

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI 2-(4H-[1,2,4]TRİAZOL-3-İL-SULFANİL)-ASETAMİT TÜREVLERİNİN
ANTIOKSİDAN VE ANTİTÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Selahattin DEMİR

Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Biyokimya

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa KARATEPE

EYLÜL-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI 2-(4H-[1,2,4]TRİAZOL-3-İL-SULFANİL)-ASETAMİT TÜREVLERİNİN
ANTIOKSİDAN VE ANTİTÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selahattin DEMİR
101117122

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 30 Temmuz 2012

Tezin Savunulduğu Tarih : 20 Eylül 2012

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa KARATEPE
Diğer Jüri Üyeleri : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU
Yrd.Doç.Dr. Aysel SARI

EYLÜL-2012

ÖNSÖZ

Antimikrobiyal ve biyolojik aktiviteye sahip polifonksiyonel ve heteroatom ihtiva eden halkalı bileşiklerin incelenmesi, ilaç araştırmalarının ilk aşamaları için çok önemlidir. Bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevleri de bu sınıf bileşikler olup, sahip oldukları birçok biyolojik ve farmakolojik aktivitelerinden dolayı geniş bir şekilde araştırılmaktadır.

İlgili literatürlere dayanarak yaptığımız tez çalışmasında, bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin *in vitro* olarak antitümör ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır.

İlgili bilgiler ışığında yapılan bu tezi hazırlamamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mustafa KARATEPE'ye teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin sentezini gerçekleştiren Doç. Dr. Metin KOPARIR 'a, aynı zamanda antioksidan çalışmalarımızdaki yardımlarından dolayı, Arş Gör. Serhat KESER, Naci ALAYUNT ve Sibel SELÇUK'a teşekkürlerimi sunarım.

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

Selahattin DEMİR

ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	3
1.2. Serbest Radikaller.....	3
1.3. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu	4
1.4. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA).....	5
1.5. Antioksidan Tanımı ve Çeşitleri.....	6
1.6. Serbest Radikallerle Antioksidan İlişkisi	7
1.7. E Vitamininin Antioksidan Etkisi	8
1.8. A Vitamininin Antioksidan Etkisi	9
1.9. C Vitamininin Antioksidan Etkisi	10
2. MATERYAL ve METOD	11
2.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler	11
2.2. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler.....	12
2.3. L 1210 Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi	12
2.4. Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi.....	13
2.5. <i>İn vitro</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri	14
2.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile Ölçüm	14
2.5.2. C Vitamini ve MDA Analizi	14
2.5.3. A ve E Vitamini Analizi	14
2.5.4. DPPH Radikal İndirgeme Metodu ile Ölçüm.....	15
2.6. İstatistiksel Değerlendirme	15
3. BULGULAR.....	16
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	20
5. KAYNAKLAR	23
ÖZGEÇMİŞ	30

ÖZET

Bu araştırmada, bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin, lipid peroksidasyonunun derecesini gösteren MDA konsantrasyonu, antioksidan A, E, C vitaminlerinin düzeyleri üzerine olan etkisi ve antitümör özellikleri araştırıldı.

Deney grupları arasındaki karşılaştırılmalarda A, E vitaminleri ve MDA konsantrasyonlarının istatistiksel olarak değiştiğı gözlemlendi. Ölçülen parametreler ve deney süresince canlı hücre sayısına bakıldığında bileşiklerin L 1210 hücre tipinde etkili bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğı görüldü.

Sonuç olarak, ölçülen parametreler bütün maddelerin oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Antitümör Aktivite, Antioksidan Aktivite, Vitamin

SUMMARY

The Investigation of Antitumor and Antioxidant Properties of some 2-(4H-[1,2,4]triazole-3-yl-sulfanyl)-acetamide derivative

In this research, the *in vitro* effect of some 2-(4H-[1,2,4]triazole-3-yl-sulfanyl)-acetamide derivative on the MDA concentration which is an indicator of lipid peroxidation, antioxidant vitamins A, E, C levels and antitumor activity in cell culture media were investigated.

In the comparison done among groups, it was observed that concentrations of vitamins A, E and MDA were statistically changed. Looking at the measured parameters during the experiment, the number of live cells, the compounds is seen an effective antitumor activity in the L 1210 cell types.

In conclusion, the parameters measured here in the show that all compounds caused a considerable oxidative stress.

Key Words: HPLC, Antitumor Activity, Antioxidant Activity, Vitamin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	2-{[4-etil-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil}-N-(4-nitrofenil) asetamit 'in yapısı (M1)	11
Şekil 2.2.	N-(4-nitrofenil)-2-{[4-(prop-2-en-1-il)-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il] sulfanil}-asetamit 'in yapısı (M2)	11
Şekil 2.3.	N-(4-nitrofenil)-2-{[4-fenil-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil} asetamit 'in yapısı (M3)	11
Şekil 2.4.	2-{[4-(4-metilfenil)-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil}-N-(4- nitrofenil)asetamit 'in yapısı (M4)	12

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	7
Tablo 3.1. Maddelerle muamele edilmiş L 1210 hücrelerinin süreye ve doza göre % oranında canlılık durumları	16
Tablo 3.2. Maddelerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA (mg/1.10 ⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri	17
Tablo 3.3. Maddelerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin E vitamini (mg/1.10 ⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri	17
Tablo 3.4. Maddelerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin A vitamini (mg/1.10 ⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri	18
Tablo 3.5. Maddelerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin C vitamini (mg/1.10 ⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri	18
Tablo 3.6. DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları	19

KISALTMALAR

CAR	: β - karoten
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMF	: Dimetil Formamid
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPPH	: 2-2 difenil-1-pikrilhidrazil radikali
DC₅	: Fetal Bovin serum, L-Glutamin, Penisilin, Streptomisin ve insülin karışımı
ESR	: Elektron Spin Rezonans
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
HClO₄	: Perklorik asit
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
RNA	: Ribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TCA	: Trikloroasetikasit

1. GİRİŞ

Üç azot atomu taşıyan beş üyeli heterosiklik halkalar “triazol” olarak adlandırılır. Triazol türevlerinin biyolojik aktiviteleri *in vitro* olarak birçok çalışmaya konu olmuştur. Son zamanlarda antimikrobiyal ve biyolojik aktiviteye sahip polifonksiyonel ve heteroatom ihtiva eden halkalı bileşiklerin organik kimya ve biyokimya alanında yapılan çalışmaları sıkça karşılaşılan araştırma konusu olmuştur. Bazı ariltiyosemikarbazit türevleri ve bunlardan sentezlenen triazol ve onların heterosiklik türevleri antifungal [1], antibakteriyel [2], antikanser [3], antiviral [4] ve antimikrobiyal [5] özellikler gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışmada, literatürdeki yayınların bilgi ve tecrübeleri ışığında, kimya bölümünde sentezlenmiş olan bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin *in vitro* antitümör ve antioksidan etkileri incelenmiştir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol, 1,3,4-oksadiazol halkası içeren moleküllerin önemli aktivitelere (Analjezik, antiastimatik, antifungal, antibakteriyel ve antiviral) sahip moleküller olduğunu göstermiştir [1-5].

Holla ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 4-aril-3-(2-hidroksi-3,5-dibrom fenil)-5-(4-aril allopanoil metiltiyo)-1,2,4-triazol bileşiklerinin fare karaciğeri ve beyindeki monoamin oksidaz enzimini inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Bu bileşik grubu üzerinde yapılan çalışmalarda enzim inhibisyon aktivitesinin yapıya katılan süstitüentlerin pozisyonundan etkilendiğini ve 1,2,4-triazol yapısının inhibitasyonu arttırdığını belirlemişlerdir [1].

Kritsanida ve arkadaşları tarafından süstitüe tiyosemikarbazitler ve bunlardan sentezlenen triazol bileşiklerinin önemli derecede *in vitro* antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir [6].

Jacobson ve arkadaşları, sentezledikleri 1-(dimetilkarbomoil)-3,5- disüstitüe-1H-1,2,4-triazollerin insektisit aktivitesi olduğunu belirlemişlerdir [7].

Holla ve arkadaşları tarafından 3-ariloksimetil-4-(5-nitro-2-furfuriliden amino)-merkpto-1,2,4-triazol bileşiğinin disk difüzyon tekniği ve standart olarak furazin kullanılarak antibakteriyel aktivitesi test edilmiş, yüksek derecede *in vitro* antibakteriyel etki gözlenmiştir. Triazol yapısına p-bromo fenoksimetil'in katılımıyla bu etkinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. [8].

Palaska ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 1-açiltiyosemikarbazit, 1,3,4-oksadiazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,2,4-triazol-3-tiyon türevleri, ateş düşürücü ve mide ağrılarını (ülser, gastrit) iyileştirici etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca sentezlenen bu bileşiklerde herhangi bir yan etkiye rastlanılmamıştır [9].

Thomas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 1-[1-(6-metoksi-2-metilkinolonin-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metanamin bileşiğinin birçok türevi sentezlenmiştir. Bütün bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Bunların çoğunluğunun ılımlı antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [10].

Başka bir çalışmada, Benzilpiperidin-4-il metil amino süstitüentli triazol türevleri sentezlenmiş ve bileşiklerin çoğunun dermofitlere ve patojenik mantarlara karşı iyi antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir [11].

Yine, piperazinil kinolonların, N-(5-benziltiy-1,3,4-tiyadiazol-2-il) ve N-(5-benzilsülfonil-1,3,4-tiyadiazol-2-il) türevleri sentezlenerek, gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir [12].

1,2,3-triazol bileşiklerin sulfanilamid türevlerinin antimikrobiyal özellikleri tespit edilmiştir [13].

Ashraf ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, antiinflamatuvar etkenleri bulmak amacıyla 1,2,4 triazol asetik asit türevlerini sentezlemişlerdir. 1,2,4-triazol iskeletine sahip birçok bileşik antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir. Ayrıca sentezlenen bu bileşiklerde gastrointestinal (mide-bağırsak) herhangi bir yan etkiye rastlanılmamıştır [14].

1,2,4-triazol halkası ve sülfanil-asetamid ihtiva eden bileşiklerin antimikrobiyal ve toksik etkileri bilinmektedir [15,16,17].

Maxwell ve arkadaşları, [4-fenil-5-(3,4,5-trihidroksi)fenil-4H-1,2,4-triazol-3-il]tiyo]asetik asit bileşiğinin süperoksit yok edici aktivitesinin olduğunu belirledikten sonra bu bileşiğin *in vivo* antiinflamatuvar aktivitesini araştırmışlar ve bileşiğin proinflamatuvar olduğunu bildirmişlerdir [18].

Demirbaş ve arkadaşları, 3-alkil-4-alkiliden/alkilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-onları antitümör etkili yeni bir sınıf olarak tanımlamışlardır [19].

Adhikari ve arkadaşları, sentezledikleri tiyosemikarbazit, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,2,4-triazol türevlerinin bazılarının *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite gösterdiklerini, aynı zamanda 1,3,4-tiyadiazol türevlerinin bazılarının *Pseudomonas vulgaris*'e karşı antibakteriyel etkili ve antitüberküloz etkili olduğunu ve 1,2,4-triazollerin çoğunun *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir [20].

Kane ve arkadaşları, 3(alkiltiyo)-5-aril-4*H*-1,2,4-triazollerin striknin ile oluşturulmuş konvülsiyonların selektif antagonistleri olduğunu bildirmişlerdir [21].

Tozkoparan ve arkadaşları, 3-süstitüe-1,2,4-triazol-5-tiyon ve triazollerin kloroasetikasit ve süstitüe benzaldehitlerden olan reaksiyon sonucu oluşan 6-benzilidentiyazolo[3,2-*b*]-1,2,4-triazol-5(6*H*)-onların antiinflamatuvar etkilerini ve gastrik ülser insidansını araştırmışlar, triazolün kendisi ile 4-kloro süstitüenti taşıyan kondense halkalı yapının aktivitesini yüksek bulmuşlardır [22].

Shah ve arkadaşları, 3-(2-hidroksifenil)-4-allil-5-merkapt-4*H*-1,2,4- triazolün diüretik etkili olduğunu bildirmişlerdir [23].

Ertan ve arkadaşları, 3,5-disüstitüe-1,2,4-triazol ve s-triazol-N-glikozitleri sentezlemişler ve bileşiklerin antiviral etkili olduğunu bildirmişlerdir [24].

Görüldüğü gibi bazı 2-(4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin biyolojik aktiviteleri *in vitro* olarak bir çok çalışmaya konu olmuştur.

1. 1. Çalışmanın Amacı

Çalışmada bazı 2-(4*H*-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin biyolojik etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin doku örneklerinde HPLC cihazı ile A, E, C vitaminlerini ve MDA analizleri yapılarak *in vitro* olarak antioksidan ve antitümör özellikleri araştırılmıştır. Burada bileşikler mikroorganizmanın bulunduğu ortama ilave edilerek antitümör aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1. 2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip, reaktif ve kısa ömürlü kimyasal bileşiklerdir. 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 bulundukları paylaşılmamış elektron sayesinde kolaylıkla reaksiyon verebilirler ve bu yüzden de oldukça reaktiftirler. Serbest radikallere, oksidan

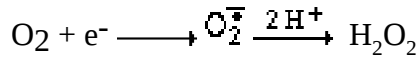
moleküller veya en doğru adlandırma ile "Reaktif Oksijen Partikülleri" de denilmektedir [25].

1. 3. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu

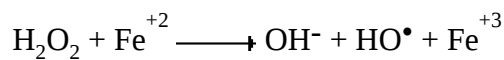
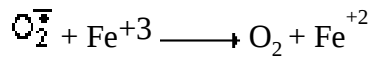
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

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 [26].

Bir serbest radikalın başlangıç ürünü moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyon radikalıdır ($O_2^{\cdot -}$). Bir serbest radikal, çiftleşmemiş elektrona sahip bir atom veya moleküldür. Bu ürün kararsız bir yapıdır ve çevresindeki bir organik veya inorganik yapıya saldırabilir. Peroksit anyonu çözeltiden iki proton alarak hidrojen perokside dönüşür.



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 [27].



HO• radikali, canlı sistemlere çok zararlı olabilecek çok güçlü bir radikaldır. Birçok hastalıklara sebebiyet verebilecek biyokimyasal değişimleri oluşturulabilir [28].

Çok kısa yaşam süreleri olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Serbest radikaller hücrenin hedef olarak seçtiği farklı bölgelerinde farklı hasarlara neden olurlar. Nükleik asit ve bazıları hedef aldıklarında sonuç hücre döngüsünde hasar ve çeşitli mutasyonlar olurken, doymamış ve tiol içeren aminoasitler hedef olduğunda proteinde denatürasyonu, çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklikler meydana gelir. Eğer serbest radikallerin hedefi DNA ise, DNA zincir kırıkları ve baz değişiklikleri meydana gelebilmektedir [29,30].

Serbest radikaller belli miktarlarda hücreler tarafından bazı hücre içi redoks ve sinyal farklılıklarını göstermek gibi fizyolojik faydalar için kullanılabilir [31].

1.4. 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 [31].

Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, geniş miktarlarda poliansature yağ asiti ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipid radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir işaretidir. Biyolojik membranların en önemli unsurları lipid ve proteinlerdir. Lipid peroksidasyonu, lipidler kadar mebran proteinlerini de hasara uğratabilir [32].

Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde O₂'nin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az yada çok degradasyonu ile sonuçlanan hücre lipidlerinin peroksidasyonudur [31].

Oksijen molekülü lipidlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül 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 [33].

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [34].

1.5. 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, okside olabilir bir substratla mukayese edildiğinde, düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli derecede geciktiren ya da inhibe eden "herhangi bir substrat" olarak tanımlanmaktadırlar. Endojen (doğal) ve eksojen (ilaçlar) antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler [31,35].

Tablo 1.1. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

A- Endojen (Doğal) Antioksidanlar		
I. Enzimler	<i>II. Makromoleküller</i>	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	- Miyogloblin	- A vitamini-β-karoten
- Sitokrom -C oksidaz		- Glukoz
		- 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		

1.6. 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 [36].

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 [37]. 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. Serbest radikaller son derece reaktif moleküller olup oksidatif strese sebep veren maddelerdir [38]. Epigallocatechin-3-o-gallate (EGCG), likopen, quersetin, genistein, ellagik asit, ubiquinon ve indole-3-karbinol, askorbik asit, vitamin E önemli antioksidanlar olarak bilinir.

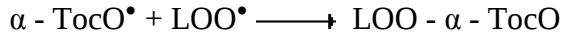
1.7. E Vitamininin Antioksidan Etkisi

E vitamininin normal fizyolojik süreçlerde ve farklı hastalık durumlarındaki rolü sürekli olarak araştırılmıştır. E vitamini diğer biyolojik moleküllerden daha fazla peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önler ve hücre yapısını koruyarak güçlü bir antioksidan etki gösterir [31]. 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 [39]. Lipid peroksidasyonunda oluşan peroksit radikalleriyle reaksiyona girerek çok fazla zayıf ve etkisiz bir radikal olan tokoferoksil radikalini oluşturur.



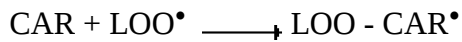
Daha sonra tekrar ikinci bir radikalle reaksiyona girerek radikal olmayan bir ürün olan LOO - TocO'yi oluşturur.



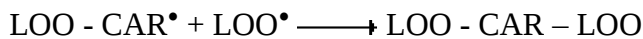
Böylece her tokoferol molekülü, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını önleyerek antioksidan etkisini gösterir [40].

1.8. A Vitamininin Antioksidan Etkisi

Konjuge polienlerin büyük kısmı benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. 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 [41].



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 [42]



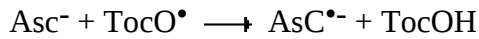
β - karoten ile peroksil radikalının reaksiyonundan oluşan ürünlerin bazısı son zamanlarda ESR ile tarif edilmiştir. Ürünler bazı epoksitler ile β - karotenin karbonil türevleridir [43,40].

1.9. C Vitamininin Antioksidan Etkisi

C vitamini kimyasal olarak askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. 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 [44,45].

Vitamini güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. C vitamininin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir. [46]. 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 oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir [47].

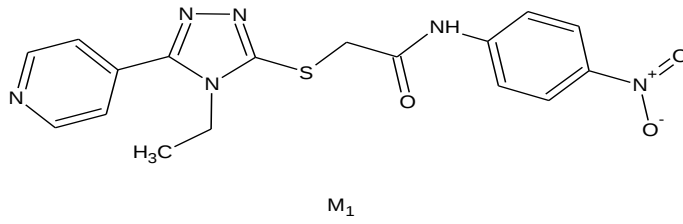
Ayrıca C vitamini askorbat radikali oluşturarak, radikalik tokoferollerin yenilenmesini sağlar [37].



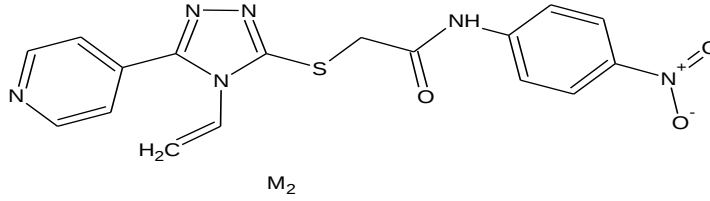
2. MATERYAL ve METOT

2.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler

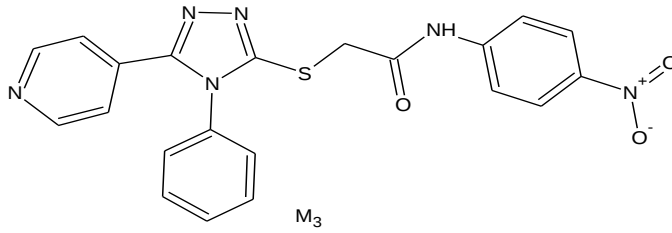
Çalışmanın tamamı Fırat Üniversitesi Kimya bölümü organik, biyokimya ve tıp fakültesi hücre kültür laboratuvarında gerçekleştirilecektir. Çalışmalarda kullanılacak olan bileşiklerin yapısı aşağıda verilmiştir [48].



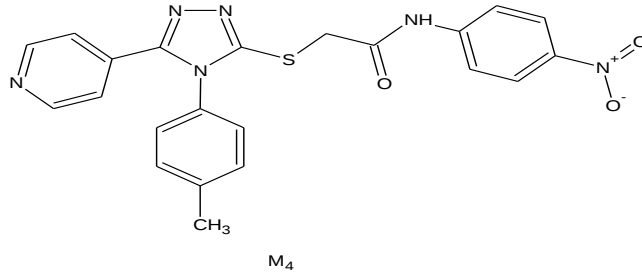
Şekil 2.1. 2-([4-etil-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil)-N-(4-nitrofenil)asetamit'in yapısı (M1)



Şekil 2.2. N-(4-nitrofenil)-2-([4-(prop-2-en-1-il)-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il] sulfanil)-asetamit'in yapısı (M2)



Şekil 2.3. N-(4-nitrofenil)-2-([4-fenil-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil)asetamit'in yapısı (M3)



Şekil 2.4. 2-[[4-(4-metilfenil)-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil}-N-(4-nitrofenil) asetamit 'in yapısı (M4)

2.2. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler

Antitümör aktivitenin belirlenmesi için L 1210 HÜCRE KÜLTÜRÜ (kemirgen lösemi hücresi) ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi için *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri kullanıldı.

Fungi alemine dahil olan *Saccharomyces cerevisiae* tek hücreli bir mikroorganizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* askomisetik bir mayadır. Maya terimi tomurcuklanma ve enine bölünme gibi yöntemlerle aseksüel (eşeysiz) olarak üreyen, bir zigottan veya partenogenetik olarak tek bir somatik hücreden oluşmuş serbest bir askus içerisinde askorporlar üreten, dominant olarak tek hücreli bir tollusa sahiptirler. *Saccharomyces cerevisiae* diğer mayalar gibi karbonhidratları fermente eder. Bira yapımı ve fırıncılıkta kullanılır. Mayaların yüksek vitamin içeriği, besin olarak değerlerini artırır. Bir çok *Saccharomyces cerevisiae* türü diğer vitaminler yanında özellikle B vitaminini sentezlerler [49]. *Saccharomyces cerevisiae* malt extract broth'da aşılınıp etüvde 25 °C'de inkübe edildi ve eksponensiyel fazda 10⁶ hücre/mL alınarak deneysel çalışmalar gerçekleştirildi. Bu hücreler sıklıkla moleküler düzeyde oksidatif strese metabolizmanın cevabı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır [50].

2.3. L 1210 Hücrelerinin Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi

Hücre kültür bankasından (ATCC, ABD) aldığımız donmuş haldeki L1210 kemirgen lösemi hücreleri oda sıcaklığında çözdürülerek 75 mL flask içerisine aktarıldı. Flaskın içerisine daha önceden hazırlanmış olan DC₅ (25 mL) ilave edildi ve flasklar, Nuaire marka bir %5 CO₂ ortamlı inkübatöre (Plymouth, MN, ABD) yerleştirildi. Günlük olarak hücrelerin durumu Soif marka (Soif Optical Inc., Çin) bir invert mikroskop

kullanılarak kontrol edildi ve üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC₅ çekilerek tazeyle 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 ayrılmaları sağlandı. Tüm hücreler flaskın yüzeyinden ayrıldıktan sonra flaskın içerisine 12 mL DC₅ ilave edildi ve dikkatli bir şekilde tritürasyon (süspansiyonun pipet içerisine çekilip boşaltılarak yapılan ayrıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılmaları sağlandı.

Hücreler bir hemositometre kullanılarak sayıldı. Her flaska 1×10^5 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 Laminar Flow (Bolf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi [50, 51].

2.4. Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi

L 1210 lösemi hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı L 1210 hücre deneyleri için 1×10^5 /ml, hücreye ayarlandı. Dozların belirlenmesinde ön denemeler yapıldı ve aşağı yukarı yöntemi kullanıldı [52].

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar 7.5, 15, 30, 60 μ M, 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 rastgele seçilen 100 adet hücre hemositometrede sayıldı. Hücre canlılığı yüzde olarak ifade edildi. Aynı işlem 48 saat sonra tekrar edildi ve deney sonlandırıldı [52].

2.5. *In vitro* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

2.5.1. *Saccharomyces cerevisiae* ile Ölçüm

Maddelerin antioksidan özelliğinin belirlenmesinde, kromatografik yöntemlerden HPLC kullanıldı. Antioksidan vitaminler A, E, C ve MDA ölçümleri için birer deney tüpüne 2'şer ml hücre içeren çözelti konuldu. Maddeler DMSO'da çözülerek belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve son derişimler 26 μ M ve 52 μ M olacak şekilde tüplere ilave edildi. Tüm denemeler için tüplerdeki DMSO miktarı eşit olacak şekilde ilaveler yapıldı. Kontrol grubu olarak eşit hacimde DMSO ilave edilen tüpler kullanıldı. Madde ilavesinden sonra belirli süreler beklendi. İlgili literatürlerle kıyaslanarak [53,54,55] ml deki hücre sayısının 10^6 hücre/mL olmasına ve maddelerin çözünürlüğü de göz önüne alınarak dozlara karar verildi.

2.5.2. C Vitamini ve MDA Analizi

C vitamini ve MDA analizi için kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücrelere %15'lik trikloroasetik asitten 250 μ L ve 0.5 M HClO₄'den 750 μ L ilave edilerek çalkalandı. Hücreler küçük parçalara ayrıldı ve lizat 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi [56].

2.5.3. A ve E Vitamin Analizi

A ve E Vitamini analizi için kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücrelere %15'lik trikloroasetik asitten 250 μ L ve 0.5 M HClO₄'den 750 μ L ilave edilerek çalkalandı. Böylece hücreler parçalandı. Daha sonra % 1'lik H₂SO₄ ihtiva eden etil alkolden 2 ml ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Karışım vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendi, sonra örnekler üzerine 0.3 ml n-hekzan ilave edildi. Hekzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hekzan fazına ekstrakte edilmektedir. Hekzan ilave edildikten sonra tekrar vorteksde karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hekzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine tekrar 0.3 ml n-hekzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hekzan fazı cam tüpteki hekzan

fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hekzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalıntı 100 µl metanolde çözüldü. HPLC'de analiz edildi [57].

2.5.4. DPPH Radikal İndirgeme Metodu ile Ölçüm

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için diğer bir yöntem olan DPPH radikal indirgeme metodu kullanıldı [58]. Metanolde 25 mg/L DPPH olacak şekilde hazırlanan çözeltiden 4 ml alınarak her madde için ayrı ayrı tüplere kondu. Derişimleri 4000µM olarak hazırlanan DMSO'da çözülmüş test maddelerinden her bir grup için son derişimleri 100, 250, 500 ve 1000 µM olacak şekilde ilaveler yapıldı. Reaksiyonun oluşması için bu karışım oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk bekletildi. Renk açılımına bakılarak 517 nm'de spektrofotometrede okutulup okutulmayacağına karar verildi. Renk açılımı olduğundan spektrofotometrede okutma yapıldı

2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler; SPSS/PC paket programı kullanılarak yapılmıştır. Aktiviteler arasındaki istatistiksel farklılıkları ortaya koymak için sonuçlara varyasyon analizi uygulandı Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler, antitümör özellik için One- way Anova analizi, Tukey testi ve MDA, A ve E vitamini analizleri için ise LSD testi yapılarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

Elde edilen bulgular parametrelerin her birinde uygulama boyunca grupların kontrol grubu ile kıyaslarını gösterecek tablolar halinde verildi. Maddelerle muamele edilmiş L 1210 hücrelerine ait canlı hücre sonuçları Tablo3.1 de, yine maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeylerine ait sonuçlar Tablo3.2 de, E ve A vitamini düzeylerine ait sonuçlar Tablo3.3 ve Tablo3.4 de, C vitamini düzeylerine ait sonuçlar Tablo3.5 de DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları Tablo3.6 da verilmiştir.

Tablo 3.1. Maddelerle muamele edilmiş L 1210 hücrelerinin süreye ve doza göre % oranında canlılık durumları

a) 24 saat

Grup n=4	7.5 µM	15 µM	30µM	60µM
K	72,75±0,95	67,75±0,63	69,00±0,41	62,75±0,85
M1	56,50±0,87 ^c	47,25±0,63 ^c	36,50±0,65 ^c	27,50±1,19 ^c
M2	52,50±1,05 ^c	41,50±1,04 ^c	35,25±2,39 ^c	27,50±1,55 ^c
M3	54,50±1,32 ^c	44,75±1,49 ^c	29,25±1,93 ^c	19,25±0,75 ^c
M4	58,25±0,48 ^c	48,25±1,31 ^c	29,00±0,91 ^c	17,25±0,85 ^c

b) 48 Saat

Grup n=4	7.5 µM	15 µM	30 µM	60 µM
K	65,75±0,48	61,50±0,65	60,00±1,63	54,75±1,65
M1	45,00±1,08 ^c	33,75±1,25 ^c	21,50±1,19 ^c	11,75±1,03 ^c
M2	42,75±0,85 ^c	27,75±1,44 ^c	18,25±1,80 ^c	12,75±1,31 ^c
M3	42,25±0,85 ^c	27,00±1,08 ^c	19,00±0,91 ^c	9,00±0,41 ^c
M4	46,00±0,82 ^c	32,75±1,49 ^c	17,75±1,38 ^c	9,50±0,65 ^c

a:p<0.05 b:p<0,01 c:p<0.001

Tablo 3.2. Maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA (mg/1.10⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri

MDA (mg/L)		
n=4	26μM	52μM
Kontrol	0,29 ± 0,029	0,29 ± 0,029
M1	0,30 ± 0,01	0,34 ± 0,02 ^a
M2	0,44 ± 0,03 ^c	0,43 ± 0,04 ^c
M3	0,34 ± 0,02 ^b	0,40 ± 0,01 ^c
M4	0,44 ± 0,04 ^c	0,43 ± 0,03 ^c

a:p<0.05 b:p<0,01 c:p<0.001

Tablo 3.3. Maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin E vitamini (mg/1.10⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri

Vit E (mg/L)		
n=4	26μM	52μM
Kontrol	0,65 ± 0,01	0,65 ± 0,01
M1	0,55 ± 0,09	0,65 ± 0,89
M2	0,44 ± 0,19	0,41 ± 0,002
M3	0,50 ± 0,12	0,29 ± 0,003 ^a
M4	0,42 ± 0,11	0,33 ± 0,045 ^a

a:p<0.05

Tablo 3.4. Maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin A vitamini (mg/1.10⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri

Vit A (mg/L)		
n=4	26μM	52μM
Kontrol	0,55 ± 0,02	0,55 ± 0,02
M1	0,44 ± 0,08	0,46 ± 0,04
M2	0,44 ± 0,001	0,36 ± 0,006 ^b
M3	0,47 ± 0,04	0,44± 0,05
M4	0,42 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,01

a:p<0.05 b:p<0,01

Tablo 3.5. Maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin C vitamini (mg/1.10⁶ hücre) düzeylerinin dozlara göre ortalama değerleri

Vit C (mg/L)		
n=4	26μM	52μM
Kontrol	11,89 ± 0,41	11,89 ± 0,41
M1	11,58 ± 0,32	11,45 ± 0,44
M2	12,60 ± 0,33	11,96 ± 0,34
M3	11,84 ± 0,22	11,99 ± 0,11
M4	12,04 ± 0,25	11,76 ± 0,35

Tablo 3.6. DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları

Örnekler	DPPH' Yok Etme Aktivitesi (%) (1000 µg/mL)
Kontrol	0
M-1	17.68
M-2	17.29
M-3	18.25
M-4	21.04
Tokoferol	87.44

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırılmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi bir çok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [59].

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranlarına zarar verirler ve değişik hastalıklarda etkilerini gösterirler. Organizmadaki 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 [60].

1890-1890'lı yıllarda bağışıklık sistemini etkileyen HIV gibi enfeksiyonlar, kemoterapi ve organ nakli ile ilişkili olarak immün sistemin baskılayıcı ilaçların kullanımındaki artış ve benzeri nedenler, ciddi fungal enfeksiyonların insidansını artırmıştır. Bütün bunların sonucu olarak enfeksiyonların tedavisine yönelik ilaç araştırmalarında artış meydana getirmiştir. Bu araştırmaların çok büyük kısmını ise, özellikle triazol halka sistemi taşıyan azol grubu bileşikler oluşturmaktadır. Günümüzde halen birçok fungal enfeksiyon çeşitli nedenlerden dolayı tedaviye cevap vermediğinden yeni nesil triazol grubu antifungal ilaç araştırmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir [61].

5 üyeli aromatik hetero siklik halka içeren organik bileşikler birçok doğal yapıda bulunmakla birlikte biyokimyasal olayların bir çoğunda önemli bir role sahiptir. Bunun sonucu olarak kimyacılar açısından oldukça önemli ve yeni bir çalışma alanı oluşturmuştur [62].

İndol içeren 1,3,4-tiyadiazol ve 1,2,4-triazol türevleri, fareler üzerinde spesifik testler olarak uygulanmış ve bu testler sonucunda bu maddelerin kan-beyin hücrelerinin gelişmesini sağladığı, depresyonu azalttığı saptanmıştır [63].

Serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyi ve GSH-Px enzim aktivitesinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olur [64,65,66].

Jeon ve arkadaşları 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 [67].

1-(2,4-diklorobenzoil)-4-aril tiyosemikarbazitler ve bunlardan sentezlenen triazol bileşiklerinin önemli derecede *in vitro* antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Tiyosemikarbazitler, triazol bileşiklerine nazaran daha fazla antibakteriyel etki göstermiştir. Ancak 3-(2,4-diklorofenil)-4-amino-1,2,4-triazol-5-tiol bileşiğinde test edilen organizmalara karşı çok yüksek inhibisyon etkisi gözlenmiştir [68].

Swierczynski ve arkadaşları diyetle alınan alfa-tokoferol'un lipid peroksidasyonunu engellediğini ve steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarına ve tümör gelişimine karşı koruduğunu belirtmişlerdir [69].

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

Bu araştırmada, L1210 uygulaması yapılan bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin süre ve doza bağımlı antitümör aktivitesinin ve bazı antioksidan parametrelerin düzeyleri üzerinde olan etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında farklı etkilere sahip oldukları görüldü.

Tablo 3.1.'e bakıldığında çalışmada kullanılan bütün maddelerin L 1210 hücre tipinde etkili bir antitümör aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda 7,5 μ M, 15 μ M, 30 μ M ve 60 μ M'lık konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik değerlerine bakıldığında kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli ölçüde istatistiksel fark gözlemlendiği görülmektedir. İstatiksel farklar göz önüne alındığında çalışmada kullanılan bütün maddelerin antitümör aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Bu araştırmada aynı zamanda hücrelere uygulaması yapılan bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin MDA düzeyleri üzerinde olan etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında farklı etkilere sahip oldukları görülmüştür. Kontrol grubu ile M1, M2, M3 ve M4 bileşiklerinin kıyaslamalarında MDA düzeylerinde istatistiksel farklılıklar gözlemlendi. Tablo 3.2.'ye bakıldığında bileşiklerin MDA düzeylerinin kontrolden yüksek çıktığı görülmektedir. Bu sonuç kullanılmış olan test maddelerinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir.

Tablo 3.3, Tablo 3.4’de görüldüğü üzere maddelerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine ait antioksidan vitaminler A ve E düzeylerinde anlamlı istatistiksel farklılıklar gözlemlendi.

Bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelendi. Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de, ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Birçok antioksidan aynı zamanda anti-radikaldır. Bu antioksidanlar radikallerin eşleşmemiş elektronlarını eşleyerek onları etkisiz hale getirirler. Bileşiklerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını anlamak için, 517 nm’de maksimum absorbans veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH konsantrasyonu azaldıkça absorbans da azalmaktadır. Bu sebeple antioksidan maddeler, 517 nm’de DPPH absorbansında azalmaya sebep olurlar [71]. Tablo 3.6.’da görüldüğü gibi, bu deneyler sonucunda bileşikler radikal temizleme özelliği göstermediğinden antioksidan aktiviteye sahip olmadıkları söylenebilir.

Ayrıca sahip oldukları antitümör aktivite ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde MDA düzeyleri üzerine olan etkilerine bakıldığında, maddelerin hücrelerin canlılık durumuna etkisi ile MDA düzeyleri arasında bir ilişki kurulabilir.

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde tüm verilerin birbirini destekleyecek şekilde olduğu görülmektedir

Bileşiklerin maya hücrelerindeki etkilerinin sonucu olarak, MDA miktarındaki artış ve antioksidan vitamin A ve E düzeylerindeki azalma ile birlikte, DPPH deneyinde radikal temizleme özelliğine sahip olmayışı, maddelerin antitümör aktivitesinin oksidatif hasar oluşturan bir mekanizma ile sitotoksik etki sonucu olabileceği düşüncesine götürebilir.

Sonuç olarak; Bazı 2-(4H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfanil)-asetamit türevlerinin araştırılan özellikleri sayesinde literatür bilgisine katkıda bulunacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- [1]. **Holla, B. S. Poojary, K. A. Kallurya, B. ,** 1996. Synthesis, characterisation and antifungal activity of some N-bridged heterocycles derived from 3-(3-bromo-4-methoxyphenyl)-4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole, *Il Farmaco*, **51**, 793-799.
- [2]. **Pandeya, S. N., Sriram, D.; Nath, G., De Clercq, E.,** 2000. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with triazole, *Arzneim Forsch./Drug Res.*, **50**, 55-59.
- [3]. **İnvidiata, F.P. Grimaudo S., Giammanco, P., Giammanco, L.,** 1991. Synthesis and pharmacological properties of 6-substituted 3-(pyridine -4-yl)-1,2,4-triazole [3,4-b][1,3,4,]thiadiazoles *Il Farmaco*, **46**, 1489- 1495.
- [4]. **Todoulou, O. G. Papadaki-Valiraki A., Valiraki, Filippatos, E. C., Ikeda, S., De Clercq, E.,** 1994. ChemInform Abstract: Synthesis and Anti-Myxovirus Activity of Some Novel N,N'-Disubstituted Thioureas. *Eur. J. Med. Chem.*, **29**, 127-131.
- [5]. **Kidwai, M. Sapra, P. Misra, P., Saxena, R. K., Singh, M.,** 2001. Microwave assisted solid support synthesis of novel 1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazepines as potent antimicrobial agents *Bioorganic and Medicinal Chem.*, **9**, 217-220.
- [6]. **Kritsanida, M., Mouroutsou, A., Marakos, P., Pouli, N., Garoufalias, S. P., Pannecouque, C., Witvrouv, M., De Clercq, E.,** 2002. Synthesis and antiviral activity evaluation of some new 6-substituted 3-(1-adamantyl)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles, *Il Farmaco*, **57**, 253-257.
- [7]. **Jacobson, R.M., Nguyen, L.T., Thirugnanam, M.,** 1990. Preparation of 1-(Dimethylcarbamoyl)-3,5-disubstituted-1H-1,2,4-triazoles as Insecticides, *Eur. Pat. Appl. EP 337,815 (Cl. C07D249/12)*, 18 Oct 1989, *US Appl. 181,872*, 15 Apr 1988. Ref: C.A. 112, 198386c.
- [8]. **Holla, B. S., Kalluraya, B.,** 1988. Synthesis and Antibacterial activity of 7H-6-(5-nitro-2-furyl)-S-triazolo[3,4,b]-[1,3,4]-thiadiazines, *Indian J. of Chem.* **27B**, 683-685.

- [9]. **Palaska, E., Şahin, G., Kelicen, P., Durlu, N.T., Altınok, G.**, 2002. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones, *Il Farmaco*, **57**, 101-107.
- [10]. **Thomas, K.D., Airody Vasudeva Adhikari, N. Suchetha Shetty**, 2010. Design, synthesis and antimicrobial activities of some new quinoline derivatives carrying 1,2,3-triazole moiety, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 3803-3810
- [11]. **Wenya Wang, Shengzheng Wang, Yang Liu, Guoqiang Dong, Yongbing Cao, Zhenyuan Miao, Jianzhong Yao, Wannian Zhang, Chunquan Sheng**, 2010. Novel conformationally restricted triazole derivatives with potent antifungal activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 6020-6026
- [12]. **Alireza Foroumadi, Saeed Emami, Abdolreza Hassanzadeh, Majid Rajaei, Kazem Sokhanvar, Mohammad Hassan Moshafi and Abbas Shafiee**, 2005. Synthesis and antibacterial activity of N-(5-benzylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl) and N-(5-benzylsulfonyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)piperazinyl quinolone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 4488-4492
- [13]. **Xian-Long Wang, Kun Wan, Cheng-He Zhou**, 2010. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 4631-4639
- [14]. **Ashraf M. Abdel-Megeed, Hamdy M. Abdel-Rahman, Gamal-Eldien S. Alkaramany, Mahmoud A. El-Gendy**, 2009. Design, synthesis and molecular modeling study of acylated 1,2,4-triazole-3-acetates with potential anti-inflammatory activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 117-123
- [15]. **Turan-Zitouni, G., Demirayak, Ş., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z. A., Yıldız, M. T.**, 2004. Synthesis of some 2-[(benzazole-2-yl)thioacetyl amino]thiazole derivatives and their antimicrobial activity and toxicity, *European journal of medicinal chemistry*, **39**, 267-272

- [16]. Varvaresou, A., Papastaikoudi, T.S., Tsotinis, A., 1998. Synthesis lipophilicity and biological evaluation of indole-containing derivatives of 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole, *Il Farmaco*, **53**, 320-326
- [17]. Shafiee, A., Sayadi, A., Roozbahani, M.H., 2001. Synthesis and *in vitro* Antimicrobial Evaluation of 5-(1-Methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-4H-1, 2, 4-triazoles, *Arch.Pharm. Pharm.Med.Chem*, **10**, 495-499.
- [18]. Maxwell, J.R., Wasdahl, D.A., Wolfson, A.C., Stenberg, V.I., 1984. Synthesis of 5-Aryl-2H-tetrazoles, 5-Aryl-2H-tetrazole-2-acetic Acids, and [(4-phenyl-5-aryl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio]acetic Acids as Possible Superoxide Scavengers and Antiinflammatory Agents, *J. Med. Chem.*, **27**, 1565-1570.
- [19]. Demirbaş, N., Uğurluoğlu, R. ve Demirbaş, A., 2002. Synthesis of 3-Alkyl(Aryl)-4-alkylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones and 3-Alkyl-4-alkylamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones as Antitumor Agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3717-3723.
- [20]. Adhikari, V.A., Badiger, V.V., 1988. Synthesis & Biological Activities of Isoxazalo [5,4-d] Pyrimidinyl-oxymethyl-thiadiazoles, -oxadiazoles & - triazoles, *Ind. J. Chem.*, **27**, 542-547.
- [21]. Kane, J.M., Staeger, M.A., Dalton, C.R., Miller, F.P., Dudley, M.W., Ogden, A.M.L., Kehne, J.H., Ketteler, H.J., McCloskey, T.C., Senyah, Y., Chmielewski, P.A. ve Miller, J.A., 1994. 5-Aryl-3-(alkylthio)-4H-1,2,4-triazoles as Selective Antagonists of Strychnine-Induced Convulsions and Potential Antispastic Agents, *J. Med. Chem.*, **37**, 125-132.
- [22]. Tozkoparan, B., Gökhan, N., Aktay, G., Yesilada, E., Ertan, M., 2000. 6-Benzylidenethiazolo[3,2-b]1,2,4-triazole-5(6H)-ones Substituted with Ibuprofen: Synthesis, Characterization and Evaluation of Anti-inflammatory Activity, *Eur. J. Med. Chem.*, **35**, 743-750.
- [23]. Shah, M.H., Patki, V.M., Mhasalkar, M.Y., 1962. 1,2,4-Triazole Derivatives as Possible Diuretic Agents, *J. Sci. Ind. Res. (India)*, **21C(3)**, 76-78, 1962. Ref: C.A. 57, 16601g.
- [24]. Ertan, M. ve Ersan, S., 1984. (s)-Triazol-N-Glikozitleri. VIII. Antiviral Etkili Bazı 3,5-Disubstitüe-1,2,4-triazol Türevlerinin Sentezleri ve Biyolojik Etkileri Üzerine Yapılan Çalışmalar, *Ankara Ecz. Fak. Der.*, **14**, 81-93.

- [25]. **Stoian, I., Oros, A., Moldoveanu, E.**, 1996. Apoptosis and Free Radicals, *Biochem. and Mol. Med.*, **59**, 93-97.
- [26]. **Halliwell, B., Gutteridge, JMC.**, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease., *Biochem J.*, **219**, 1-14
- [27]. **Wolf, R., Wolf, D., Ruocco, V.**, 1998. Vitamin E : The Radical Protector, *J. of Eur., Academy of Derm. and Ver.*, **10**, 103-117.
- [28]. **Betteridge, D.J.**, 2000. What is Oxidative Stress?, *Metabolizm*, **49**, 3-8.
- [29]. **Slater TF.**, 1984. Free radical mechanism in tissue injury., *Biochem. J.*, **22**, 1-15.
- [30]. **Mc Cord, JM, Fridovich I.**, 1978. The biology and phathology of oxygen radicals., *Annals. Int. Med.*, **89**, 122-127
- [31]. **Nordberg, J., Arner, E.S.J.**, 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System, *Free Rad. Biol. and Med.*, **31(11)**, 1287-1317
- [32]. **Halliwell, B., Gutteridge, W.M.C.**, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford Medicine Press*, 246-351
- [33]. **Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U.**, 2000. Serbest Radikaller, Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi, **1**, 52-58.
- [34]. **Köse, K., Doğan, P.**, 1992. Lipid Peroksidasyonu, Erciyes Üniv. Tıp Dergisi, Ek 1, 340-350
- [35]. **Repine, J.E.**, 1991. Oxidant - Antioxidant Balance : Some Observation From Studies of Ischemia Reperfusion in Isolated Perfused Rat Hearts, *The Am. J. of Med.*, **91**, 45-53.
- [36]. **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.
- [37]. **Erenel G., Erbaş D., Arıcıoğlu A.**, 1992. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler., *Gazi Tıp Dergisi*, **3**: 243-50.
- [38]. **Sies, H.**, 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidant, *Exp. Physiol.*, **82** ,291-295.
- [39]. **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.

- [40]. Aras, K., Erşen, G., Karahan, S., 1976. Tıbbi Biyokimya, Vitaminler., *A.Ü. Diş Hek. Fak.,Yayınları*, Sayı: 4, Ankara.
- [41]. Stratton S.P., Liebler D.C., 1997. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effects of beta-carotene and alpha-tocopherol., *Biochemistry*, **36(42)**, 1291-20.
- [42]. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS., Lippincott Williams & Wilkins., 1996. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach., Baltimore, Maryland.
- [43]. Harri, E.D., 1992. Regulation Of Antioxidant Enzymes, *Faseb Jour*, **6**, 2675.
- [44]. Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Mimoza Yayınları*, Konya.
- [45]. Thomas, M.J., 1995. The Role of Free Radicals and Antioxidants., *Critical Reviews in Food and Science Nutrition.*, **35(1-2)**, 21-39.
- [46]. Niki, E., 1991. Vitamin C as an Antioxidant., *World Rev.Nutr.Diet.*, **64**:3- 30
- [47]. Levine, M., 1997. New Concepts in Biology and Biochemistry of Ascorbic Acid., *New Engl. J. Med.*, **314**, 892-901.
- [48]. Dinçer, M. , Özdemir, N. , Çetin, A. , Keser, T. ve Büyükgüngör, O., 2006. N-Cyclohexyl-2-[5-(4-pyridyl)-4-(p-tolyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl] acetamide dihydrate, *Acta Cryst.* **C62**, 639-642.
- [49]. Biçici, M., 1990. Mikrobiyoloji, *Çukurova Ü. Ziraat Fak.*, Adana
- [50]. Offeing, B.M., Martelli, S., 1997. Steochemistry and Antitumour Activity of Platinum Metal Complexes of 2- Acetypyridine Thiosemicarbazones, *Transition Metal Chemistry.*, **22**, 263-269.
- [51]. Ferrari, B.M., Capacchi, S., Pelosi, G., Reffo, G., Tarasconi, P., Albertini, R., Pinelli, S., Lungni, P., 1999. Synthesis, Structural Characterization and Biological
- [52]. Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yashimura, Y., Kawada, J., Kubota, S., 1990. Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4- Triazole-3 -Thiones and Thiosemicarbazones on Iodide Uptake by The Mouse Thyroid , The Relationship Between Their Structure and Antithyroid Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **38(9)**, 2595-2596

- [53]. **Esefsi S. A., et. all.**, 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone, *Toxicology in Vitro* **18**, 467–474.
- [54]. **Shu-Lan Yeh and Miao-Lin Hu**, 2000. Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with b-carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells, *J. Nutr. Biochem.* **11**, 548 –554.
- [55]. **Buss J.L., et. all.**, 2004. Oxidative stress mediates of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs. *Arc. Of Biochem. And Biophy.*, **421**, 1-9.
- [56]. **Karatepe, M.**, 2004. “Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC/UV.” *LC-GC North America.* **22**, 362-5 .
- [57]. **Catignani, G.L.**, 1983. Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plazma by Liquid Chromatography, *Clin. Chem.*, **2914**, 708-712.
- [58]. **Liyana-Pathirana, C., & Shahidi,F.**, 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, **93**, 47-56.
- [59]. **Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R.**, 2001. Oxidative Stress antioxidants in Epilepsy, *Clinica Chimica Acta.*, **303**,19-24.
- [60]. **Matez, J.M., Gomez, P.C., Casto, N.I.**, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry.*, **32**;595-603.
- [61]. **Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. ve Sibley, C.M.**, 1999. Current and Emerging azole Antifungal Agents., *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 40-79.
- [62]. **Dalvie, D.K., Kalgutkar, A.S., Khojasteh-Bakht, C.S., Scott Obach,R., O'Donnell, P.O.**, 2002. Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings., *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 269-299.
- [63]. **Pandeya, S. N., Sriram, D., Nath, G., Declercq, E.**, 1999. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide, *European Journal of pharmaceutical Sciences*, **9**, 25-31
- [64]. **Diplock, A.T.**, 1991. Antioxidant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *Am. J. Chim Nutr.*, **53**, 1895-1935.
- [65]. **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.

- [66]. 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.
- [67]. 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.
- [68]. Goswami, B. N., Katakya, J. C. S., Baruah, J. N., 1984. Synthesis and antibacterial activity of 1-(2,4-dichlorobenzoyl)-4-substituted thiosemicarbazides, 1,2,4-triazoles and their methyl derivatives, *J. Heterocyclic Chem.*, **21**, 1225.
- [69]. Swierczynski J, Kochan Z, Mayer D, 1997. Dietary α -tocopherol prevents dehydroepiandrosterone-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria., *Toxicol. Lett.*, **91**, 129-136.
- [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]. Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C., and Almeida, L.M., 1994. Action Of Phenolic Derivates As Inhibitors Of Mebrane Lipid Peroxidation And As Peroxyl Radical Scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315, 161.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladım. 2006 yılında başladığım İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2010 yılında bitirdim. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Tezli Yüksek Lisans öğrenimine başladım ve halen bu öğrenimime devam etmekteyim.