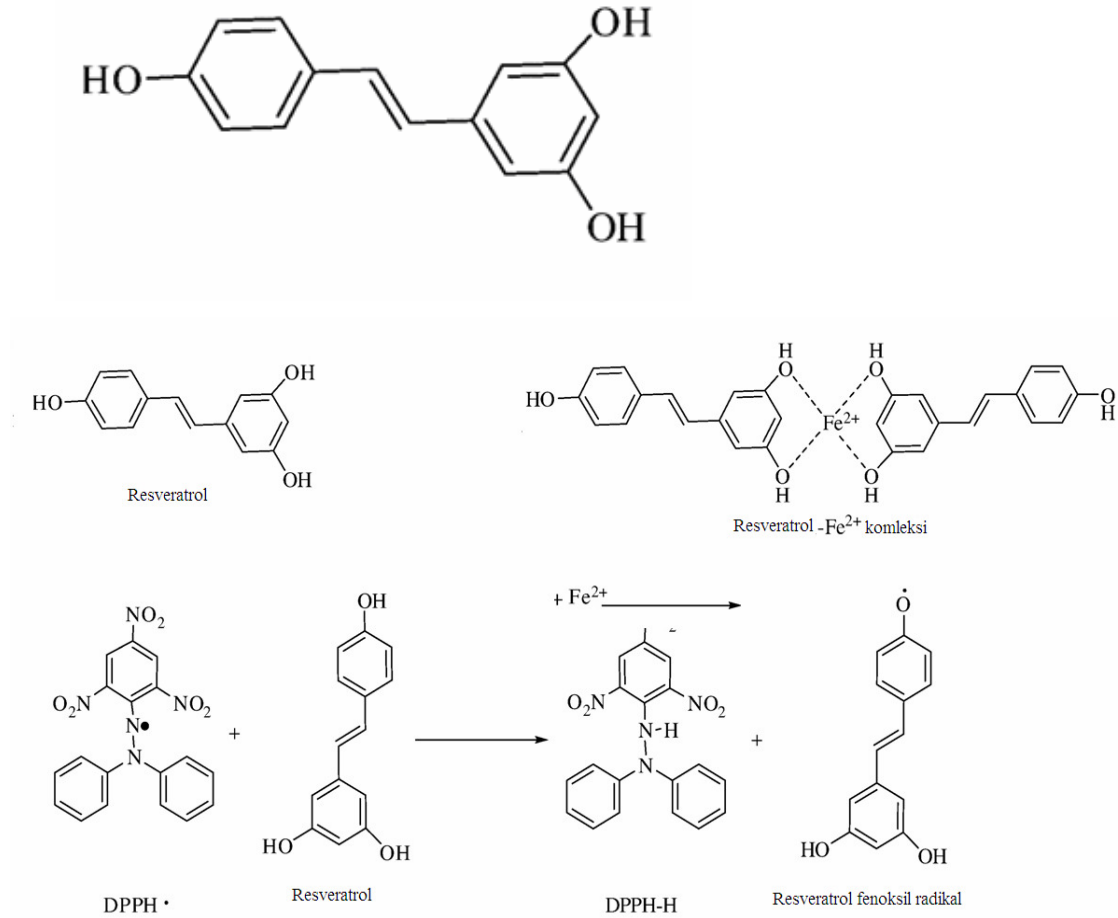
Quersetin insan sağlığı için son derece önemli bir yere sahiptir, öyle ki quersetin kalp krizini engelleyici, antikanser aktiviteye sahip, antiülser etkileri olan bir moleküldür [45]. Antioksidan etkisinin yüksek oluşu ve buna bağlı olarak da tıpta ve diğer alanlarda fazlaca kullanılması nedeni ile quersetin flavonoid türevleri içerisinde en bilinen tür ve üzerinde en çok çalışılan türdür [48-50]. Quersetin suda az çözünen fakat organik çözücülerde (asetonitril,

etanol vb.) iyi çözünen bir yapıya sahiptir, eğer su kullanmak gerekiyorsa genellikle etanol ile suyun karışımı çözücü olarak kullanılır. Sebze ve meyvelerde özellikle kırmızı elma, domates ve muzda fazlaca bulunur.

1.5 Resveratrol

Resveratrol (trans-3,4',5-Trihydroxystilbene), çoğu bitki familyasında bulunan bir fenolik bileşiktir (Şekil 10) ve bitkilerin fungi patojenlerini inhibe eder, bitki-parazit etkileşimini düzenler [51]. Resveratrol sınırlı sayıda bitki tarafından (yaklaşık olarak 31 tür) sentezlenir.

Normalde bitkilerde yüksek miktarlarda bulunmamaktadır, ancak stres durumlarında sentezi artırılmaktadır. Resveratrol, bitkileri UV ışınlarına maruz kalması sonucu oluşan enfeksiyon ve hasarlara karşı koruyan fitoaleksinin adı verilen savunma molekülleri sınıfına aittir [52]. Fitoaleksinin grubu, flavonoidlerin alt gruplarından biridir. Stilbenler, fitoaleksinin birçok sınıfından birini temsil etmektedir [53].



Şekil 2. Resveratrol'ün kimyasal yapısı ve DPPH radikalini etkisizleştirilmesi

Trans-resveratrol 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından “*Vitis vinifera*” bitkisinden izole edilmiştir ve bu araştırmacılar bileşiğin genellikle *Botrytis cinerea* adlı mantarın saldırısına karşı veya ultraviyole ışığa maruz kalan bitkinin yaprak dokularında üretildiğini bulmuşlardır [54]. Resveratrol, 1992 yılında Siemann ve Creasy adlı araştırmacıların resveratrolün kırmızı şarabın içinde bulunduğu ve fransız paradoksundan sorumlu olduğunu iddia etmeleriyle dikkati çekmiştir [54].

3, 4', 5 trihidroksistilben ve 3, 4', 5 stilbenetriol adları ile bilinen resveratrol cis- ve trans- izomerik formlarında bulunur, ancak cis-izomeri üzüm ekstrelerinde bulunamamıştır. Resveratrol viniferinler isimli polifenol ailesinin ana molekülüdür. Resveratrolün molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ’tür ve molekül ağırlığı 228,25 daltondur [54]. Resveratrol en çok üzüm kabuğunda bulunmakla beraber üzüm meyvesinde ve yaprak saplarında, kökte, çekirdekte, yerfıstığında, kırmızı şarapta, dut meyvesinde ve “*Polygonum cuspidatum*” bitkisinin kök ve gövdesinde bulunur.

1.5.1 Biyolojik Aktivite

Hiperlipidemik diyetle beslenen ratlarda, resveratrolün triaçilgliserol ve kolesterolün karaciğer tarafından akümüülasyonunu inhibe ettiği ve peroksitlenmiş yağla beslenen ratlarda karaciğer hasarını önlediği gösterilmiştir [55-56]. Bertelli ve arkadaşları resveratrolün biyoyararlanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada 26 µg akut resveratrol dozu ve 15 günlük bir süreçte 13 µg’lık doz uygulaması yapılarak bileşiğin hızla kana geçtiği ve tetkikinün mümkün olduğunu göstermişlerdir [57]. Aynı grup, kardiyak biyoyararlanım ve böbrek ile karaciğere güçlü afiniteyi kanıtlamışlar; resveratrolün hem *in vivo* hem de *in vitro* düzeyde farmakolojik olarak aktif olduğunu göstermişlerdir [58]. Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri aşağıda özetlenmiştir [54]:

Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri:

1. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu (LDL, membranlar)
2. Bakır şelasyonu
3. Serbest radikal süpürücü etki
4. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
5. Anti-inflamatuar aktivite
6. Vazorelaksan aktivite
7. Lipid metabolizmasının düzenlenmesi

8. Anti-kanser aktivite

9. Östrojenik aktivite

1.5.2 Antioksidan Aktivite

Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) özelliklerinin çoklu-doymamış yağ asitleri ile değiştirilmesi aterosklerozda önemli rol oynar [54]. Oksidasyon, LDL partiküllerinin, apo B proteinin içeriğini değiştirerek, apo B/E reseptör sistemi tarafından katabolizmasını engeller. Böylece fenolik bileşiklerce zengin yiyeceklerin koruyucu özellikleri antioksidan özelliklerine bağlanmıştır. Frankel ve arkadaşları, LDL'ye trans-resveratrol eklenmesinin bakırın katalize ettiği oksidasyonu azalttığını göstermişlerdir [59]. Resveratrol etkisini esas olarak bakırla şelasyon yaparak göstermektedir [60]. Resveratrolün her iki izomerinin de eşit oranda serbest radikal süpürücü etkisi vardır ancak cis- izomerinin şelat yapma kapasitesi, trans- izomerinin yarısı kadardır. Resveratrol, membran lipidlerinin peroksidasyonunu inhibe eder, LDL'nin apo B proteinini okside etmesini önler ve apo B'nin intraselüler konsantrasyonlarını azaltır [61]. Kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan monooksijenazı inhibe ederek kolesterol biyosentezini azaltır [61]. Resveratrol, hücre membranlarını koruyarak yaşayan hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaktadır [54]. Chanvitayapongs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada resveratrolün antioksidan ve antimutajenik özelliklerinin yanında hücre ölümünü de azalttığı gösterilmiştir [62]. Resveratrol, östrojen reseptörüne bağlanarak onu aktive eder ve bu yüzden fitoöstrojen olarak bilinmektedir [54].

1.5.3 Anti-Karsinojen Aktivite

Japonya'da *Yucca schidigera* ekstresi, bakteri hücrelerinde antimutajenik etki göstermiş ve ekstredeki resveratrolün hidroksil gruplarının bu etkiden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Resveratrolün, karsinojenlerin detoksifikasyonu, hücre farklılaşmasının indüklenmesi, arilhidrokarbonları genotoksik metabolitlere metabolize eden enzimlerin inhibisyonu ve arilhidrokarbon reseptör antagonizması, lösemi hücrelerinde ribonükleotid redüktaz inhibisyonu, tümör baskılayıcı gen proteinlerinin artışı, hücre siklusunun S ve G₂ aşamalarında durdurulması, gibi çeşitli antimutajenik özelliklerini vurgulanmıştır [63-64]. *In vitro* ortamda melanoma hücrelerinde resveratrolün hücre çoğalmasını ve reaktif oksijen türevlerini azalttığı ve ayrıca *in vivo* olarak farelerde 20 mg/kg oral olarak verildiğinde

hepatik metastatik invazyonu önlediği belirlenmiştir [65]. Benzer etkiler insan meme, prostat ve ağız ‘skuamöz’ karsinoma hücrelerinde de saptanmıştır [66].

Ayrıca çok sayıda çalışmanın sonucu resveratrolun kalbi, iskemik reperfüzyon yaralanmalarından korumada etkin bir şekilde etkili olduğunu göstermiştir. Bu etkiler resveratrol varlığında ve onun antioksidan aktivitesinden dolayı nitrik oksit üretiminin değiştirilmesine, büyüme faktöründen türeyen vasküler endotellere ve adenezinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [67]. Başka bir çalışmada da perfüze kalpte adenezin molekülünün oluşumunun artırılması nedeniyle resveratrolun koroner akışı artırdığını ortaya koymuşlardır [68]. En son verilere göre de resveratrolun diyabetten korunmada ve bazı diyabetik komplikasyonları hafifletmede faydalı bir rolü olduğunu gösterilmiştir [69].

2. MATERYAL ve METOT

Tris tamponu: 0.05 M Tris-HCl ve Tris-Base ile 0.15 M KCl, % 0,2' lik Tween-20 çözelti karışımı hazırlandı (pH:7.4). Yağ asidi karışımı: 0.02 M linolenik asit (LNA, 18:3 n-3), linoleik asit (LA, 18:2, n-6) oleik asit (18:1, n-9) çözeltileri DMSO' da çözünerek hazırlandı. Hidrojen peroksit (H₂O₂), demir klorür (FeCl₂) , % 5'lik sodyum klorür (NaCl) , % 2'lik metanol sülfürik asit, n-hekzan, % 4'lük (BHT) butilhidroksitoluen, % 2'lik (KHCO₃) potasyum bikarbonat, % 0,6'lık tiyobarbütürik asit (TBA), α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) çözeltisi, sentezlenmiş farklı gruplar taşıyan siklofosfazenler kullanıldı.

2.1. Kullanılan Malzeme Araç ve Gereçler

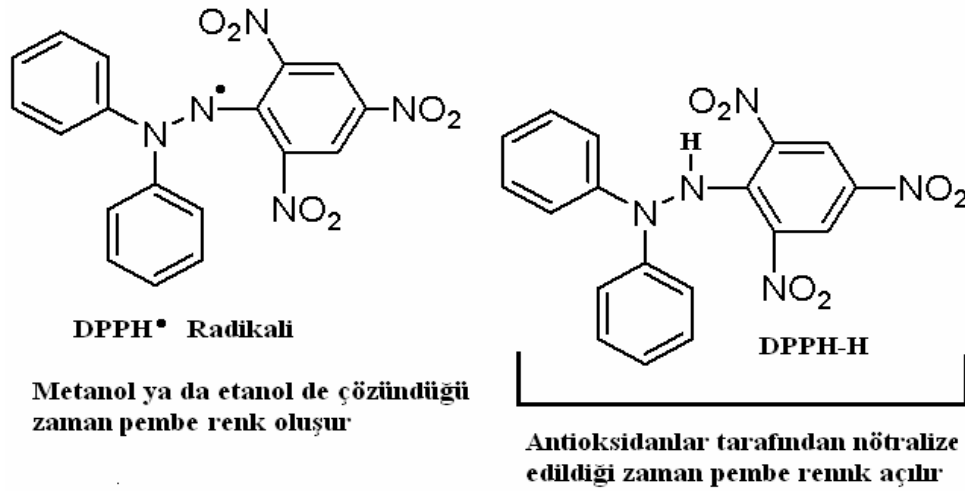
Shimadzu marka gaz kromatografisi cihazı (GC 17 cihazı), Shimadzu marka HPLC cihazı, santrifüj cihazı, etüv, otoklav, santrifüj tüpleri, mezür, pipet, vialler.

2.2. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi

DPPH, serbest radikal temizleme aktivitesi, Brand-Williams ve ark. [70] tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Serbest radikal olarak 25 mg/l α , α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) metanolde hazırlanılarak kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 μ g/ μ l siklofosfazen ve DPPH çözeltisinden 4 ml ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi ve inkübasyon sonunda absorbansları 517 nm'de blanka karşı spektrofotometrede okundu [71].

Azalan absorbans, geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% = \frac{\text{Kontrol}_{\text{ABS}} - \text{Sample}_{\text{ABS}}}{\text{Kontrol}_{\text{ABS}}} \times 100$$



Şekil 3. DPPH radikalinin etkisizleştirilmesi

2.3. *In vitro* Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Siklofosfazenlerin antioksidan aktiviteleri Shimoi yöntemine göre yapıldı [72]. Bu amaçla; pH'sı 7,4 olan 0.05 M Tris-HCl / 0.15 M KCl ve % 0,2 Tween-20 içeren tampon çözelti hazırlandı. Bu tampon çözelti içerisinde 0.02 M linolenik asit (LNA, 18:3 n-3), linoleik asit (LA, 18:2, n-6), oleik asit (18:1, n-9) DMSO' da çözünerek hazırlandı ve aşağıdaki deney grupları hazırlandı:

Kontrol grubu: 5 ml tris-base tamponu, 0,4 ml yağ asidi karışımı; FeCl₂+H₂O₂ grubu: 5 ml tris-base tamponu, 1 ml FeCl₂, 1 ml H₂O₂, 0,4 ml yağ asidi karışımı; Madde grupları: 5 ml tris-base tamponu, 1 ml FeCl₂, 1 ml H₂O₂, 0,4 ml yağ asidi karışımı, 50 µg/µl siklofosfazen maddeleri.

Bu gruplar hazırlandıktan sonra, 37° C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve gruplardaki örnekler % 4'lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi. Daha sonra örnek karışımlardan 1 ml alınarak lipid peroksidasyon düzeyi ölçüldü.

2.4. *In vitro* Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) ölçümü

LPO ölçümü için; 1 ml örneklerden alındıktan sonra üzerine % 0,6'lık TBA çözeltisi ile 2 ml distile su ilave edildi ve vortekslendi. Daha sonra 90 °C'de 30 dakika bırakıldı ve reaksiyon sonucu oluşan pembe renk 3 ml n-bütanol ile ekstrakte edildi. Örnekler santrifüj edildi ve santrifüj sonunda elde edilen supernatant kısmın yoğunluğu HPLC cihazında floresans dedektörle ölçüldü. Sonuçlar nmol/µl olarak verildi.

2.5. Deneysel Ortamlardaki LPO Miktarının HPLC ile Analizi

Shimadzu marka tam otomatik HPLC cihazı kullanıldı. Dedektörde ölçüm aralığı olarak eksitasyon katsayısı 515 ve emission katsayısı 553 olarak belirlendi. Ölçüm için inertsil C18 HPLC kolonu ve mobil faz olarak da % 75 ACN / 30 mM KH₂PO₄ (pH= 5) karışımı kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolon fırını sıcaklığı 40 °C’de tutuldu. Analiz süresi 5 dakika olarak belirlendi. Standart olarak 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) kullanıldı. Bütün örnekler analiz süresince otosampler cihazının örnek konulduğu kısımda +4 °C ’de tutuldu.

2.6. Reaksiyon ortamındaki yağ asitlerinin izolasyonu ve metilasyonu

LPO ölçümünden sonra geriye kalan sıvı faz üzerine 10 ml hekzan/izopropanol karışımı ilave edilerek yağ asitlerinin kazanılması sağlandı. Daha sonra hekzan fazı ayrı deney tüplerine alınarak üzerine 5 ml % 2’lik metanolik sülfürik asit ilave edildi. Karışım vortekslendi 55 °C’de 12 saat bırakıldı ve daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutularak 5 ml % 5’lik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ilave edildi ve vortekslendi. Yağ asidi metil esterleri 5 ml n-hekzan ile ekstrakte edildi. Yağ asidi metil esteri karışımı 5 ml % 2’lik KHCO₃ çözeltisi ile muamele edildikten sonra, n-hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu [73] ve yağ asidi metil esteri kalıntıları 1 ml heptanda çözünerek otosampler viallerine alındı. Yağ asidi metil esteri analizi Shimadzu GC 17 cihazıyla yapıldı (Kyoto, Japan).

2.7. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra Shimadzu marka GC 17 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25µm iç çapında ve Permabond 25 µm film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Germany) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 165–215 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 165 °C’den 215 °C arasında programlandı. Sıcaklık artışı 215 °C’ye kadar kadar °C /dk olarak belirlendi. 215 °C’de 2 dakika tutuldu ve toplam süre 12 dk olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemten sonra gerekli programlama yapılarak örnekler ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı.

2.8. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal aktivite için kullanılan mikroorganizma kültürleri; Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlandı. Araştırmada; *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5 *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileri, *Candida albicans* FMC 17, *Candida glabrata* ATCC 66032, *Candida tropicalis* ATCC 13803 mayaları, *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp., dermofit fungus türü kullanıldı.

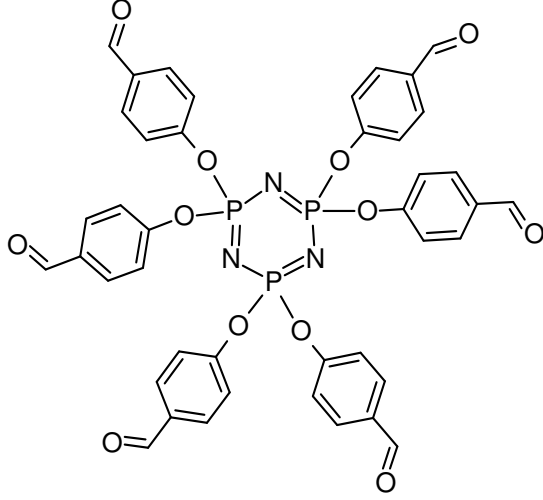
2.9. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması:

Bakteri suşları; Nutrient Buyyona aşılansak 35±1°C’de 24 saat, maya suşları; Malt Ekstrakt Buyyon’da, dermofit funguslar ise; Glukozlu Sabouroud Buyyon’da 25±1°C’de 48 saat süre ile inkübe edildi. Erlenmayerde steril edilen ve 45-50 °C’ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri, maya ve fungusların buyyondaki kültürü ile % 1 oranında aşılansak (10⁶ bakteri/ml, 10⁴ maya/ml, 10⁴ fungus/ml) iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15’er ml konulmuş ve besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Katılaşılan agar üzerine fosfazen emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4 °C’de 1.5-2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılansak plaklar 37±1 °C’de 24 saat, maya ve dermofit aşılansak plaklar ise 25±1 °C’de 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. Kontrol için standart diskler kullanıldı. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi.

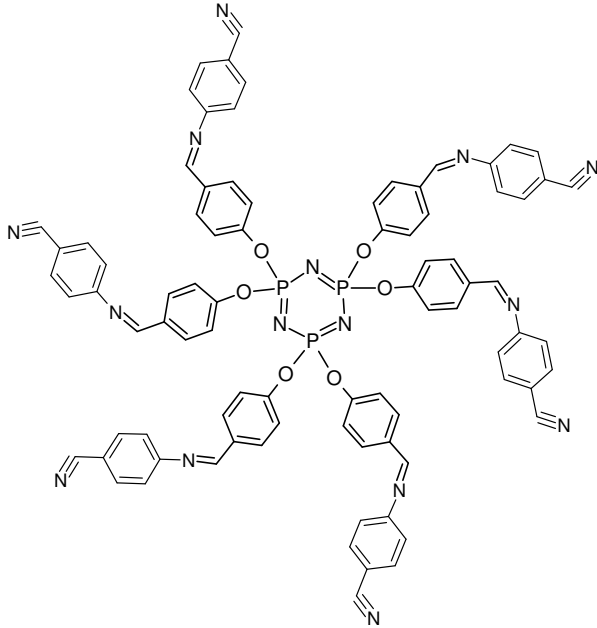
2.10. İstatistik Analizi

İstatistik analizi için, SPSS 15.0 software programı kullanıldı. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean±SEM olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklarda p<0.05, p<0.01 ve p<0.001 değerleri kullanıldı.

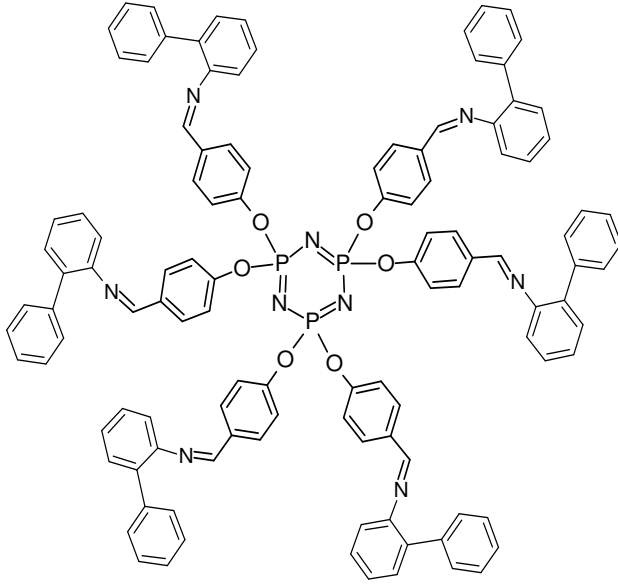
2.11. TBAG 107T407 Nolu TÜBİTAK Projesi Kapsamında Senzlenen ve *In Vitro* Deneyde Kullanılan Fosfazenlerin Moleküler Yapıları



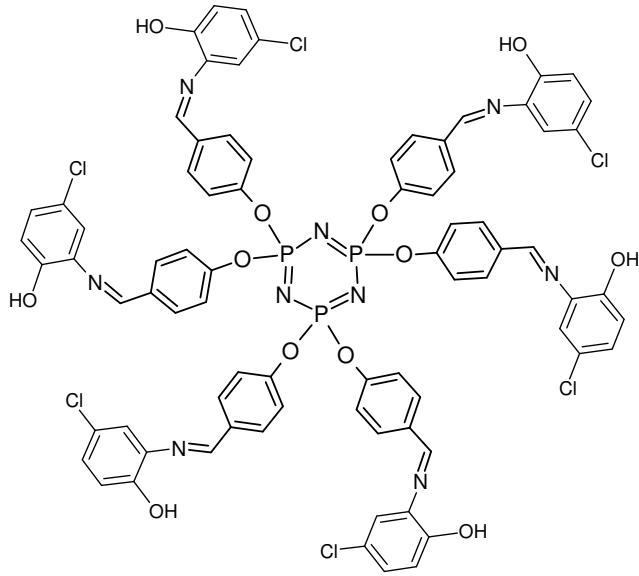
Şekil 4. Hekza (4-formilfenoksi)Siklotrifosfazen (PHFOS) (Moleküler Formülü: C₄₂H₃₀N₃O₁₂P₃, MA: 861.622, Bileşimi: % 58.55 C, % 3.51 H, % 4.88 N)



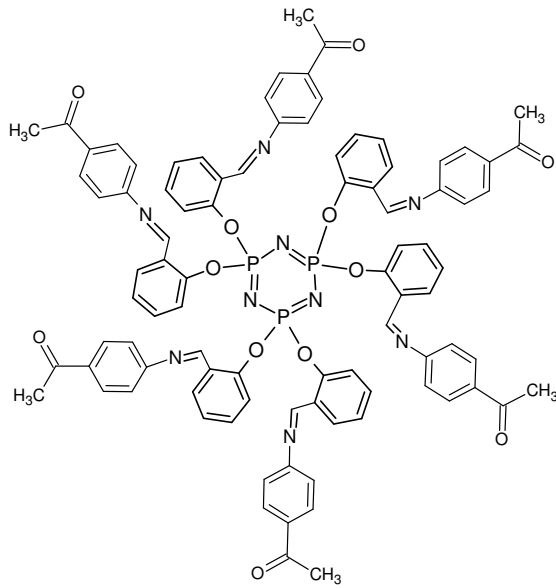
Şekil 5. 4-aminobenzonitril (PHF1) (Moleküler formülü: C₈₄H₅₄N₁₅O₆P₃, MA: 1462.345, Bileşimi: % 68.99 C, % 3.72 H, % 14.37 N)



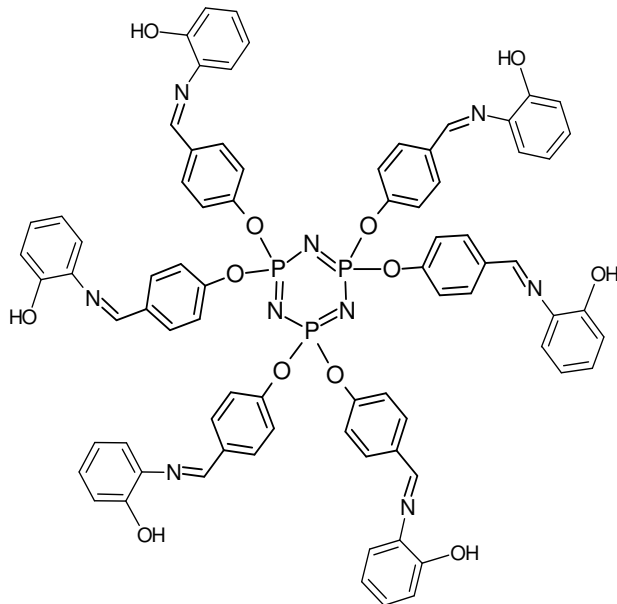
Şekil 6. 2-aminobifenil (PHF2) (Moleküler formülü: $C_{114}H_{84}N_9O_6P$, MA: 1768.864, Bileşimi: % 77 C, % 4.79 H, %7.13 N)



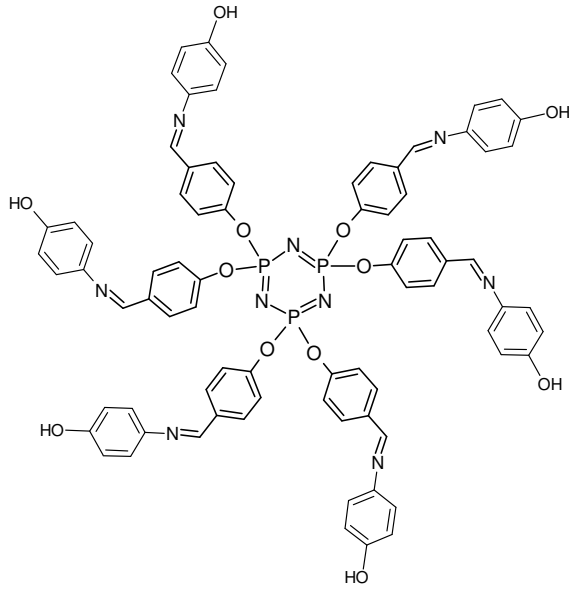
Şekil 7. 2-amino-4-klorofenol (PHF3) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1614.955, Bileşimi: % 58.01 C, % 3.37 H, % 7.81N)



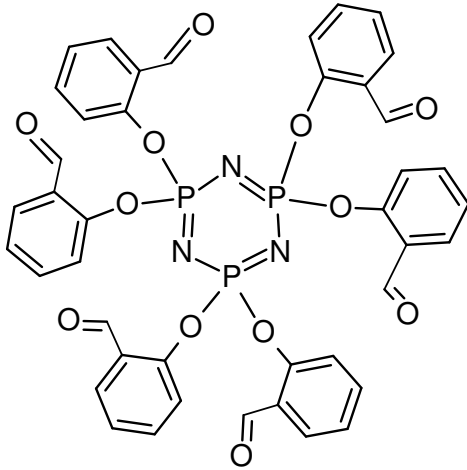
Şekil 8. 4-aminoasetofenon (PHF4) (Moleküler formülü: $C_{90}H_{72}N_9O_{12}P_3$, MA: 1564.509, Bileşimi: % 69.09 C, % 4.64 H, % 8.06 N)



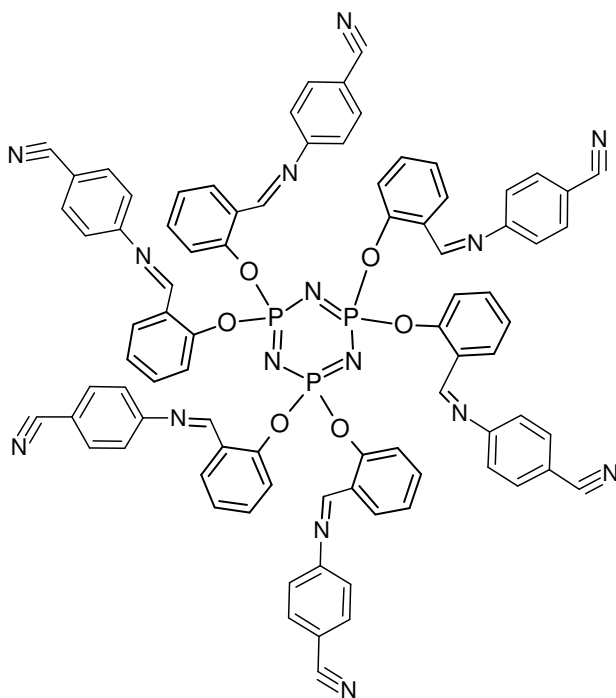
Şekil 9. 2-aminofenol (PHF5) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{60}N_9O_{12}P_3$, MA: 1408.2853, Bileşimi: % 66.52 C, % 4.29 H, % 8.95 N)



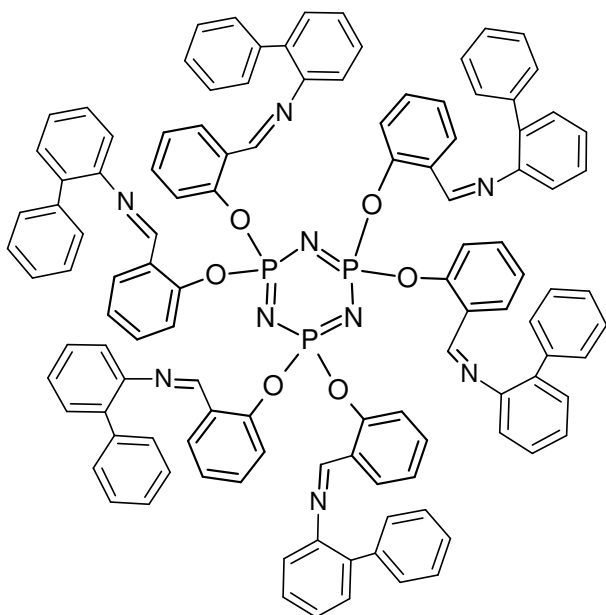
Şekil 10. 4-aminofenol (PHF6) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{60}N_9O_{12}P_3$, MA: 1408.285, Bileşimi: % 66.52 C, % 4.29 H, % 8.95 N)



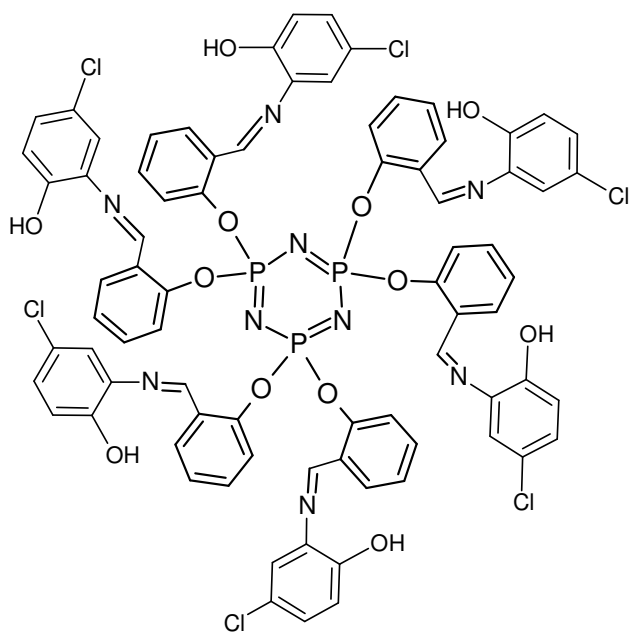
Şekil 11. Hekza(2-Formilfenoksi)Siklotrifosfazen (SFOS) (Moleküler formülü: $C_{42}H_{30}N_3O_{12}P_3$, MA: 861.621, Bileşimi: % 58.55 C, % 3.51 H, % 4.88 N)



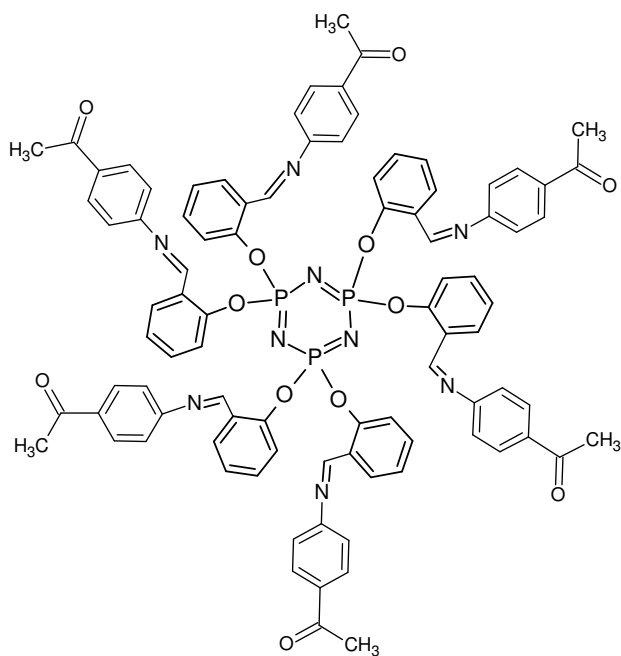
Şekil 12. 4-aminobenzonitril (SF1) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{54}N_{15}O_6P_3$, MA: 1462.345, Bileşimi: % 68.99 C, % 3.72 H, % 14.37 N)



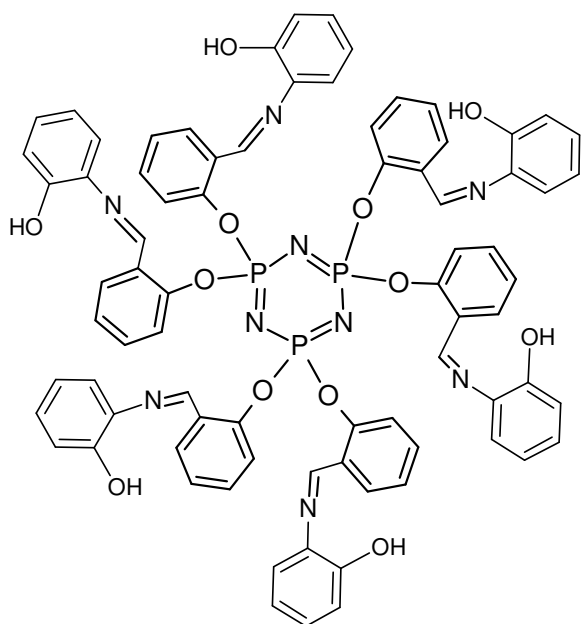
Şekil 13. 2-aminobifenil (SF2) (Moleküler formülü: $C_{114}H_{84}N_9O_6P_3$, MA: 1768.864, Bileşimi: % 77.41 C, % 4.79 H, % 7.13 N)



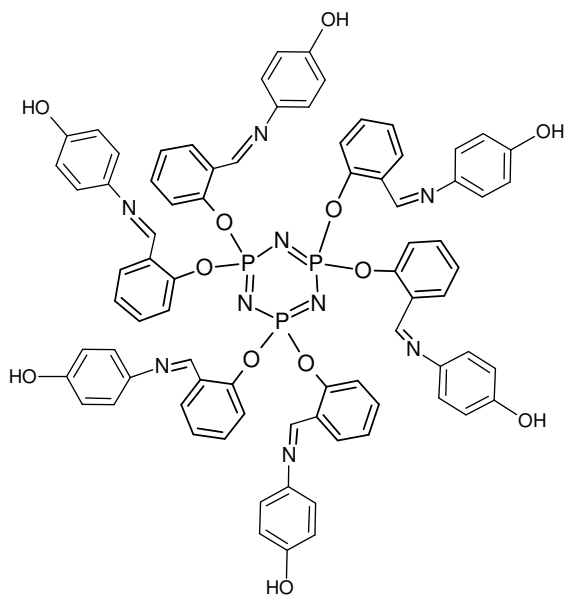
Şekil 14. 2-amino-4-klorofenol (SF3) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1614.955, Bileşimi: % 58.01 C , % 3.37 H, % 7.81 N)



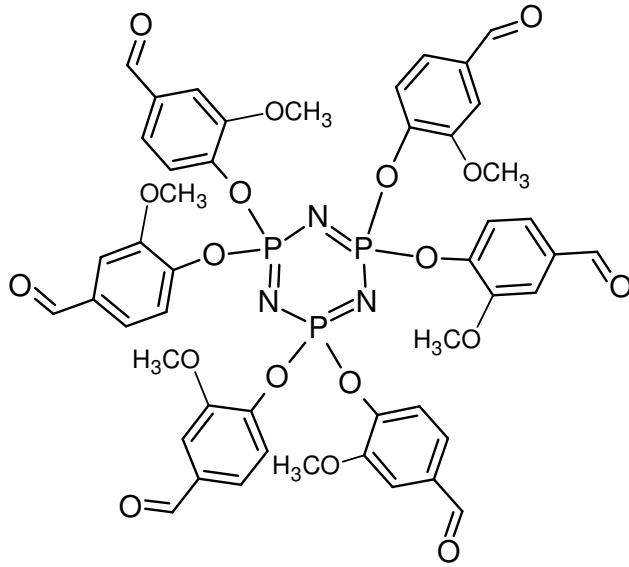
Şekil 15. 4-aminoasetofenon (SF4) (Moleküler formülü: $C_{90}H_{72}N_9O_{12}P_3$, MA: 1564.509, Bileşimi: % 69.09 C, % 4.64 H, % 8.06 N)



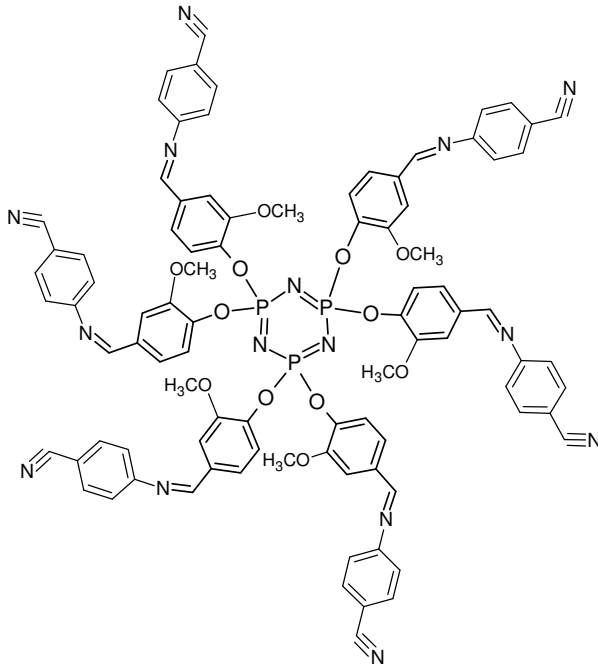
Şekil 16. 2-Aminofenol (SF5) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{60}N_9O_{12}P_3$, MA: 1408.285, Bileşimi: % 66.52 C, % 4.29 H, % 8.95 N)



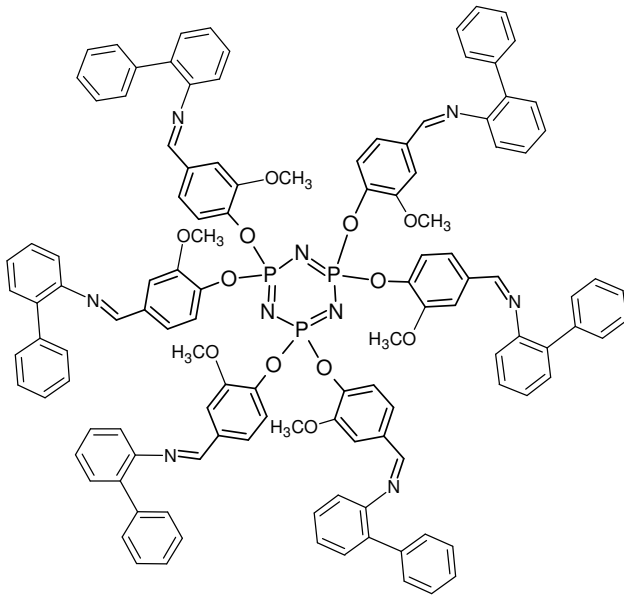
Şekil 17. 4-aminofenol (SF6) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{60}N_9O_{12}P_3$, MA: 1408.285, Bileşimi: % 66.52 C, % 4.29 H, % 8.95 N)



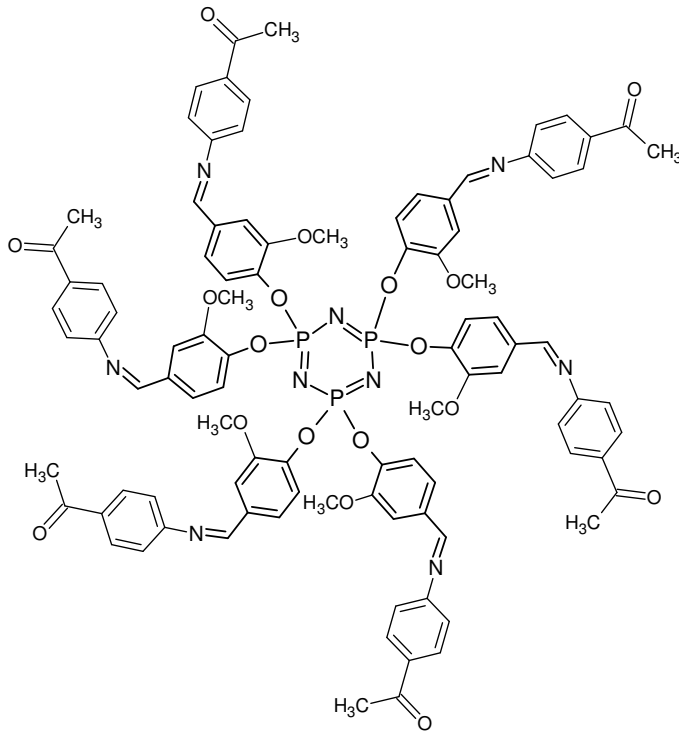
Şekil 18. Hekza[2-metoksi-4-(p-siyanofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VFOS) (Moleküler formülü: $C_{48}H_{42}N_3O_{18}P_3$, MA: 1041.777, Bileşimi: % 55.34 C, % 4.06 H, % 4.03 N)



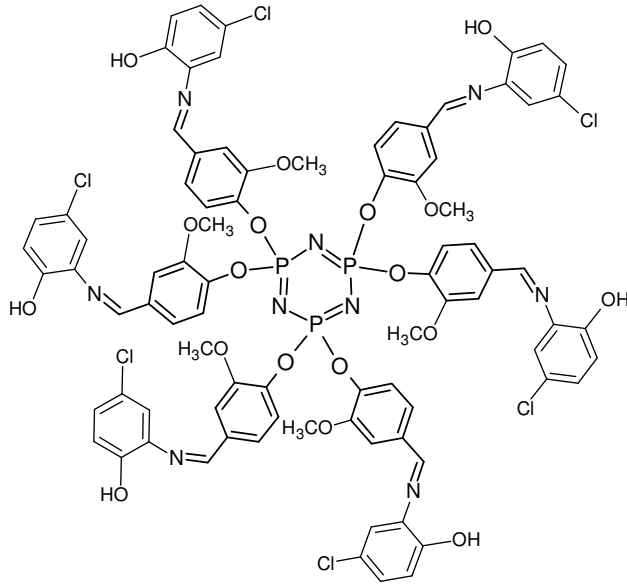
Şekil 19. Hekza [2-metoksi-4-(o-feilfenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF1) (Moleküler formülü: $C_{90}H_{66}N_{15}O_{12}P_3$, MA: 1642.501, Bileşimi: % 65,81 C, % 4.05 H, % 12.79 N)



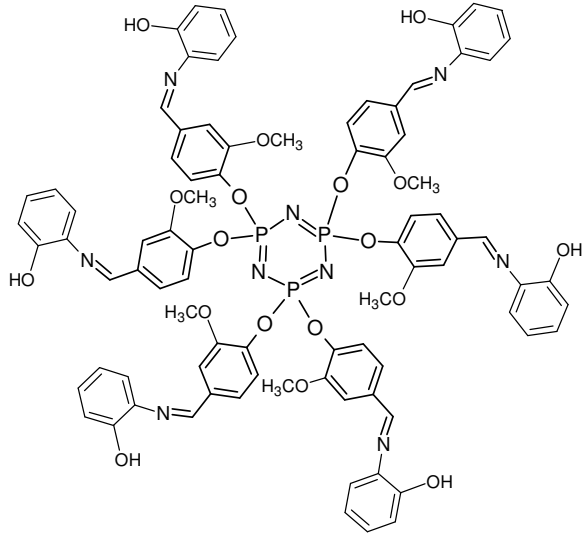
Şekil 20. Hekza[2-metoksi-4-(4-asetofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF2) (Moleküler formülü: $C_{120}H_{96}N_9O_{12}P_3$, MA: 1949.020, Bileşimi: % 73.95 C, % 4.96 H, % 6.47 N)



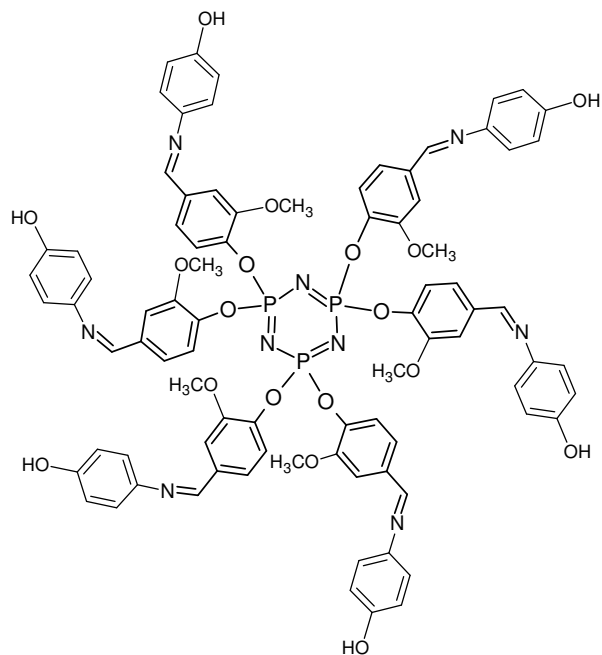
Şekil 21. Hekza[2-metoksi-4-(2-hidroksi-4-klorofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF3) (Moleküler formülü: $C_{96}H_{84}N_9O_{18}P_3$, MA:1744.664, Bileşimi: % 66.09 C,% 4.85 H, %7.23 N)



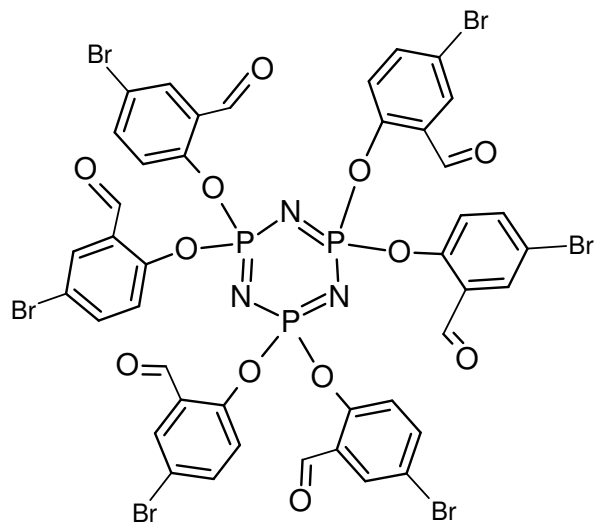
Şekil 22. Hekza[2-metoksi-4-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF4) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{66}N_9O_{18}P_3$, MA: 1795.111, Bileşimi: % 56.20 C, % 3.71 H, % 7.02 N)



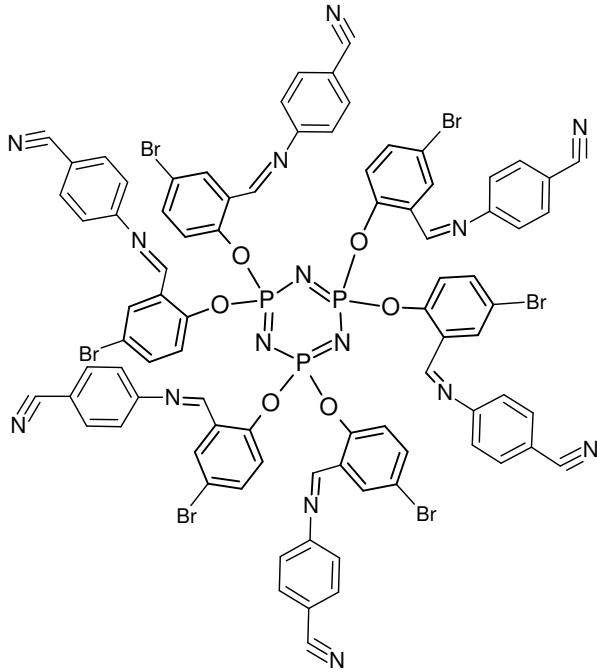
Şekil 23. Hekza[2-metoksi-4-(4-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (VF5) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{72}N_9O_{18}$, MA: 1588.441, Bileşimi: % 63.52 C, % 4.57 H, % 7.49 N)



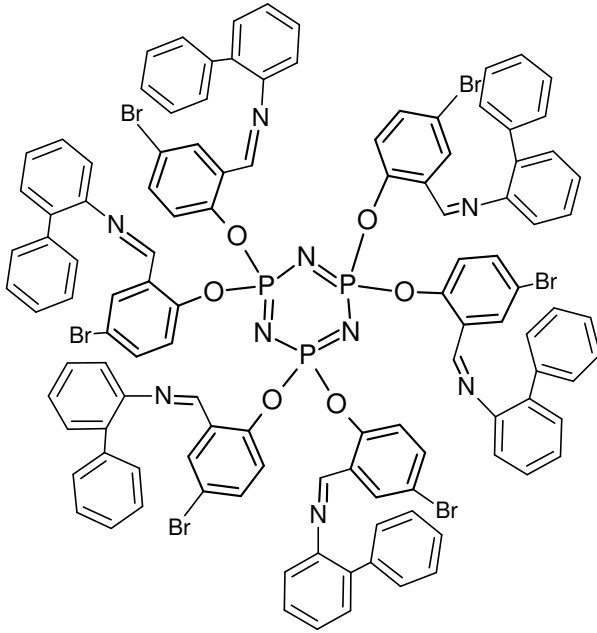
Şekil 24. 4-(2-aminoetil)morfolin (VF6) (Moleküler formülü: $C_{48}H_{72}N_9O_{18}P_3$, MA:1659.442, Bileşimi: % 63.52 C, % 4.57 H, %7.94 N)



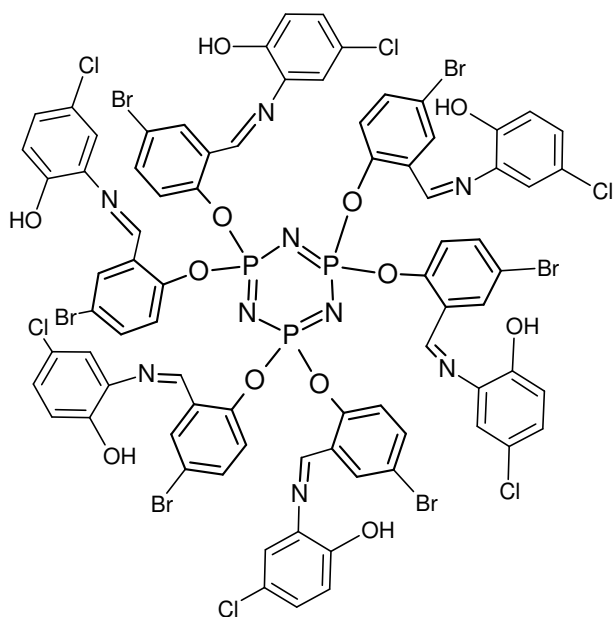
Şekil 25. Hekza(4-Bromo-2-Formil-Fenoksi)Siklotrifosfazen (BrFOS) (Moleküler formülü: $C_{42}H_{24}Br_6N_3O_{12}P_3$ MA: 1334.998, Bileşimi: % 37.79 C, % 1.81 H, %3.15 N)



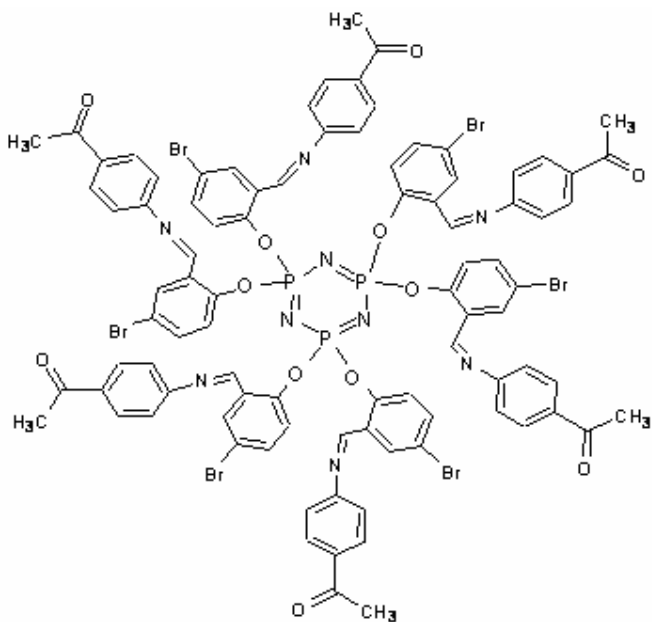
Şekil 26. 1. 4-aminobenzonitril (BrF1) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{48}Br_6N_{15}O_6P_3$, MA: 1935.722, Bileşimi: %52.12 C, %2.50 H, %10.85 N)



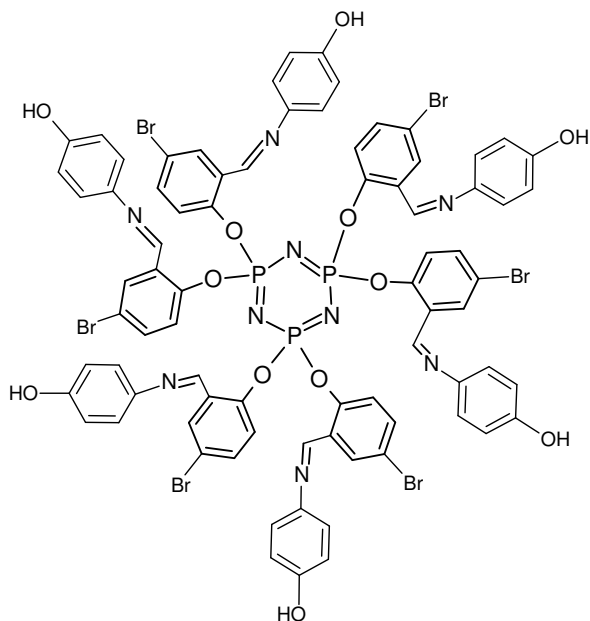
Şekil 27. 2. 2-aminobifenil (BrF2) (Moleküler formülü: $C_{114}H_{78}Br_6N_9O_6P_3$, MA: 2242.241, Bileşimi: % 61.06 C, % 3.51 H, % 5.62 N)



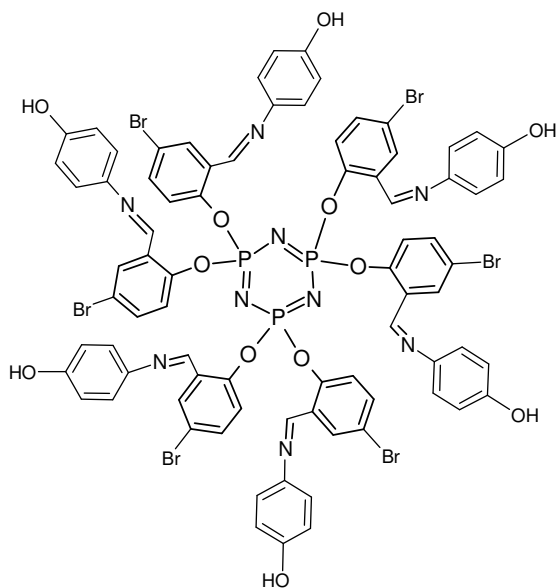
Şekil 28. 2-amino-4-klorofenol (BrF3) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{48}Br_6Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 2088.332, Bileşimi: % 44.86 C, % 2.32 H, % 6.04 N)



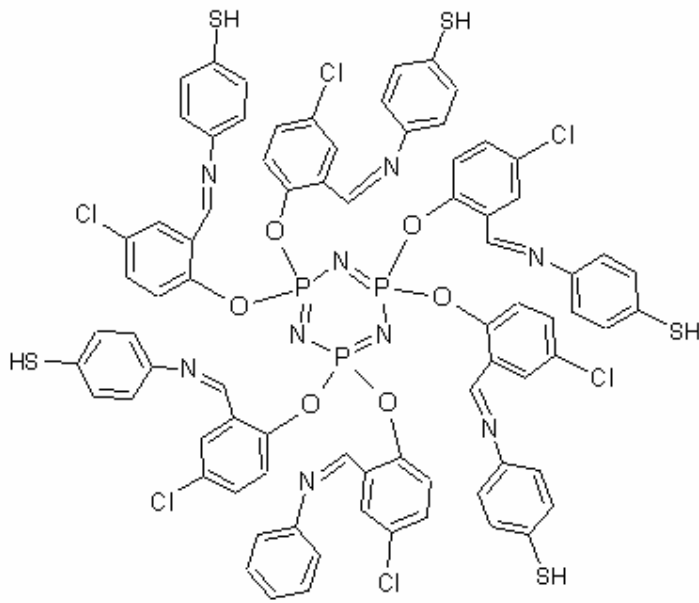
Şekil 29. 4-aminoasetofenon (BrF4) (Moleküler formülü: $C_{90}H_6Br_6N_9O_{12}P_3$, MA: 2037.885, Bileşimi: % 53.04 C, % 3.26 H, % 6.19 N)



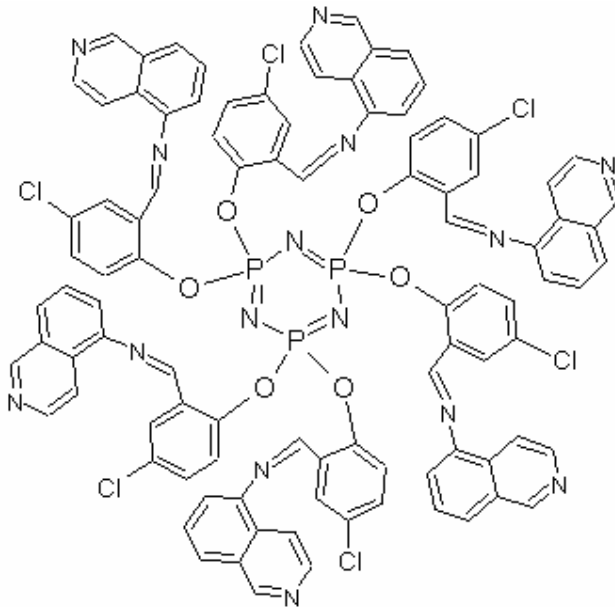
Şekil 30. 2-aminofenol (BrF5) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Br_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1881.661, Bileşimi: % 49.79 C, % 2.89 H, % 6.70 N)



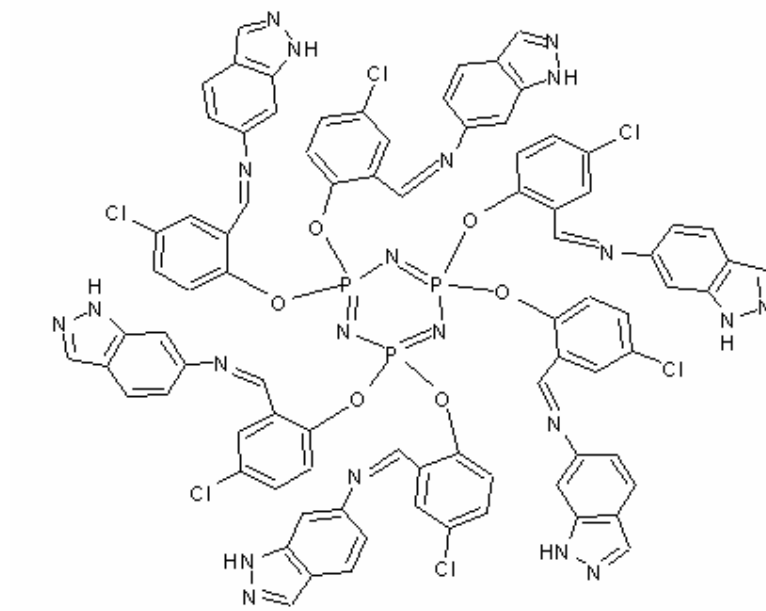
Şekil 31. 4-aminofenol (BrF6) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Br_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1881.661, Bileşimi: % 49.79 C, % 2.89 H, % 6.70 N)



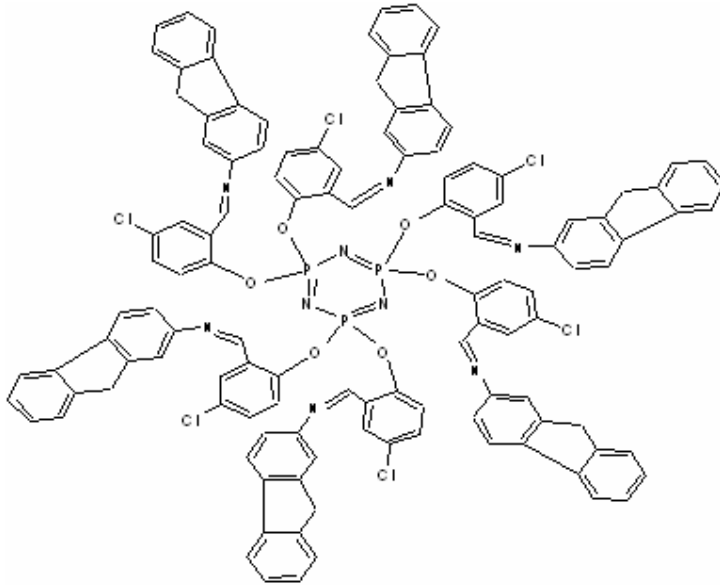
Şekil 32. Hekza[2-(4-merkaptofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (SHF) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_6P_3S_5$, MA: 1679.284, Bileşimi: % 55.79 C, % 3.24 H, % 7.51 N, % 9.55 S)



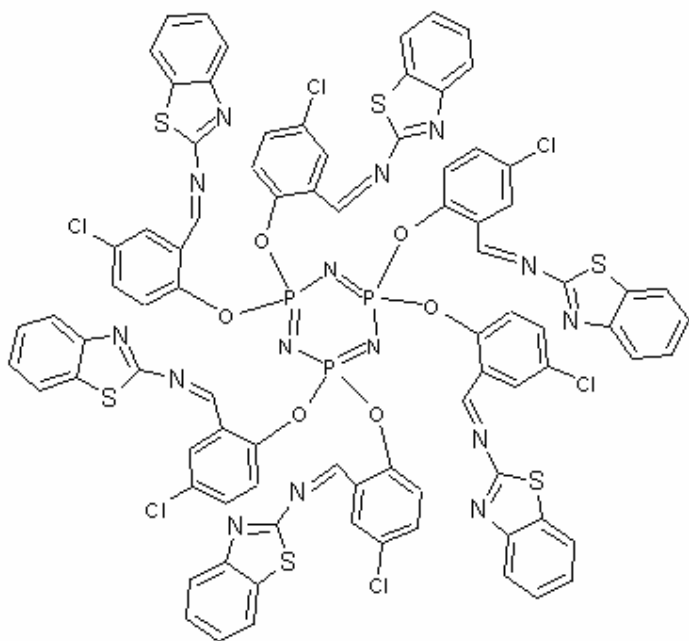
Şekil 33. Hekza[2-(5-izoquinolinilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (QF) (Moleküler formülü: $C_{96}H_{60}Cl_6N_{15}O_6P_3$, MA: 1825.239, Bileşimi: %63.17 C, %3.31 H, %11.51 N)



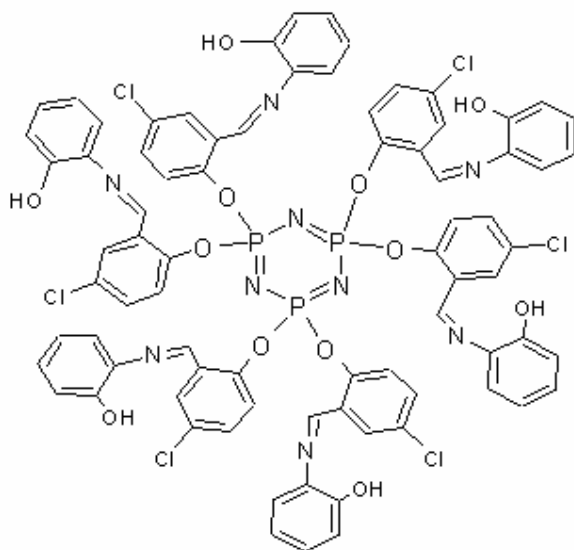
Şekil 34. Hekza[2-(6-(1H-indazol)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (INDF) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{54}Cl_6N_{21}O_6P_3$, MA: 1759.103, Bileşimi: % 57.35 C, % 3.09 H, % 16.72 N)



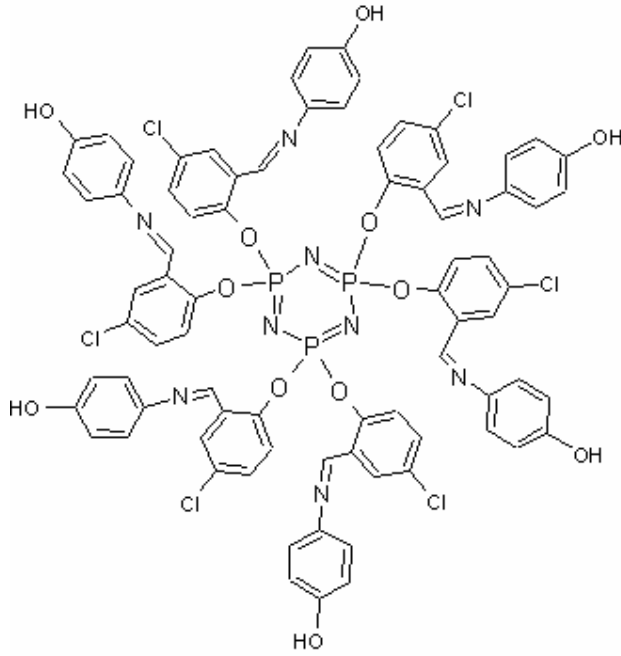
Şekil 35. Hekza[2-(2-(9H-fluoren)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (FLF) (Moleküler formülü: $C_{120}H_{78}Cl_6N_9O_6P_3$, MA: 2047.599, Bileşimi: % 70.39 C, % 3.84 H, % 6.16 N)



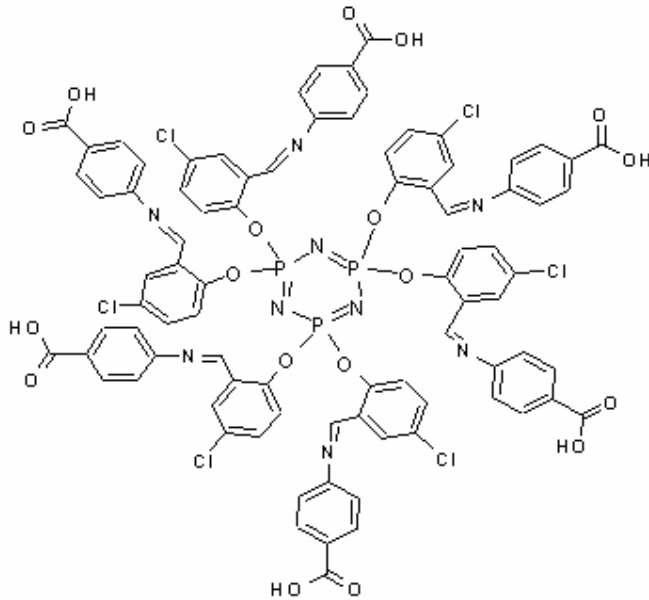
Şekil 36. Hekza[2-(2-(1,3-benzotiazol)ilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (BNF) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{48}Cl_6N_{15}O_6P_3S_6$, MA: 1861.406, Bileşimi: % 54.20 C, % 2.60 H, % 11.29 N, % 10.34 S)



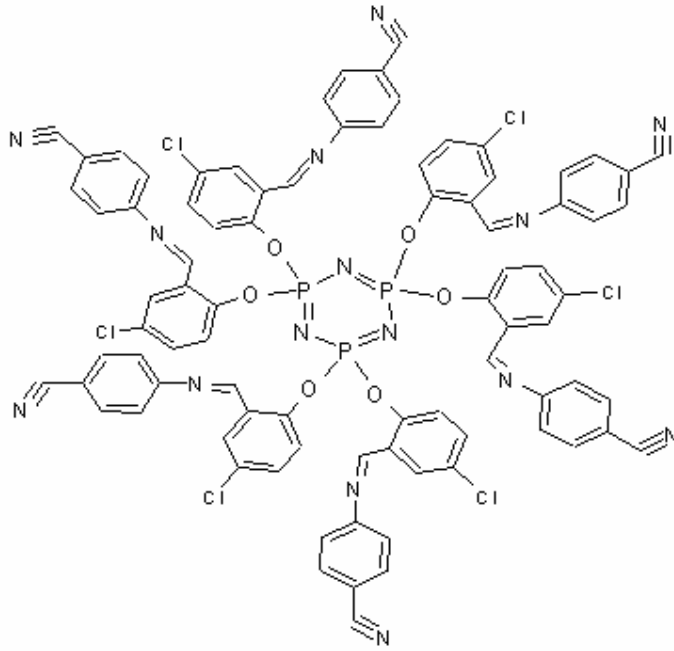
Şekil 37. Hekza[4-bromo-2-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HPF) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1614.955, Bileşimi: % 58.01 C, % 3.37 H, % 7.81 N)



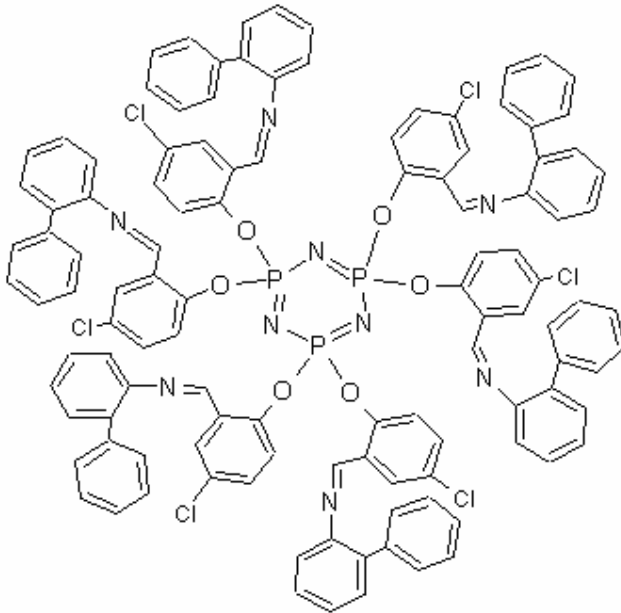
Şekil 38. Hekza[4-bromo-2-(4-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HPFF) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1614.955, Bileşimi: % 58.01 C, % 3.37 H, % 7.81 N)



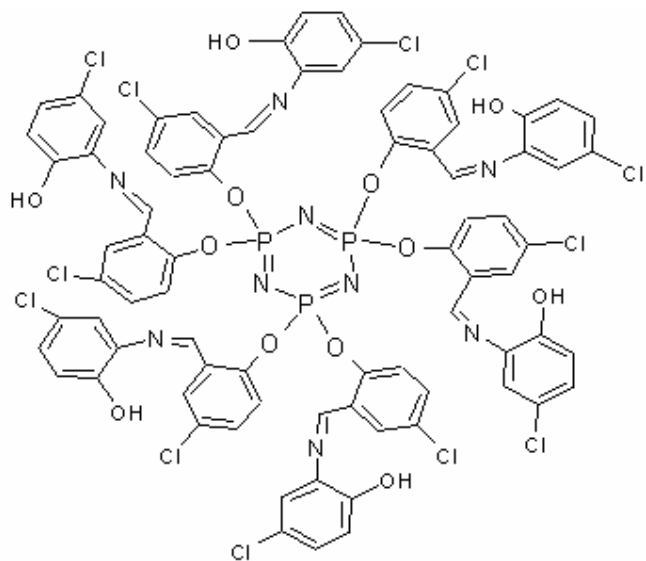
Şekil 39. 4-aminobenzoik asit (ABAF) (Moleküler formülü: $C_{84}H_{54}Cl_6N_9O_{18}P_3$, MA: 1783.016, Bileşimi: % 56.58 C, % 3.05 H, % 7.07 N)



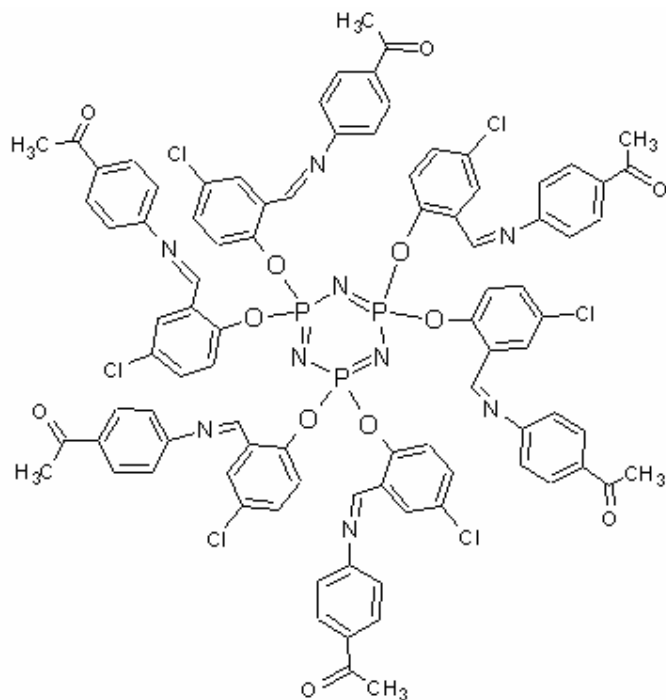
Şekil 40. Hekza[4-bromo-2-(p-siyanofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (SYPF) (Molekül formülü: $C_{84}H_{48}Cl_6N_{15}O_6P_3$, MA: 1669.016, Bileşim: % 60.45 C, % 2.90 H, % 12.59 N)



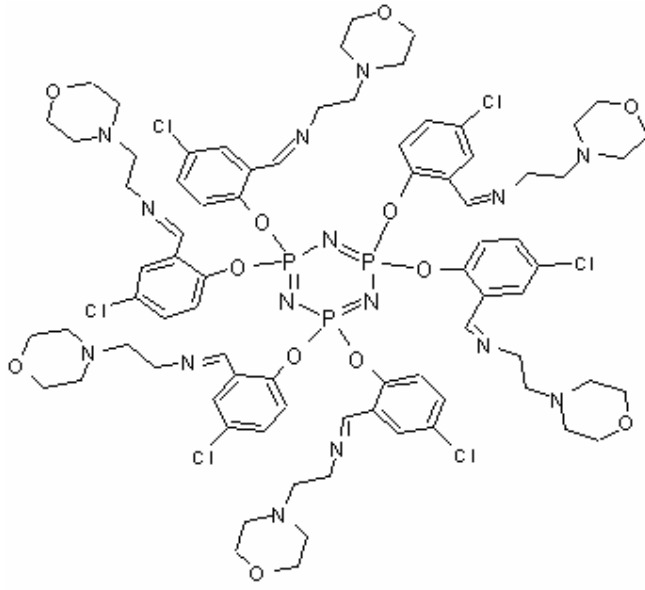
Şekil 41. Hekza[4-bromo-2-(o-feilfenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (BFF) (Moleküler formülü: $C_{114}H_{78}Cl_6O_6P_3$, MA: 1975.535, Bileşimi: % 69.31 C, % 3.98 H, % 6.38 N)



Şekil 42. Hekza[4-bromo-2-(2-hidroksi-4-klorofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (HKFF) (Moleküler formülü: $C_{78}H_{48}Cl_{12}N_9O_{12}P_3$, MA: 1821.626, Bileşimi: % 51.43 C, % 2.66 H, % 6.92 N)

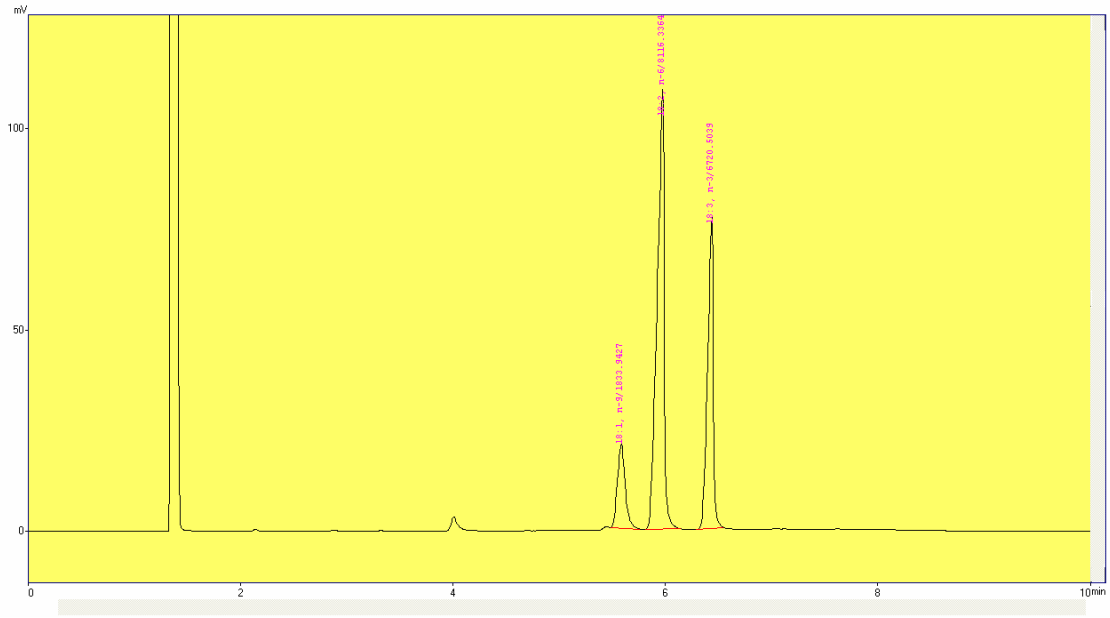


Şekil 43. Hekza[4-bromo-2-(4-asetofenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen (AFF) (Moleküler formülü: $C_{90}H_{66}Cl_6N_9O_{12}P_3$, MA: 1771.179, Bileşimi: % 61.03 C, % 3.76 H, % 7.21 N)



Şekil 44. 4-(2-aminoetil)morfolin (AEMF) (Molekül formülü: $C_{78}H_{96}Cl_6N_{15}O_{12}P_3$, MA: 1741.329, Bileşimi: % 53.80 C, % 5.56 H, % 12.07 N)

3. BULGULAR



Şekil 45. Yağ asitlerinin GC kromatogramı

Tablo 1. PHID grubu taşıyan fosfazenlerin MDA-TBA ve yağ asidi düzeyleri üzerine etkileri

Gruplar	MDA-TBA (nmol/ml)	18:1 n-9 (Oleik asit) (µmol/ml)	18:2 n-6 (Linoleik asit) (µmol/ml)	18:3 n-3 (Linolenik asit) (µmol/ml)
Kontrol	7,28±0,30	5,12±0,07	11,40±0,12	3,07±0,02
Fenton R	17,34±0,24 ^a	4,24±0,12 ^a	8,10±0,33 ^a	0,68±0,01 ^a
PHFOS	11,64±0,19 ^c	5,34±0,08 ^b	10,50±0,24 ^c	1,51±0,04 ^d
PHF1	17,11±0,20 ^a	5,29±0,07 ^b	10,20±0,23 ^c	0,79±0,05 ^a
PHF3	3,34±0,04 ^d	5,70±0,12 ^b	13,94±0,32 ^d	1,82±0,09 ^d
PHF4	24,42±0,72 ^b	4,29±0,07 ^a	8,74±0,15 ^a	0,67±0,02 ^a
PHF5	4,56±0,14 ^d	5,09±0,03 ^a	12,40±0,02 ^d	1,20±0,03 ^c
Rutin	8,80±0,31 ^d	3,86±0,23 ^a	7,99±0,38 ^a	0,64±0,04 ^a
Quercetin	5,71±0,27 ^d	4,62±0,02 ^a	9,28±0,17 ^b	0,69±0,02 ^a
Resveratrol	3,33±0,11 ^d	4,62±0,14 ^a	11,04±0,08 ^c	1,06±0,04 ^b

a: p>0.05 b:p<0.05 c:p<0.01 d: p<0.001

Tablo 2. PHID grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri (Disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır, ölçülen kısım mm olarak inhibisyon zonudur)

Mikroorganizmalar	PHFOS	PHF1	PHF3	PHF4	PHF5	PHF6	Quersetin
<i>Escherichia coli</i>	-	-	27	-	13	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10	19	-	11	-	14
<i>Bacillus megaterium</i>	8	11	23	8	19	-	15
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	8	11	27	-	13	-	-
<i>Candida albicans</i>	8	13	26	23	24	9	13
<i>Candida glabrata</i>	15	8	25	23	8	-	8
<i>Epidermophyton</i> sp.	9	11	27	20	20	-	8
<i>Trichopyton</i> sp.	8	8	27	13	13	15	10

Tablo 3. Salisilat grubu taşıyan fosfazenlerin MDA-TBA üzerine etkileri ve DPPH• radikalini temizleme aktiviteleri

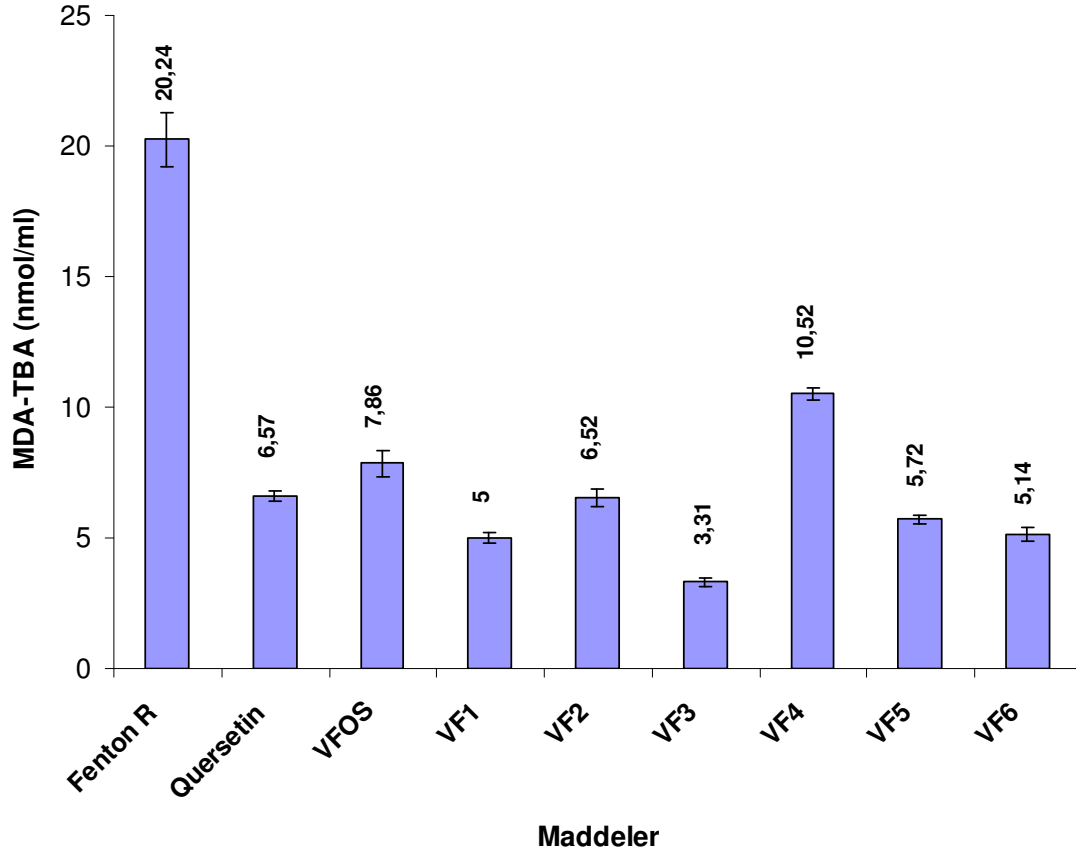
Maddeler	MDA-TBA (nmol/ml)	DPPH• radikalini Temizleme aktivitesi (%)
Kontrol	11,33±0,33	-
Fenton R	66,36±1,39 ^a	-
SFOS	52,37±1,30 ^b	4,52±0,08
SF1	50,69±0,54 ^b	4,43±0,03
SF2	52,42±1,34 ^b	4,23±0,03
SF3	12,23±0,60 ^d	84,40±0,31
SF4	67,47±1,37 ^a	8,88±0,78
SF5	15,40±0,61 ^d	82,33±0,33
SF6	10,96±0,17 ^d	73,40±0,06
Quersetin	15,81±0,23 ^d	95,44±0,06
Resveratrol	21,41±0,76 ^d	93,00±0,58

a: p>0.05 b: p<0.05 c: p<0.01 d: p<0.001

Tablo 4. Yapılarında OH grubunu taşıyan salisilat sübtitüe fosfazenlerin MDA-TBA ve yağ asidi düzeyleri üzerine etkileri

Maddeler	MDA-TBA (nmol/ml)	18:1 n-9 (Oleik asit) (μmol/ml)	18:2 n-6 (Linoleik asit) (μmol/ml)	18:3 n-3 (Linolenik asit) (μmol/ml)
Kontrol	3,51±0,15	5,40±0,08	12,40±1,09	3,80±0,13
Fenton R	16,59±0,30	2,67±0,07 ^a	5,55±0,79	0,95±0,05
SF3	7,56±0,14 ^d	2,75±0,04 ^a	7,13±0,96 ^c	1,41±0,05 ^c
SF5	6,07±0,34 ^d	3,09±0,05 ^b	7,46±0,80 ^c	1,49±0,04 ^c
SF6	7,63±0,35 ^d	3,17±0,05 ^b	7,74±0,75 ^c	1,56±0,05 ^c
VF6	7,43±0,55 ^d	3,28±0,06 ^b	7,99±0,67 ^c	1,57±0,09 ^c
BrF6	7,37±0,30 ^d	3,18±0,07 ^b	7,80±0,56 ^c	1,51±0,05 ^c
Resveratrol	6,14±0,35 ^d	3,04±0,09 ^b	7,28±0,48 ^c	1,39±0,11 ^b

a: p>0.05 b: p<0.05 c: p<0.01 d: p<0.001



Şekil 46. Vanilya sübtitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin LPO oluşumu engelleme üzerine etkileri

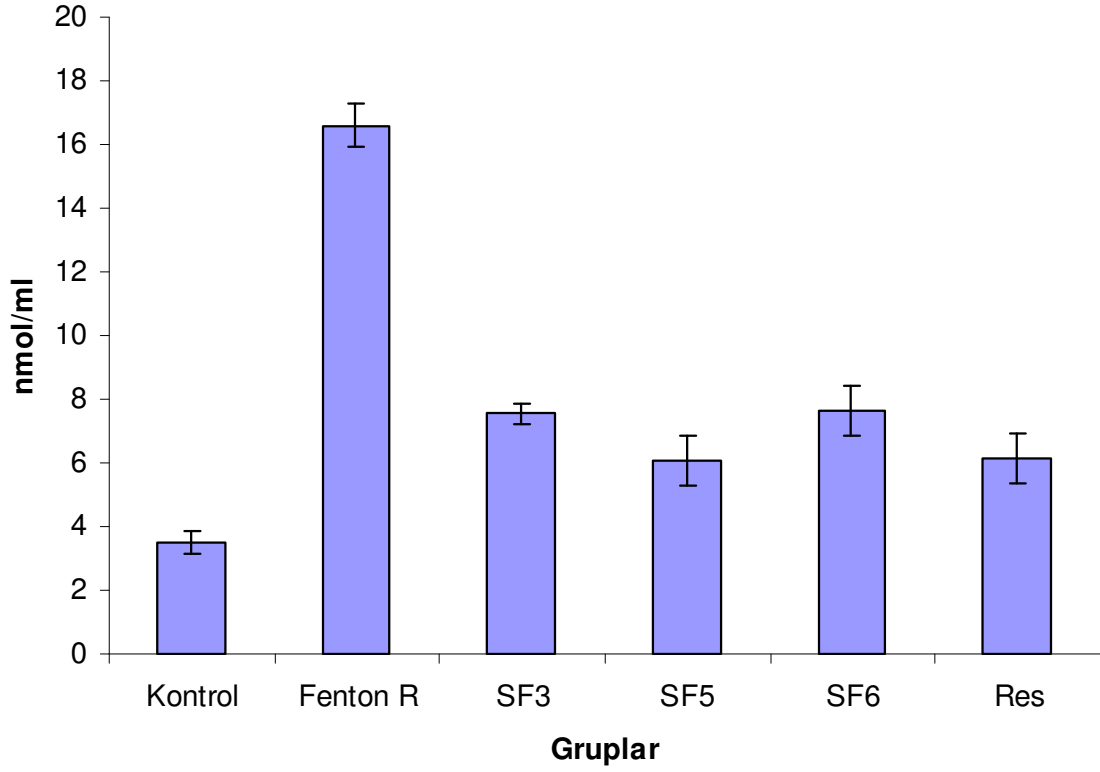
Tablo 5. Vanilya taşıyan fosfazenlerin yağ asidi miktarı üzerine etkileri (µM/ml)

Gruplar	Oleik asit (18:1, n-9)	Linoleik asit (18:2, n-6)	Linolenik asit (18:3, n-3)
Fenton R	2,42 ± 0.44 ^a	5,13 ± 0.59 ^a	20,23 ± 1.71 ^b
Quersetin	2,62 ± 0.19 ^a	3,28 ± 0.45 ^c	24,01 ± 1.69 ^b
VFOS	2,17 ± 0.45 ^a	5,58 ± 0.78 ^a	23,32 ± 1.66 ^b
VF1	2,18 ± 0.25 ^a	3,84 ± 0.56 ^c	26,41 ± 1.31 ^c
VF2	1,93 ± 0.16 ^b	3,17 ± 0.47 ^c	14,70 ± 1.54 ^d
VF3	3,41 ± 0.36 ^c	6,70 ± 0.45 ^d	26,41 ± 1.28 ^c
VF4	2,79 ± 0.17 ^a	5,78 ± 0.21 ^b	26,28 ± 1.15 ^c
VF5	3,55 ± 0.28 ^c	6,90 ± 0.48 ^d	22,12 ± 1.01 ^b
VF6	2,05 ± 0.13 ^b	5,23 ± 0.45 ^a	24,51 ± 1.26 ^b

a: p>0.05 b: p<0.05 c: p<0.01 d: p<0.001

Tablo 6. Süstitüe vanilin grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizmalar	VFOS	VF1	VF2	VF3	VF4	VF5	VF6
<i>Escherichia coli</i>	-	11	13	23	11	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	11	9	31	13	19	20
<i>Bacillus megaterium</i>	-	9	8	21	15	33	31
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	-	-	-	23	8	33	35
<i>Candida albicans</i>	9	8	13	28	9	31	23
<i>Candida glabrata</i>	-	-	8	28	8	27	8
<i>Epidermophyton sp.</i>	-	25	24	30	-	33	35
<i>Trichopyton sp.</i>	15	13	8	26	-	-	25



Şekil 47. Sübstitüe salisilat grubu taşıyan ve OH grubu bulunduran SF3, SF5, SF6 fosfazenler ile Resveratrol'ün MDA-TBA oluşumunu etkilemesi ile ilgili karşılaştırma

Tablo 7. Salisilât grubu taşıyan fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizmalar	SFOS	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6
<i>Escherichia coli</i>	19	10	-	-	-	23	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8	-	10	8	15	16
<i>Bacillus megaterium</i>	-	8	-	11	15	21	23
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	8	14	-	-	8	21	25
<i>Candida albicans</i>	13	15	-	19	8	13	25
<i>Candida glabrata</i>	8	13	-	15	10	23	24
<i>Epidermophyton sp.</i>	8	-	-	23	11	23	25
<i>Trichopyton sp.</i>	8	-	8	10	8	9	19

Tablo 8. Sübstitüe gruplarında brom bulunduran fosfazenlerin MDA-TBA ve DPPH• radikalini temizleme aktiviteleri

Maddeler	MDA-TBA (nmol/ml)	DPPH•radikalini Temizleme aktivitesi (%)
Kontrol	12,53±0,13	-
Fenton R	46,72±0,48 ^a	-
BrFOS	40,23±0,74 ^b	1,00±0,001
BrF1	41,14±1,35 ^b	30,76±0,37
BrF2	45,89±0,31 ^a	1,00±0,001
BrF3	32,13±1,07 ^b	83,95±0,30
BrF4	43,69±0,41 ^a	1,00±0,001
BrF5	13,14±0,30 ^d	88,66±0,53
BrF6	8,53±0,33 ^d	66,19±0,84
Quersetin	19,23±1,32 ^c	99,14±0,03
Resveratrol	9,27±0,59 ^d	97,05±0,01

a: p>0.05 b: p<0.05 c: p<0.01 d: p<0.001

Tablo 9. Sübstitüe gruplarında brom bulunduran fosfazenlerin antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizmalar	BrFOS	BrF1	BrF2	BrF3	BrF4	BrF5	BrF6	Resveratrol
<i>Escherichia coli</i>	13	-	-	19	8	13	21	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8	-	-	9	8	17	8
<i>Bacillus megaterium</i>	13	11	8	17	11	11	23	10
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	19	17	13	11	16	13	23	8
<i>Candida albicans</i>	13	15	13	22	8	-	19	8
<i>Candida glabrata</i>	-	8	-	-	-	-	-	8
<i>Epidermophyton</i> sp.	8	8	-	13	-	8	19	-
<i>Trichopyton</i> sp.	8	8	-	-	-	-	23	-

Tablo 10. Farklı süstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin doymamış yağ asitlerinin kullanıldığı ortamda MDA-TBA oluşumu üzerine etkileri (nmol/ml)

Gruplar	MDA-TBA
Kontrol	2,93 ± 0,36
Fenton R	19,32 ± 0,50 ^a
SHF	19,70 ± 0,65 ^a
QF	14,70 ± 0,74 ^b
INDF	10,47 ± 0,20 ^c
FLF	10,54 ± 0,39 ^c
BNF	15,16 ± 0,40 ^b
HPF	14,89 ± 0,21 ^b
HPFF	6,51 ± 0,21 ^d
ABAF	21,13 ± 0,44 ^a
SYPF	22,89 ± 0,68 ^a
BFF	25,51 ± 0,69 ^a
HKFF	11,02 ± 0,41 ^c
AFF	26,12 ± 2,17 ^a
AEMF	16,48 ± 0,22 ^b
Quersetin	12,79 ± 0,28 ^c
Resveratrol	5,93 ± 0,12 ^d

a: p>0.05 b: p<0.05 c: p<0.01 d: p<0.001

Tablo 11. Farklı süstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizmalar	SYPF	BFF	AFF	HKFF	HPF	HPFF	AEMF
<i>Escherichia coli</i>	10	12	11	18	21	23	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	8	9	11	17	18	15
<i>Bacillus megaterium</i>	9	9	8	13	15	14	12
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	8	8	-	17	18	12	13
<i>Candida albicans</i>	8	8	8	15	21	15	10
<i>Candida glabrata</i>	8	9		12	23	13	11
<i>Epidermophyton</i> sp.	9	10	-	8	24	8	9
<i>Trichopyton</i> sp.	8	8	-	8	25	8	10

Tablo 12. Farklı süstitüe gruplar taşıyan fosfazenlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizmalar	ABAF	SHF	QF	INDF	FLF	BNF
<i>Escherichia coli</i>	21	23	10	10	9	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	27	8	8	8	13
<i>Bacillus megaterium</i>	17	25	10	10	8	10
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	18	27	11	11	8	8
<i>Candida albicans</i>	15	13	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	13	15	8	8	8	-
<i>Epidermophyton</i> sp.	10	10	-	-	-	8
<i>Trichopyton</i> sp.	12	10	-	-	-	9

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmamızda farklı yapılarda sentezlenen siklofosfazenlere (4- fenilfenoksi, 2-formilfenoksi, 2-metoksi-4-(p-siyanofenilamin)metil) fenoksi,4-bromo-2-formilfenoksi) değişik sübstitüe grupların ilave edilmesiyle ortaya çıkarılan fosfazen bileşiklerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri çalışıldı. Ayrıca quersetin ve resveratrol gibi güçlü antioksidan aktiviteye sahip moleküllerle karşılaştırma yapıldı.

4-formil fenoksi (Şekil 4) bileşiğinden sentezlenen moleküllerin karşılaştırılmasında Fenton reaktifi içeren grupta kıyaslandığında 2- amino-4-klorofenol (PHF3) ile 2-aminofenol (PHF5) bileşiklerinin lipid peroksidasyon düzeyini (LPO) belirgin düzeyde azalttığı saptandı ($p<0,001$). PHF3 ile resveratrol ve PHF5 ile quersetin arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi (Tablo 1). PHF1 ile Fenton R grubu arasında farklılık gözlenmezken ($p<0,005$) PHF4'ün LPO düzeyini Fenton R'ye göre daha fazla arttığı gözlemlendi ($p<0,01$). PHFOS'un ise LPO düzeyini artırmadığı halde PHF3 ile PHF5 kadar olmasa da LPO düzeyini kısmen azalttığı tespit edildi ($p<0,05$).

LPO düzeyi ile ortama ilave edilen yağ asitlerinin miktarı kıyaslandığında reaksiyon ortamındaki oleik asit (18:1, n-9), linoleik asit (18:2, n-6) ve linolenik asit (18:3, n-3)'ün miktarlarının LPO düzeyinin azalışına bağlı olarak PHF3, PHF5 ve resveratrol gruplarında korunduğu saptandı (Tablo 1). Rutin ve quersetin antioksidan moleküller, LPO düzeyini Fenton R grubuna göre belirgin düzeyde azaltmasına rağmen yağ asidi üzerinde koruyucu etkiye sahip olmadığı belirlendi (Tablo1).

Aynı madde gruplarının antimikrobiyal etkileri karşılaştırıldığında ise PHF3 ile PHF5'in diğerlerine göre daha etkili olduğu saptandı (Tablo 2). PHF3 ve PHF5' in hem antioksidan hemde antimikrobiyal etkiye sahip olmasını, 4-fenilfenoksi bileşiğine eklenen sübstitüe gruplardaki OH gruplarından kaynaklandığı düşünüyoruz.

Flavonoid bileşiklerinden olan quersetinin LPO oluşumu üzerine etkili olmada moleküler yapısındaki OH gruplarından ileri geldiği belirtilmektedir. Özellikle Fenton reaksiyonu ile meydana gelen $OH^{\bullet}$ radikallerinin etkisiz hale getirilmesinde antioksidan moleküllerinin yapılarındaki OH gruplarının elektron vererek $OH^{\bullet}$ radikallerinin hasarını önlediği ileri sürülmektedir.

Bulgularımızda Fenton reaktifi bulunan ortamda quersetin ve rutin gibi antioksidanların yalnızca Fenton reaktifi içeren (Fenton R) grubuna göre LPO düzeyini azaltması ortamda oluşan $OH^{\bullet}$ radikallerini elektron vererek etkisizleştirme özelliğinden

kaynaklanmaktadır. Sentezlenen fosfazen moleküllerin bulunduğu reaksiyon ortamında da LPO oluşum düzeyini azaltması, sübstitüe gruplardaki OH grubu ile sıvı ortamda hidrojen bağı yapması ve ortama elektron vererek oluşan $\text{OH}^\bullet$ radikallerini etkisiz hale getirdiğinin bir kanıtıdır. PHF1 ve PHF4 bileşiklerinin sübstitüe gruplarında OH gruplarının bulunmaması ve LPO sonuçlarının yüksek çıkması yukarıdaki hipotezimizi desteklemektedir. Ayrıca antimikrobiyal etkide PHF3 ile PHF5'in deneyde kullanılan bütün mikroorganizmalar üzerinde etkili olması yapılarındaki OH gruplarının hidrojen bağı yaparak organizmalar üzerinde daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

2-formilfenoksi bileşiğinin sübstitüe gruplarının karşılaştırılmasında (Şekil 11) SF3, SF5 ve SF6 (Şekil 14, 16, 17) bileşiklerinin LPO oluşumunu engellemede quersetin ve resveratrol gibi antioksidanlara göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 3). Ayrıca DPPH $^\bullet$ radikali üzerinde yapılan çalışmada SF3 ile SF5'in % 83 civarında ve SF6'nında % 73 civarında radikal giderici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). $\text{OH}^\bullet$ radikalinden kaynaklanan LPO oluşumunu önlemede ve DPPH $^\bullet$ radikalini temizlemede SF3, SF5, SF6 gibi sentezlenen fosfazen moleküllerin doğal besinlerde bulunan quersetin ve resveratrol flavonoid bileşiklerle paralel sonuçlar göstermiştir. SFOS, SF1, SF2 ve SF4 gibi fosfazenlerin ise sübstitüe gruplarında OH grubu bulunmadığı için elektron verici özellikte olmadığı ve sonuçta LPO düzeyinin Fenton R grubuyla paralel ayrıca SF4'de LPO düzeyinin daha da yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu moleküllerin $\text{OH}^\bullet$ radikalinden kaynaklanan LPO oluşumunu engellememeye paralel olarak DPPH $^\bullet$ radikalini temizleme aktivitesinde de yetersiz olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

SF3, SF5, SF6, VF6 ve BrF6'nın karşılaştırıldığı başka bir denemede ise LPO oluşumunu önlemede Fenton R grubuna göre bütün fosfazen gruplarının etkili olduğu saptandı ($p<0,01$) (Tablo 4). Bu fosfazen gruplarıyla resveratrol kıyaslandığında istatistiksel farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). LPO sonuçlarına bağlı olarak yağ asidi sonuçları kıyaslandığında LPO sonuçlarının düşük olduğu hem fosfazen gruplarında hem de resveratrol grubunda 18:1, 18:2, 18:3 miktarlarının Fenton R grubundan yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Tablo 4).

Resveratrol bitkisel besinlerde bulunan güçlü bir antioksidan moleküldür. Özellikle trans resveratrolün hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda LPO oluşumunu azalttığı ve biyolojik molekülleri koruduğu ileri sürülmüştür. Bulgularımızda da reaksiyon ortamındaki yağ asitlerinin resveratrol grubunda Fenton R grubuna göre yüksek olması yukarıda belirtilen

çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Sübstitüe OH grubu taşıyan fosfazen moleküllerin gruplarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yaşlı dişi ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada KBrO_3 verilen gruptaki ratların hem serum hem de eritrositlerdeki LPO oluşumunu reveratrol tarafından etkili şekilde önlendiği belirlenmiştir [74].

Vanilya sübstitüe gruplarla yapılan LPO çalışmasında Fenton R grubuna göre bütün madde gruplarının LPO düzeyini azalttığı saptandı ($p<0,001$) (Şekil 46). Madde gruplarının kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında özellikle VF1, VF3, VF5 ve VF6 bileşiklerinin bulunduğu gruplardan LPO düzeyinde daha çok azalma olduğu gözlemlendi. Vanilya sübstitüe grup taşıyan fosfazen moleküllerin çoğunluğunda LPO oluşumunu engellemesi yapılarındaki metoksi grubunun (H_3CO) elektron verici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Metoksi grubunu taşıyan moleküler yapıya OH taşıyan grupların da eklenmesi LPO oluşumu daha da azaltabilir. LPO sonuçlarıyla yağ asidi sonuçları karşılaştırıldığında özellikle VF3, VF5 ve VF6'daki sonuçların uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 5). Vanilyalı bileşiklerin antimikrobiyal deneme sonuçları da VF3, VF5 ve VF6 madde gruplarında daha yüksek bulundu (Tablo 6). Bu sonuçlarında sübstitüe gruplarındaki OH gruplarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Salisilat sübstitüe grupları taşıyan SF3, SF5 ve SF6 ile yapılan başka bir LPO çalışmasında Tablo 4' deki bu sonuçlara yakın sonuçlar elde edilmiştir. İkinci defa yapılan deneyde benzer sonuçların elde edilmesi bütün bulgularımızı desteklemektedir. Salisilat taşıyan maddelerle yapılan antimikrobiyal çalışmada özellikle SF5 ile SF6 deneyde kullanılan bütün mikroorganizmalar üzerinde etkili olmuştur (Tablo 7).

Sübstitüe gruplarında brom taşıyan fosfozen moleküllerle yapılan LPO çalışmalarında Fenton R grubuna göre LPO düzeyi BrF3, BrF5 ve BrF6 moleküllerini içeren gruplarda değişik oranlarda azaldığı saptandı ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.0001$) (Tablo 8). Özellikle BrF5 ile BrF6 gruplarındaki LPO miktarlarının resveratrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi. BrF5 ile BrF6'daki LPO düzeyinin quersetin grubundan düşük olmasına rağmen, BrF3 grubundaki LPO düzeyinin quersetin'den yüksek olduğu saptandı. BrFOS, BrF1, BrF2 ve BrF4 fosfozen bileşiklerinin Fenton R grubuna göre LPO düzeyini düşürmediği belirlendi (Tablo 8). Sübstitüe gruplarında elektron çekici özellikte olan Br taşınmasına rağmen, BrF3, BrF5 ve BrF6 fosfazenlerinin $\text{OH}^\bullet$ radikalinden kaynaklanan LPO oluşumu etkili bir şekilde azalttığı saptandı. Ancak BrF3 fosfazen bileşiğinde LPO düzeyinin BrF5 ile BrF6 bileşiğine göre yüksek olması moleküler yapısındaki elektronları çeken Br dışında Cl atomlarının da

bulunmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Cl ortama verilen elektronları kendine çekerek molekülün etkililiğini azaltmaktadır.

DPPH[•] radikalini temizleme aktivitelerine göre, BrF3, BrF5 ve BrF6 bileşiklerin sonuçları quersetin ve resveratrol sonuçlarına yakın olmasına rağmen BrFOS, BrF2 ve BrF4 bileşiklerinin hiç etkili olmadığı belirlendi. BrF1'in ise % 30'larda etkili olduğu saptandı (Tablo 8).

Süstitüe gruplarında brom ihtiva eden fosfozenlerin antimikrobiyal etki çalışmasında BrF6, *C. glabrata* haricinde deneyde kullanılan bütün mikroorganizmalara üzerinde yüksek düzeyde inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlendi (Tablo 9). *C. glabrata* üzerinde BrF3 ve BrF5 bileşiklerinde etkili olmadığı saptandı (Tablo 9).

Farklı süstitüe gruplar taşıyan fosfozenlerin LPO oluşumu üzerinde engelleyici etkisinin araştırıldığı başka bir denemede Fenton R grubuna göre SHF, BNF, HPF, SYPF, BFF, AFF, AEMF bileşiklerinin LPO düzeyini düşürmede etkisiz kaldığı halde ABAF, SYPF, BFF, AFF olarak simgelenen fosfazen bileşiklerinin daha da artırdığı belirlendi (Tablo 10). Ancak INDF, FLF ve HKFF fosfozen bileşiklerinin quersetin gibi antioksidan molekül ile benzer sonuçlar gösterdiği belirlendi (Tablo 10). HPFF ile simgelenen fosfozen bileşiğinin ise resveratrol gibi LPO düzeyini azalttığı saptandı (Tablo 10).

SHF fosfazen bileşiğinin süstitüe yapılarında Cl ile SH grupları bulunmaktadır (Şekil 32). Cl'un elektron çekme özelliği vardır. SH grubunda ise S atomundan dolayı elektron salınımı zorlaşmaktadır. Bundan dolayı Fenton reaksiyonu ile oluşan OH[•] radikalinin mevcudiyetinde meydana gelen LPO oluşumu bu molekül tarafından engellenememektedir. Bulgularımızdaki sonuçlarda yukarıda ifade edilen olayla uyumlu olduğu görülmektedir (Tablo 10). Elektron verici olmayan ya da çok az elektron verebilen QF, BNF, ABAF ve AEMF harfleriyle simgelenen fosfazenlerin önemsiz düzeyde LPO oluşumu azalttığı ya da kısmen de olsa Fenton R grubuna göre yükselttiği bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 33, 36, 39, 44). AFF, SYPF ve BFF ile simgelenen fosfazenlerin ise elektron verme özellikleri olmadığı halde, güçlü bir şekilde elektron çekici özelliğe sahip olduğu ileri sürülmektedir. Şekil 38'de gösterilen HPFF bileşiğinin elektron verme kapasitesi yüksek olduğu için LPO düzeyini resveratrol kadar düşürmüştür. Tablo 10'daki sonuçlara bakıldığında bu hipotezin doğruluğu ortaya konulmaktadır (Tablo 10).

Antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı çalışmada SYPF, BFF, HKFF, HPF, HPFF, AEMF, ABAF, SHF ve QF gibi bileşiklerin araştırılmada kullanılan bütün organizmalar üzerinde etkili olduğu halde SHF, QF, HPF, HPFF ve ABAF gibi bileşiklerin

mikroorganizmaların bulunduğu ortamda daha büyük inhibisyon zonu oluşturduğu saptandı (Tablo 11-12). Erecevit ve arkadaşları tarafından bittım sabununun antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada mikroorganizmalar üzerinde nystatin, streptomycin sülfat adlı antibiyotiklerin 9-10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduklarını saptamışlardır [75]. Sentezlenen maddeler ile bu antibiyotiklerin karşılaştırılmasında birçok maddenin bu antibiyotiklerden daha etkili antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu görülmektedir (Tablo 2, 6, 7, 9, 11, 12).

Sonuç olarak kimyasal olarak sentezlenen bileşik ya da bileşik gruplarının doğrudan canlı sisteme uygun olduğunu söyleyemeyiz. Sentezlenen herhangi bir madde değişik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterebilir. Ancak antimikrobiyal etkiye sahip olma canlı sistemle uyumlu anlamına gelmez. Toksik etkiye sahip birçok bileşik de mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki göstermektedir.

Değişik süstitüe grupların ilavesiyle sentezlenen bu trifosfazen türevleri elbette insanların diyetinde yer alan herhangi bir molekülle benzerlik göstermez. Bu fosfazenlerle karşılaştırma yaptığımız trans resveratrol, quersetin ve rutin gibi antioksidan moleküller insanların besinlerini oluşturan meyve ve sebzelerin çoğunda bulunmaktadır. Bu antioksidan moleküller besin yoluyla vücuda alınır ve hücrelere taşınarak gerekli fonksiyonlarını yerine getirirler. Bu antioksidanların moleküler yapılarında bulunan OH grupları, hücre içinde oluşan serbest radikal reaksiyonlarına karşı oldukça etkilidirler.

Çalışmamızda kimyasal olarak sentezlenen trifosfazenlerin yapılarındaki süstitüe gruplarda elektron verici moleküllerin bulunması ortamdaki radikal reaksiyonlarını engellemektedir. Fosfazen molekülün yapısında elektron verici OH gruplarının bulunması lipid peroksidasyon olayını engellediği gibi, aynı molekül yapısında Cl, Br gibi elektron çekici yapıların olması olayın dengesini değiştirmektedir. Süstitüe gruplarda elektron verici moleküllerin olmadığı gibi elektron çekici moleküllerin bulunması LPO oluşumunu azaltmadığı gibi artışı sağlamaktadır.

Fosfazen bileşikler elbette insan diyetinde kullanılamaz. Fakat fosfazen bileşiklerin çoğunluğu canlı vücudu içerisinde değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Yeni sentezlenmiş bir bileşiğin canlı sisteme uyum sağlayıp sağlamadığı bu tip çalışmalarla ortaya çıkarılıp kullanıldığı zaman da herhangi bir sorun ile karşılaşılmaz. LPO düzeyini artıran bir molekül canlı sistemde kullanılmaya kalkışıldığında, faydasından çok zararlı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Çünkü bizim bu çalışmada kullandığımız yağ asidi molekülleri canlı sistemin membran yapısında bulunan moleküllerdir. *In vitro* da hücre içi şartlar oluşturularak yapılan bu deneyin

sonucu doğrudan *in vivo* şartları da ilgilendirmektedir. Sonuçlar bu şekilde dikkate alındığında deney sonuçlarımızın bilime katkısı anlamlı olacaktır.

5.KAYNAKLAR

- [1] **Allock, H. R.**, 1972. Phosphorus-Nirtogen Compounds. Academic Pres, London, 498p.
- [2] **Kılıç, A., Begeç, S., Çetinkaya, B., Kılıç, Z., Gündüz, N., Yıldız, M., Hökelek. T.**, 1996. Unusual Products in The Reaction of Hexachlorocyclotriphosphazatriene with Sodium Aryl Oxides, *Heteroatom Chemistry*, **7**, 249–256.
- [3] **Carriedo G. A., Alonso, F. J. G., Elipe, P. G., Brillas, E., Julia, L.**, 1996. Incorporation of Stable Organic Radicals into Cyclotriphosphazene: Preparation and Charecterization of Mono- and Diradical Adducts, *Organic Letters*, **3**, 1625–1628.
- [4] **Allcock, H. R., Morrissey, C. T., Way, W. K., Winograd, N.**, 1996. Controlled Formation of Carboxylic Acid Groups at Polyphosphazene Surfaces; Oxidative and Hydrolytic Routes, *Chem. Mater.*, **8**, 2730-2738.
- [5] **Laguna, M. T. R., Tarazona, M. P., Carriedo G. A., Alonso, F. J. G., Fidalgo, J. I., Saiz, E.**, 2002. Thermal Degradation and Solution Properties of Poly(2,2'-dioxybiphenylphosphazene), *Macromolecules*, **35**, 7505-7515.
- [6] **Aslan, F.,Ozturk,A. I., and Arslan, M.**, 2003. The reaction of n-dichlorophosphoryl-p-trichlorophosphazene with alkyl grignard reagents. *Heteroatom chemistry*, **14(5)**:413-416.
- [7] **Allock, H. R.**, 1972. Phosphorus-nirtogen compounds. Academic press, London, 498p.
- [8] **Graham Solomons, T.W.**, Organik Kimya, 7. basım, 738.
- [9] **Hayvalı, Z., Gündüz, N., Kılıç, Z. ve Weber, E.**, 1999. Synthesis and Characterization of New Bis(crown ether)s of Schiff Base Type Containing Recognition Sites For Sodium And Nickel Guest Cations, *J. Prakt. Chem.*, **341(6)**, 568-573.
- [10] **Zeng, W., Mao, Z., Wei, X., Li, J., Hong, Z. and Qin, S.**, 2002. Synthesis, Dioxygen Affinities And Biomimetic Catalytic Oxidation Performance of Crown Ether-tethered Schiff Base Transition-Metal Complexes *Journal of Supramolecular Chemistry*, **2(6)**, 501-507.
- [11] **Olie, G. H., Olive, S.**, 1984. The Chemistry of The Catalyzes Hydrogenation of Carbon Monoxide Springer, Berlin, 152.
- [12] **Rahaman, S. H., Choowdhury, H., Bose, D., Ghosh, R., Chen-Hsing, G., Barindra Kumar Ghosh, H.**, 2005. Synthesis, Structure and Properties of Mononuclear Cobalt (II) and Cobalt (III) Pseudohalide Complexes Containing N-Donor

- Schiff Bases: Synthetic Control of Metal Oxidation Levels Polyhedron, **24**:(12) 1755-1763.
- [13] **Kunkely, H. and Vogler, A.** 2001. Photochemistry of N, N'-Bis(3,5-di-tert-butylsalicylidene)-1,2-Diaminocyclohexane and its Co(II) Complex in Chloroform, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **138**: 51-54.
- [14] **Mederos, A., Domínguez, S., Hernández-Molina, R., Sanchiz J. and Brito, F.,** 1999. Coordinating Ability of Ligands Derived From Phenylenediamines, *Coordination Chemistry Reviews*, 193-195: 857-911.
- [15] **Hökelek, T., Gündüz, N., Hayvalı, Z. and Kılıç, Z.,** 1995. Schiff Bases and Their Complexes with Metal Ions. I. 2-Hydroxy-N-n-propyl-1-naphthaldimine (1) and Bis(2-hydroxy-κO-N-n-propyl-1-naphthaldiminato-κN)Nickel(II) (2), *Acta Cryst.*, C51, 880-884.
- [16] **Hökelek, T., Gündüz, N., Hayvalı, Z. and Kılıç, Z.,** 1995. Schiff Bases and Their Complexes with Metal Ions. Part II. Structures of N-n-butyl-2-hydroxy-1-naphthaldimine and Bis[N-n-pentyl-2-hydroxy-1-naphthaldiminato]nickel(II), *J. of Chemical Crystallography*, **25**:(12), 827-832.
- [17] **Hayvalı, Z., Gündüz, N., Kılıç, Z. ve Weber, E.,** 1999. Synthesis and Characterization of New Bis(crown ether)s of Schiff Base Type Containing Recognition Sites For Sodium And Nickel Guest Cations, *J. Prakt. Chem.*, **341**: (6), 568-573.
- [18] **Zeng, W., Mao, Z., Wei, X., Li, J., Hong, Z. and Qin, S.,** 2002. Synthesis, Dioxygen Affinities And Biomimetic Catalytic Oxidation Performance of Crown Ether-tethered Schiff Base Transition-Metal Complexes" *Journal of Supramolecular Chemistry*, **2**:(6), 501-507, (2002).
- [19] **Yıldız, M., Hayvalı, Z. ve Kılıç, Z.** 2001. Synthesis and Characterization of Some Novel Bis(crown ether) Ligands of Schiff Base Type, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **14**:(3), 869-876.
- [20] **Hayvalı, Z., Hayvalı, M., Kılıç, Z., Hökelek, T. ve Weber, E.,** 2003. New Benzo-15-crow-5 Ethers Featuring Salicylic Schiff Base Substitutions Synthesis, Complexes and Structural Study, *J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **45**:285-294.
- [21] **Hayvalı, M. ve Hayvalı, Z.,** 2004. The Synthesis of Some New Mono and Bis(Crown Ether)s and Their Sodium Complexes. Tautomerism in o-Hydroxybenzo-15-

- crown-5 Schiff Bases as Studied by UV-VIS Spectrophotometry, *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, **34**:(4), 713-732.
- [22] **Hayvali, Z., Hayvali, M. and Dal, H.**, 2004. Synthesis, and Spectroscopic Characterization of New Schiff Bases Containing the Benzo-15-Crown-5 Moiety, *Molecules*, **9**: 860-866.
- [23] **Mario Gleria and Roger De Jaeger J.**, 2001. Inorg. and Organometallic Polymers, vol. 11, 1.
- [24] **Chandrasekhar V., Vivekanandan K., Nagendran S., et.al**, 1998. Cycloalkylaminocyclo and Polyphosphazenes: X-ray Crystal structures of gem-Tetrakis(cyclopropylamino)cyclotetraphosphazene, *Inorg. Chem*, **37**, 6192-6198.
- [25] **Allcock H.R., Allen R.W., O'Brien J.P.**, 1977. Synthesis of Platinum Derivatives of Polymeric and Cyclic Phosphazenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, **12**, 3984-3991.
- [26] **Bast A, Haenen GRMM, Cees JAD.**, 1997. Oxidants and antioxidants: State of the art. The American Journal of Medicine, **91**, (Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S.
- [27] **Bruinsma K, Taren DL.** 1999. Chocolate: food or drug? *J. Am Diet Assoc* **99**: 1249-1256.
- [28] **Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM.** 2001.Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.*, **74**: 596-602.
- [29] **Strack D.**, 1997. Phenolic metabolism, In: Plant Biochemistry, Dey P.M., and Harbourne, Eds. *Academic, San Diego, CA.*, 387-416.
- [30] **Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.**, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **2**, 152.
- [31] **Larson R. A.**, 1988. The antioxidants of higher plants. *Photochemistry*, **27**, 969
- [32] **Harborne J. B., Williams C. A.**, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481.
- [33] **Heijnen C. G. M., Haenen G. R. M. M., Vekemans J. A. J. M., A. Bast.**, 2001. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 199.
- [34] **Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F.**, 2001.Electrochemical Behaviors of Quercetin and Kaempferol in Neutral Buffer Solution. *Anal. Sci.*, **17**, 599.

- [35] **Hotta H., Sakamoto H., Nagano S., Osakai T., Tsujino Y.**, 2001. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta.* **159**, 1526.
- [36] **Janeiro P., Brett A. M. O.**, 2005. Solid State Electrochemical Oxidation Mechanisms Of Morin in Aqueous Media. *Electroanalysis*, **17**, 733
- [37] **Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H.**, 2002. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds *Agric J.. Food Chem.*, **50**, 2161.
- [38] **Moon J. H., Terao J.**, 1998. Antioxidant Activity of Caffeic Acid and Dihydrocaffeic Acid in Lard and Human Low-Density Lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5062.
- [39] **Thomas M.**, (2000), "The role of free radical antioxidants", *Nutrition*, **16**, 716
- [40] **Wolf R., Wolf D., Ruocco V.**, 1998. Vitamin E: the radical protector. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **10**, 103.
- [41] **Pietta P.**, 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035
- [42] **Rosenau T., Habicher W. D.**, 1995. Novel tocopherol compounds I. Bromination of α -tocopherol—reaction mechanism and synthetic Applications. *Tetrahedron*, **51**, 7919.
- [43] **Hendrickson H. P., Kaufman A. D., Lunte C. E.**, (1994), "Electrochemistry of catechol-containing flavonoids", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 325.
- [44] **Jorgensen L. V., Cornett C., Justesen U., Skibsted L. H., Dragsted L. O.**, 1998. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radic. Res.*, **29**, 339.
- [45] **Brett A. M. O. ve Ghica M. E.**, 2003. Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, **15**, 1745.
- [46] **Nematollahi D., Malakzadeh M.**, 2003. Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfinic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **547**, 191.
- [47] **Timbola A. K., Souza C. D., Giacomelli C. and Spinelli A.**, 2006. Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**, 139.
- [48] **Korkina L. G., Afanas'ev I. B.**, 1997. *Advances in Pharmacology*. Academic Press Inc: New York, **151**.

- [49] **Rice-Evans C. A., Packer L.**, 1998. Flavonoids in Health and Disease.
Marcel Decker Inc: New York, **65**
- [50] **Lemanska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zielinski R., Soffers A. E. M. F., Rietjens I. M. C. M.**, 2001. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones.
Free Radical Biol. Med., **31**, 869.
- [51] **Pace-Asciak, CR. Hahn, S.E. Diamandis, E.P. Soleas, G. and Goldberg, D.M.**, 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta*, **235**, 207-219.
- [52] **Ostlund, RE.**, 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 533-549.
- [53] **Travacio, M. Polo, J.M. and Llesuy, S.**, 2000. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol.*, **150**, 137-146.
- [54] **Fremont L.** 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 14; **66(8)**:663-73. 110
- [55] **Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S.**, 1982. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **30(5)**:1766-70.
- [56] **Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S.**, 1983. Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med* **49(1)**:51-4.
- [57] **Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A.**, 1998. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res* **24(1)**:51-5.
- [58] **Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L.**, 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.* **24(3)**:133-8.
- [59] **Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE.**, 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 24; **341(8852)**:1103-4.
- [60] **Belguendouz L, Fremont L, Linard A.**, 1997. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 9; **53(9)**:1347-55.
- [61] **Laden BP, Porter TD.**, 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res.* **42(2)**:235-40.

- [62] **Chanvitayapongs S, Draczynska-Lusiak B, Sun AY.**, 1997. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport* 14; **8(6)**:1499-502.
- [63] **Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM.**, 1999. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 1; **59(11)**:2596-601.
- [64] **Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK.**, 1999. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* **27(1-2)**:160-9.
- [65] **Asensi, M. Medina, I. Ortega, A. Carretero, J. Carmen Bano, M. Obrador, E. And Estrela, J.**, 2001. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to it's low bioavailability. *Free Rad. Biol. and Med.*, **33**, 387-398.
- [66] **Soleas, G.J. Grass, L. Josephy, P. and Goldberg, D.M.**, 2002. Diamandis E.P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.*, **35**, 119-124.
- [67] **Liew, R. Stagg, M.A. Macleod, K.T. Collins, P.**, 2005. The Red Wine Polyphenol, Resveratrol, Exerts acute Direct Actions on guinea-pig Ventricular Myocytes. *Eur. J. of Pharm.*, **519**, 1-8.
- [68] **Das, S. Vijayk, K.T. Bagchi, A.D. Sharma, H.S. Maulik, N. and Das, D.K.**, 2005. Coordinated Introduction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after Resveratrol Consumption: A potential Mechanism for Resveratrol Preconditioning of the Heart. *Vasc. Pharm.*, **42**, 281-289.
- [69] **Kumar, A. Kaundal, R.K. Iyer, S. and Sharma, S.S.**, 2007. Effects of Resveratrol on Nerve Functions, Oxidative Stress and DNA Fragmentation in Experimental Diabetic Neuropathy. *Life sci.*, **80** 1236-1244.
- [70] **Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. and Berset, C.**, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.*, **28** (1), 25-30.
- [71] **Hsu, B. Coupar, I. M. and Ng, K.**, 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.*, **98**, 317-328.
- [72] **Shimoi, K. Masuda, S. Furugori, M. Esaki, S. and Kinae, N.**, 1994. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ -ray-irradiated mice. *Carcinogenesis*, **15**, 2669-2672.

- [73] **Christie, W.W.**, 1990. Gas chromatography and lipids. The Oil Pres, Glaskow.
- [74] **Yilmaz Ö, Keser S, Tuzcu M, Çetintaş B.**, 2007. Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) decreases lipid peroxidation level and protects antioxidant capacity in sera and erythrocytes of old female Wistar rats induced by the kidney carcinogen potassium bromate. *Environ Toxicol & Pharmacol*, **24**, 79–85, 2007.
- [75] **Erecevit P, Önganer A.N, Kırbağ S.**, 2009. The antimicrobial activity of bittim soap. *e-Journal of New World Sciences Academy* **1**, 16-20.

ÖZGEÇMİŞ

06.03.1984 yılında Elazığ' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Zooloji Ana Bilim Dalında Yüksek lisansa başladı ve halen eğitimini sürdürmektedir.