

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

**FARKLI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN BAZI BİYOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

İRFAN TİMÜR

**KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**

BİNGÖL-2018

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

**FARKLI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN BAZI BİYOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

İRFAN TİMÜR

**KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**

BİNGÖL-2018

Onay sayfası

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren değerli hocam Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim. Tez çalışmasına desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne, (Proje No: BAP-718-295-2015), teşekkür ederim.

Tez izleme sınavlarım esnasında yaptıkları yönlendirmeler ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa KARATEPE ve Prof. Dr. Metin KOPARIR, Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Durna DAŞTAN, Dr. Öğr. Naci Ömer ALAYUNT, Öğr. Gör. Dr. Akif E. PARLAK deneysel çalışmalar esnasında yardımlarını gördüğüm doktora öğrencisi Hafize TELÇEKEN' ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen anne ve babama özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

İrfan TİMÜR

Bingöl 2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Triazollerin Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	3
2.2. Azol Grubu Bileşiklerin Etki Mekanizması.....	7
2.3. Mannich Bazları.....	8
2.4. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	11
2.4.1. Oksidatif Stres.....	11
2.4.2. Serbest Radikaller.....	12
2.4.3. Reaktif Oksijen Türleri.....	14
2.5. Serbest Radikallerin Etkileri.....	15
2.5.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA).....	16
2.6. Antioksidanlar.....	17
2.6.1. A Vitamininin Antioksidan Etkisi.....	18
2.6.2. <i>α</i> -Tokoferol.....	19
2.7. Kanser.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Bileşikler.....	23

3.2. <i>İn vitro</i> Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi.....	25
3.2.1. <i>İn vitro</i> Yöntemlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	25
3.2.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	26
3.3. <i>İn vitro</i> Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri.....	26
3.3.1. İndirgeme Kuvveti Tayini.....	26
3.3.2. Metal Şelatlama Aktivitesi.....	27
3.4. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	28
3.4.1. Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.4.2. Hücre Kültürleri.....	28
3.4.3. Hücre Kültürlerine Triazol Bileşiklerinin Uygulanması.....	28
3.4.4. MTT Assay.....	29
3.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	29
3.5.1. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi	29
3.6. Test Bileşiklerinin <i>saccharomyces cerevisiae</i> Hücrelerindeki MDA Düzeylerine Etkisi.....	30
3.7. <i>In vivo</i> Antioksidan ve Antitümör Aktivite Çalışmaları.....	31
3.7.1. <i>In Vivo</i> Antitümör Aktivitesi ve Histopatolojik Uygulamalar.....	32
3.7.1.1. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar.....	32
3.7.1.2. <i>İn Vivo</i> Histopatolojik İnceleme.....	33
3.7.1.3. Doku Örneklerindeki Vitamin MDA Analizi.....	34
3.7.1.4. Doku Örneklerindeki Vitamin A ve Vitamin E Analizi.....	34
3.7.1.5. Kan Örneklerindeki Vitamin MDA Analizi.....	34
3.7.1.6. Kan Örneklerindeki Vitamin A ve Vitamin E Analizi.....	35
3.8. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. <i>İn Vitro</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	36
4.1.1. İndirgeme Kuvveti Tayini Bulguları.....	36
4.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini Bulguları.....	37
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	38
4.3. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Örneklerindeki MDA Düzeyleri.....	39
4.4. <i>İn Vivo</i> Antioksidan Aktivite Ölçümleri.....	40

4.4.1. Karaciğer Dokusundaki A Vitamini, E Vitamini ve MDA Düzeyleri.....	40
4.4.2. Serum Örneklerindeki A Vitamini, E Vitamini ve MDA Düzeyleri.....	42
4.5. <i>In Vitro</i> Antitümör Özelliklerin Araştırılması.....	43
4.6. <i>In Vivo</i> Antitümoral Aktivite ve Histopatolojik Bulgular.....	46
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ.....	59
7. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A ₀	: Kontrol absorbansı
A ₁	: Numune absorbansı
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
CD	: Konjuge dienler
ROT	: Reaktif oksijen türleri
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
TBA	: Tiyo barbitürikasit
TCA	: Triklor asetikasit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksi ribonükleik Asit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
HClO ₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
NOS	: Nitrik oksit sentaz
SOD	: Süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Triazol halkası gösterimi.....	4
Şekil 2.2.	Kanser tedavisinde kullanılan triazol türevi bileşikler.....	6
Şekil 2.3.	P-450 enziminin şematik gösterimi	7
Şekil 2.4.	P-450 enziminin etki mekanizması.....	8
Şekil 2.5	Mannich reaksiyonu ve mannich bazı.....	9
Şekil 2.6.	Mannich bazı ve mannich bazı türevlerinin ilaç kimyasındaki uygulamaları	10
Şekil 2.7.	Mannich bazları kullanım alanları	11
Şekil.2.8.	Oksidatif stresin hücre yapısına etkisi (Ekchariyawat et al. 2013).....	12
Şekil 2.9.	Antioksidan gruplar ve görevleri (Fridovivh 1975).....	18
Şekil 3.1.	Triazol bileşiklerinin moleküler yapısı	24
Şekil 4.1.	Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı indirgeme kuvveti grafikleri.....	37
Şekil 4.2.	Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri.....	38
Şekil 4.3.	Triazol bileşikleriyle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA düzeyleri grafiği.....	39
Şekil 4.4.	Bileşiklerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin Vitamin E değerleri.	40
Şekil 4.5.	Bileşiklerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin Vitamin A düzeyleri.	40
Şekil 4.6.	Karaciğer dokusundaki Vitamin A, E ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.....	41
Şekil 4.7.	Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E Vitaminleri ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri.	42

Şekil 4.8.	Triazol bileşikleri ile muamele sonrası HT 29 (insan kolon kanseri) hücrelerinin doza göre % oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri.....	45
Şekil 4.9.	Distal Kolon mukozasındaki kitlenin makroskobik görünümü.	46
Şekil 4.10.	Kontrol grubu ratlarında kolon histolojisinin görünümü, HE x 50.....	47
Şekil 4.11.	M8 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kolon epitelinde hafif şiddette displazinin görünümü, HE x 50.....	47
Şekil 4.12.	M9 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kript epitelinde hafif displazi (ok başları), HE x 50.	48
Şekil 4.13.	Cis 15 bileşiği uygulanan rat grubunda kolon mukozasında şiddetli displazi, HE x 100.....	48
Şekil 4.14.	Yağ+DMSO uygulanan grupta; submukozal bölgeye invazyon gösteren adenokarsinom, HE x 20.	49
Şekil 4.15.	Yağ+DMSO grubunda submukozal yerleşim gösteren, taşlı yüzük formunda (ok başı) müsinöz adenokarsinoma, HE x 100.....	49
Şekil 4.16.	M10 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kolon mukozasında hafif displazi, bez epiteli çekirdeğinde büyüme ve hiperkromazi (ok başları) HE x 50.	50
Şekil 4.17.	Yağ + DMSO grubunda diferansiye adenokarsinom; hiperkromatik çekirdeğe sahip atipik epitel ile dökeli glandüler yapıların görünümü, HE x 50.	50

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Mannich reaksiyonunda kullanılan diğer sekonder ve primer aminler	10
Tablo 2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	14
Tablo 3.1 Triazol bileşiklerin kodları ve IUPAC adlandırılması.	23
Tablo 3.2. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi tablosu	31
Tablo 4.1 Test bileşikleri ve standart antioksidanın indirgeme kuvveti sonuçları Tablosu.....	36
Tablo 4.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanın metal şelatlama yüzdeleri.	37
Tablo 4.3. Test bileşiklerin antifungal ve antimikrobiyal aktivite sonuçları tablosu ...	38
Tablo 4.4. Bileşiklerle muamele edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücrelerinin MDA, Vitamin A ve Vitamin E değerleri.....	39
Tablo 4.5. Bileşiklerle muamele sonrası rat karaciğer dokularında A Vitamini, E Vitamini ve MDA düzeyleri.	41
Tablo 4.6. Bileşiklerle muamele sonrası rat serum örneklerindeki A, E Vitamini ve MDA düzeyleri.....	42
Tablo 4.7. Test maddeleri ile HT 29 (insan kolon kanseri) hücreleri doza göre etkileşimi ve yüzde oranında canlılık durumları.	43
Tablo 4.8. Deneme gruplarında makroskopik ve mikroskopik lezyonların dağılımı....	46

FARKLI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN BAZI BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

İlaç sektöründe kullanılan bileşiklerin yapısı, özellikle Triazol gibi beş üyeli heterosiklik halka yapılarını ihtiva etmektedir. Birçok farklı uygulama alanı olan Triazol bileşiklerinin sentezi ve biyolojik aktiviteleri sürekli olarak çalışılmaktadır.

Bu çalışmada; triazol bileşiklerinin bazı biyolojik aktiviteleri araştırılarak, ilaç olabilme potansiyellerinin ortaya konulması planlandı. Bu amaçla farklı triazol türevlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri; indirgeme-yükseltgeme potansiyelleri ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde malondialdehit (MDA) miktarı üzerine etkisinin analizi gibi biyokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Ayrıca söz konusu triazol türevleri, *in vitro* koşullarda HT 29 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hattı gibi kanser hücreleri üzerinde denenerek antitümör özellikleri araştırıldı. Daha sonra sıçanlarda kolon kanseri modeli oluşturularak sentezlenen maddelerin *in vivo* antitümoral potansiyelleri araştırıldı. Hayvan deneyleri sonunda sıçanlardan alınan karaciğer ve kan numunelerinde bu bileşiklerin antioksidan Vitamin A, E ve MDA düzeylerine olan etkileri *in vivo* antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amacı ile çalışıldı. Deneysel çalışmalar sonucunda kullanılan bileşiklerin *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki MDA düzeylerini etkilediği görüldü. M-9 kodlu triazol bileşiğimiz kontrole göre anlamlı şekilde MDA düzeyinde azalma oluştururken, Vitamin E, A düzeyinde herhangi bir etki göstermemiştir.

Serum ve karaciğer dokusunda ise bileşik gruplarında Vitamin A, E düzeyleri azalırken, MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda, HT 29 hücreleri canlılığı üzerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde, kanserli hücrelerin çoğalmasını önlediği belirlendi.

Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan *Enterococcus faecalis* bakterisi ve bir fungal suş *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları belirlendi. *In vivo* deneysel çalışmalarda cis-platin grubu ile kıyaslamalarda, M-8, M-9, M-10 kodlu bileşiklerin, deneklerin kolonlarında ki tümör oluşumunu azalttığı görülmüştür. Bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Triazol, mannich bazları, antitumor aktivite, antioksidan, radikal temizleme, biyolojik aktiviteler, HT 29.

INVESTIGATION ON SOME BIOLOGICAL EFFECTS OF DIFFERENT TRIAZOLE COMPOUNDS

ABSTRACT

The structure of the compounds used in the pharmaceutical industry includes five membered heterocyclic ring structures, in particularly Triazole. Synthesis and biological activities of triazole compounds, which have many different application fields, are studied continuously.

In this study; some biological activities of triazole compounds have been investigated and the potential for use as a drug has been planned. For this purpose, *in vitro* antioxidant activities of different triazole derivatives have been researched by the biochemical methods such as reduction-oxidation potentials, the analysis of the effect on the amount of malondialdehyde (MDA) in *Saccharomyces cerevisiae* cells. In addition, the triazole derivatives have been tested on cancer cells such as HT 29 (human colon adenocarcinoma) cell line *in vitro* conditions and their antitumor properties have been investigated. Later, the colon cancer model have been established in rats to investigate *in vivo* antitumoral potentials of the synthesized substances. At the end of animal experiments, the effects of these compounds on antioxidant Vitamin A, E and MDA levels in liver and blood samples taken from rats have been studied with the aim of determining the *in vivo* antioxidant properties.

As a result of the experimental studies, it was observed that the compounds used affected MDA levels in *Saccharomyces cerevisiae* cells. While the M-9 coded triazole compound significantly reduced MDA levels compared to the control level, there was no effect on Vitamin E and A levels. Vitamin A and E levels decreased in the compound groups for serum and kidney tissue while MDA levels increased for the same tissues. *In vitro* studies showed that HT 29 cells inhibit the proliferation of cancerous cells, statistically significant as compared to the control group on viability. It was determined that *Enterococcus faecalis* bacteria used in the antimicrobial activity experiments and a fungal *Candida albicans* microorganisms had no significant effect on them.

Compared with the cis-platinum group in *in vivo* experimental studies, compounds with the codes M-8, M-9, M-10 showed reduced tumour formation in the columns of tested subjects. Compounds can be said to have various biological activities *in vitro* and *in vivo* conditions.

Keywords: Triazole, mannich bases, antitumor activity, antioxidant, radical cleansing, biological activities, HT 29.

1. GİRİŞ

Biyolojik aktif etkiye sahip olan bileşiklerin son yıllarda sayısında kayda değer derecede artışlar olmuştur. Biyolojik potansiyeli olan mannich bazları, günümüzde özellikle tıp alanında uygulama imkanı bulmuştur. Anti-enfalamatuar, antitüberküler, antikanser, antimalaryal ve analjezik ilaçların yapısında olduğu bilinmektedir.

Yapılan bilimsel çalışmalarda, yoğun biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı azot içeren heterosiklik moleküller üzerine çalışmalar da gittikçe artmakta olup, biyolojik karakterleri nedeniyle Triazol bileşiklerinin üzerine kayda değer pek çok araştırma grubu tarafından yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte bu tür bileşiklerin büyük bir kısmının kullanımı, toksisite riski, uygulama zorluğu, yüksek oranda ilaç direncinin ortaya çıkması gibi sebeplerle ve istenmeyen yan etkilerin gözlenmesi, aktivitesindeki yetersizlik ve farmakokinetik eksiklikleri nedenleriyle sınırlı kalmıştır. Günümüzde ilaç olarak kullanılan çoğu bileşiğin ana yapısında özellikle triazol, tiyadiazol ve oksadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka yapısı bulunmaktadır. Halkadaki heteroatomların dizilimine göre bu halkaların çeşitli izomerleri mevcuttur. Fakat bu izomerler içerisinde biyolojik olarak en aktif olanlar 1,3,4-tiyadiazol, 1,3,4-oksadiazol ve 1,2,4-triazol türevleridir. Beş üyeli heterosiklik bileşikler; ilaç sanayinde, boya sanayinde, tarım kimyasallarının üretiminde, fotoğraf malzemelerinin elde edilmesinde ve korozyon önleyici materyallerde kullanılmakla birlikte, kullanım alanlarının en önemli olanlarından biri şüphesiz kemoterapi alanı olmuştur (Tozkoparan vd. 2000; Turan and Zitouni 2001; Cottineau et al. 2002; Demirbas vd. 2002; Preben et al. 2003; Vani et al. 2004; Demirbaş vd. 2004; Bantwal et al. 2005; Mathew et al. 2006; Shiradkar et al. 2007; Sztanke et al. 2008; Chavez et al. 2009; Khan et al. 2010; Bakunov et al. 2010; Tarik vd. 2010; Christophe et al. 2011; Sahin vd. 2012; Santhosh et al. 2012; Bai et al. 2012; Rahul et al. 2017). Beş üyeli halka içeren bu bileşiklerin sağlık sektöründe, farmasötik kimyada, başta antikanser aktivite olmak üzere antifungal, anti-HIV, antitümör, antibakteriyal, antiviral, antidepresan, iltihap önleyici (antiinflamatuvar), tüberküloza karşı etkili (antitüberküloz),

ağrı kesici (analjezik), idrar söktürücü (diüretik) gibi çok kapsamlı aktif biyolojik spektrumları bulunmaktadır.

Yaptığımız tez çalışmamızda farklı triazol bileşiklerinin bazı biyolojik aktiviteleri araştırılarak triazoller konusunda yapılmış çalışmalara katkı sağlanması ve ilaç olabilme potansiyellerinin ortaya konulması planlanmıştır. Bu amaçla farklı triazol türevlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri, indirgeme-yükseltgeme potansiyelleri ile ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde malondialdehit (MDA) miktarı üzerine etkisinin analizi gibi biyokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır. Ayrıca söz konusu triazol türevleri, *in vitro* koşullarda HT 29 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hattı gibi kanser hücreleri üzerinde denenerek antitümör özellikleri araştırılmıştır. Daha sonra sıçanlarda kolon kanseri modeli oluşturularak sentezlenen maddelerin *in vivo* antitümoral potansiyelleri, kanser oluşuktan sonra hastalığı iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Diğer taraftan hayvan deneyleri sonunda sıçanlardan alınan karaciğer ve kan numunelerinde bu bileşiklerin antioksidan Vitamin A, Vitamin E ve MDA düzeylerine olan etkileri *in vivo* antioksidan özelliklerinin belirlenmesi bakımından çalışılmıştır. Literatürler incelendiği zaman, son on yıl içerisinde biyolojik aktivitesi olan bis-1,2,4-triazoller ile ilgili biyolojik-biyokimyasal aktivite değerlendirmelerine yönelik çalışmaların ve yeni organik sentezlemelere yönelik çalışmaların nadir olduğu görülmüştür. Bundan dolayı bu türevleri içeren bileşikler ile yaptığımız tez çalışmasının özgün olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışma kapsamında kullandığımız test bileşiklerinin, gösterdikleri biyolojik aktivite özellikleri bakımından daha sonraki yapılacak çalışmalarda yol gösterici olacağını, başta ilaç sektörü olmak üzere yeni biyoyararlı malzemelerin üretimi konularında katkı sağlayacağına inanmaktayız. Ayrıca bu konunun literatüre kazandırılması ile de bu disiplinde çalışan bilim insanlarına yeni fikirler vereceğini düşünmekteyiz.

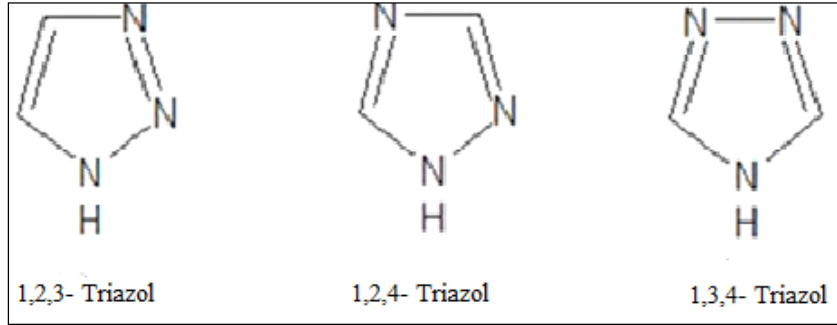
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Triazollerin Özellikleri ve Kullanım Alanları

1960'lı yıllarda tamamen sentetik bazlı ajanlar olan azoller keşfedilmiştir. En sade gösterimi beş üyeli azol halkasında 2 ya da 3 azot ihtiva etmesine göre triazoller ve imidazoller olarak ikiye ayrılır (Maccarrone et al. 2004; Kharb et al. 2011). Kapalı formülü $C_3H_4N_2$ olan imidazol organik bir bileşiktir. Aromatik bir diazol olarak nitelendirilen imidazoller sahip oldukları halka sisteminde 2 adet azot atomuna sahip olması sebebiyle biyolojik bloklamada görevlidirler. Buna ilave olarak, bu bileşikler birçok ilaç içeren, nitroimidazol ve antifungal etkili moleküller olarak zayıf asidik ve bazik etki gösterebilirler (Kelly 1998; Sable et al. 2008; Vandeputte et al. 2012; Sirassu et al. 2014; Xiang et al. 2016). Mikonazol, klotrimazol, ketokonazol gibi ilaçların türevi imidazol ilaçlara örnek verilebilir. Azol grubu içeren bileşikler plazma membranının ana sterol bileşiği olan ergosterol biyosentezini durdurmada etkili olurlar. Bu yüzden triazoller ergosterol sentezini engelleyen bileşiklerdir. Yapılan birçok bilimsel çalışma sonucunda, azolün etki mekanizmasının benzer olduğu görülmüştür. Fakat triazollerin daha az metabolize olmaları sebebiyle ve imidazollerin özellikle insan sterol sentezine daha yavaş etki etmeleri sebebiyle azol bileşikler içerisinde daha fazla tercih edildikleri görülmektedir (Georgopapadakou 1998). İtrakonazol, loreclezole, vorikonazol, letrozole, vorozole, flukonazol, anastrozole gibi bileşikler triazol türevleri ilaçlara örnek verilebilir.

Triazoller 1880'li yıllarda (Bladin and J.A Ber 1885; Andreocci and A. Ber 1889) literatür dünyasına kazandırılmış ve günümüze kadar triazollerle ilgili deneysel çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmiştir. Başta tautomerik özellikleri olmak üzere, triazol bileşiklerin farklı konumlarına sübstitüentlerin yerleştirilmesine uygun kimyasal reaktiflikleri nedeniyle oldukça üretken bir alanı oluşturmaktadırlar. Üç azot atomu içeren

beş üyeli halkalı bir bileşik triazol veya “triazasiklopentadien” olarak adlandırılır. Halkadaki hetero atomların bulundukları konumlara göre 1,3,4- (simetrik, sim-triazol) 1,2,4- (asimetrik, asim-triazol) ve 1,2,3- (visinal triazol) şeklin de üç triazol izomer halkası bulunur (Shawmi 1980) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Triazol halkası gösterimi (Shawmi 1980)

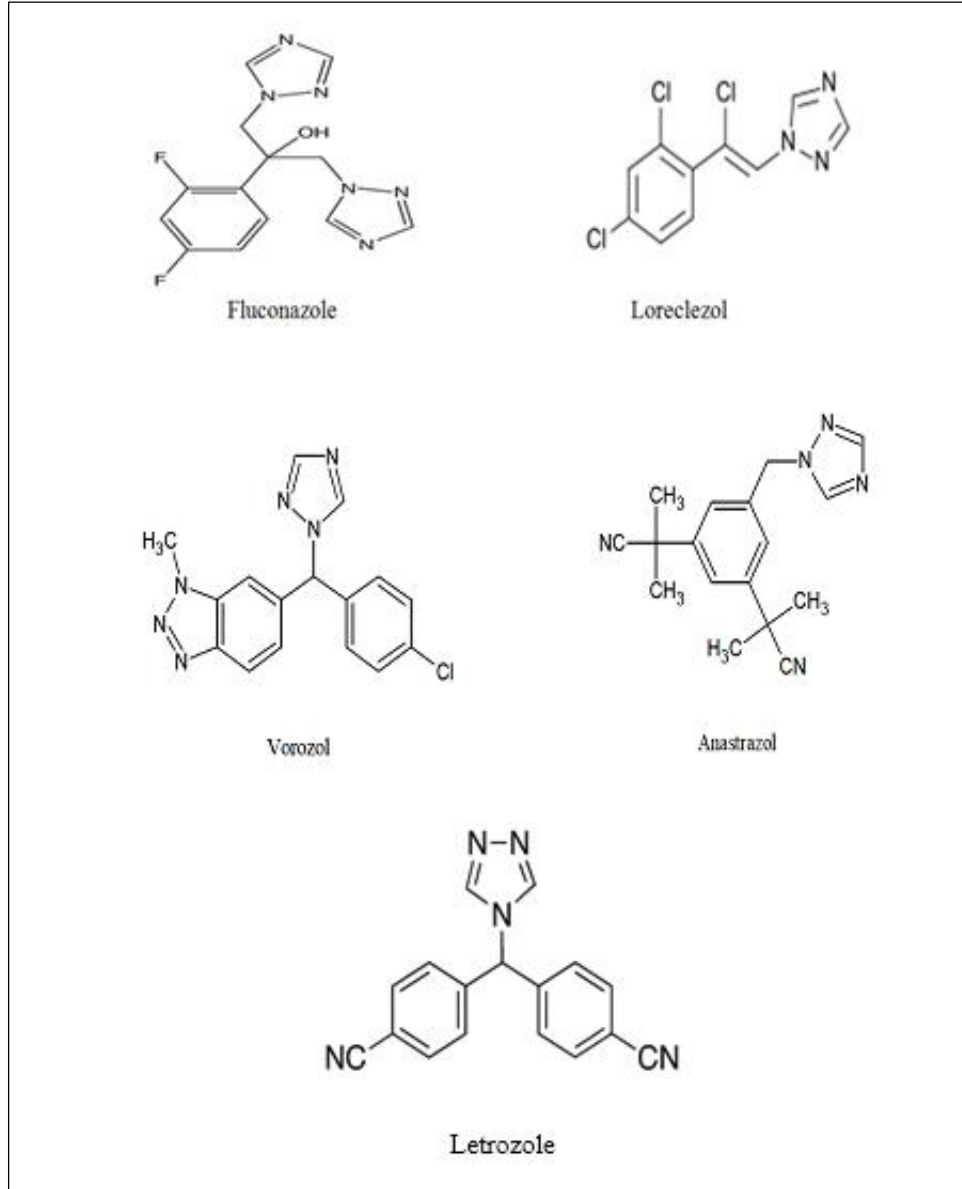
Doğada yaygın bir şekilde bulunan halka sistemi olan heterosiklik halka yapısına sahip moleküller olmasına rağmen, henüz sentetik olmayan bir triazol halka içeren molekül keşfedilememiştir. 1,2,4-triazol olarak isimlendirilen bileşik çekirdeğinin kararlılığı aromatik doğasının bir özelliğidir. $C_2H_3N_3$ Kapalı formülü ile gösterilen, e.n. 120 °C, mol kütlesi 69,1 g olan, benzotriazol, 1,2,4-triazol ve 1,2,3-triazol izomerleri olan, sade renksiz, iğne kristaller yapısında bulunan bileşiklerdir. (Kelly 1998; Shaker 2006; Bhat et al. 2009; Kharb et al. 2011; Sumangala et al. 2012; Puthiyapurayil et al. 2012; Vandeputte et al. 2012; Deohate, 2013; Sathish Kumar et al. 2013; İşbir vd. 2013; Khan et al. 2014; Küçükgül ve Süzgün 2015; Xiang et al. 2016).

Triazol türevlerinin günümüzde yaygın bir şekilde antitüberküloz (Joshi et al. 2004), anti-enflamatuvar (Amir et al. 2004), antimalarial (Lopes et al. 2004), antineoplastik, antikonvülzan, antikanser (Holla et al. 2003; Sztanke et al. 2008) ve analjezik (Seriabine et al. 1968; Karthikeyan et al. 2006; Amir et al. 2008) olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar da kolon kanseri üzerine bazı aminometil türevlerinin *in vitro* şartlarda aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Conde et al. 1974; Filler et al. 1982; Amir et al. 2008; Sztanke et al. 2008). Bununla birlikte piperazin halkası ihtiva eden 1,2,4-triazol aminometil türevleri antibakteriyel ve protozokidal aktivite gösterirler. Çok iyi kardiyovasküler aktivite gösteren prazosin, lidoflazine (Schoentensack et al. 1977) ve urapidil gibi modern ilaçların piperazin ihtiva ettikleri bilinmektedir. Genel olarak organ

nakli, AIDS, kemoterapi ve tüberküloz tedavileri sırasında savunma yetmezliği ve mantar enfeksiyonlarının meydana geldiği ve bu vakaların ölüm ile sonuçlandığı bilinmektedir. Son yıllarda 1,2,4-triazoller (intrakonazol, vorikonazol ve flukonazol) en fazla kullanılan antifungal ilaçlar olup, en çabuk bir şekilde yayılan filamentöz ve levür mantarlarına karşı kapsamlı spektrumlu aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Fakat bu bileşiklerin devamlı kullanımlarda, ilaç direncinin ve yüksek toksisite riskinin meydana gelmesi nedeniyle antifungal etkinlikleri daha dar kapsamlı kalmıştır (Gul 2004). Bundan dolayı, intrakonazol, vorikonazol ve flukonazol gibi triazol türevlerinin dışında düşük toksisiteye sahip ve geniş spektrumlu etki gösteren yeni özgün triazol kökenli antifungal ilaçların sentezlenmesine yönelik acil bir gereksinim olduğu bilinmektedir. Yine son zamanlarda pek çok araştırma grubu tarafından yapılan farklı substituentler bulunduran triazol bileşiklerinin bilimsel çalışmalarla literatüre kazandırılmasına ilişkin çalışmalar devam etmektedir (Almajan 2010).

Triazollerle birlikte oksadiazoller de heterosiklik beş üyeli halka yapısı bulunduran bileşiklerdir. Oksadiazollerin de biyolojik aktivite göstermeleri sebebiyle devamlı geliştirilerek yeni türevleri sentezlenmekte ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. Triazol halkaları içeren bazı bileşiklerin, ilaç etken maddesi şeklinde kullanıldığı bilinmektedir (Şekil 2.2). Son yıllarda anastrozol, letrozol, vorozol gibi triazol halkası etken maddesi ihtiva eden ilaçlar meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Demirbaş 2004).

Bileşiklerdeki 1,2,4- triazol bölgeleri, aromatik substitüentlerin üzerindeki triazol aktif bölgesi aromataz ve hem demir ile kuvvetli etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Yine kuvvetli bir azol olan N nükleosid ribavirin hem antifungal madde hem de güçlü bir anti-viral olarak bilinmektedir.



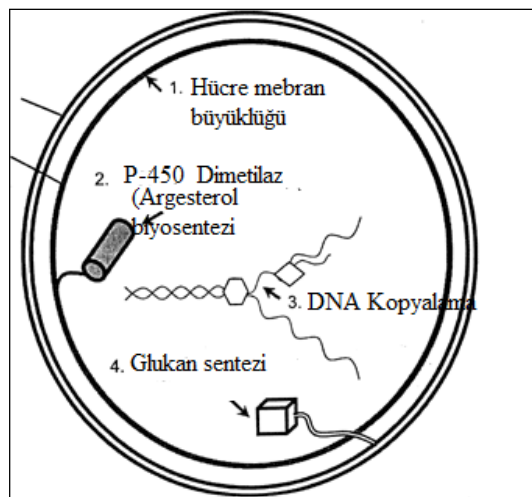
Şekil 2.2. Kanser tedavisinde kullanılan triazol türevi bileşikler (Demirbaş 2004)

Diğer taraftan sağlık sektörü dışında, özellikle aminometil türevli olan triazoller, yüzey aktif reaktifler ve boya olarak polimer sektöründe ciddi uygulama alanı bulmuştur. Ayrıca triazol türevli bileşiklerin anti-fungusitik etkili olduğu ve pestisit ve bakterisitlere karşı koruyucu etkisinin olduğu da kanıtlanmıştır (Lopes et al. 2004; Hollo et al. 2003).

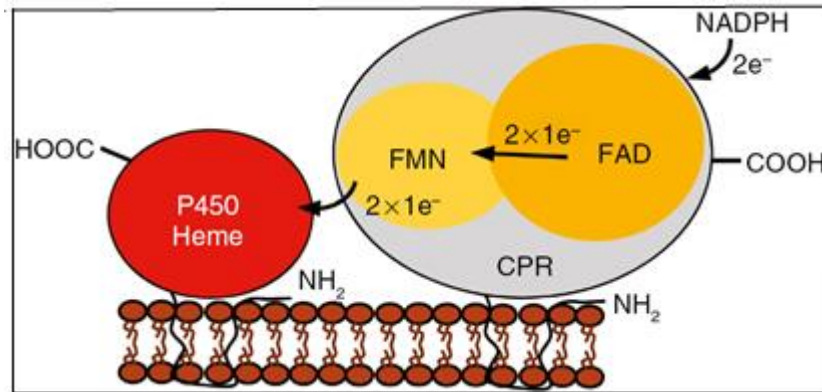
2.2. Azol Grubu Bileşiklerin Etki Mekanizması

Azol grubu içeren bileşikler, plazma membranının ana sterol bileşiği olan ergosterol biyosentezini durdurmada etkili olurlar. Ergosterolün sentezinde inhibisyon iki ara basamak ürünü olan 14 alfa-metil sterollerin oluşumu şeklinde meydana gelir (Şekil 2.3). Ergosterol dönüşümünün oluşabilmesi için burada 14 alfa-metil sterollerin ihtiyaç olan demetilasyon kademesi sitokrom p-450'nin aktivasyonuna bağlıdır. Moleküler seviyede bulunan azol bileşiklerin yapısındaki azot atomlarının bir tanesi (imidazollerde N-3, triazollerde N-4) sitokrom p-450'nin HEM molekülündeki demiri bağlar (Şekil 2.4). Bunun akabinde sitokrom aktivasyonu ve enzim fonksiyonu inhibe olarak demetilasyon basamağı oluşturmaz (Vanden et al.1983; Vanden and Bossche 1985; Vanden et al. 1986).

Yüksek konsantrasyonlar da imidazol bileşiklerinin, bir kısım sterol sentezinin inhibisyonu ile ifade edilemeyen çabuk bir fungusidal aktivite gösterirler. Oluşan bu etki hücre membran fosfolipidlerine ilacın primer etkisiyle meydana gelen membran hasarı şeklinde kendini gösterir. Buna ek olarak bu bileşikler peroksidatif enzimlerini ve sitokrom-C oksidatif inhibe ederek peroksit üretimini hücre içinde arttırabilirler (Nollin et al. 1977).



Şekil 2.3. P-450 enziminin şematik gösterimi (Vanden et. Al 1985)

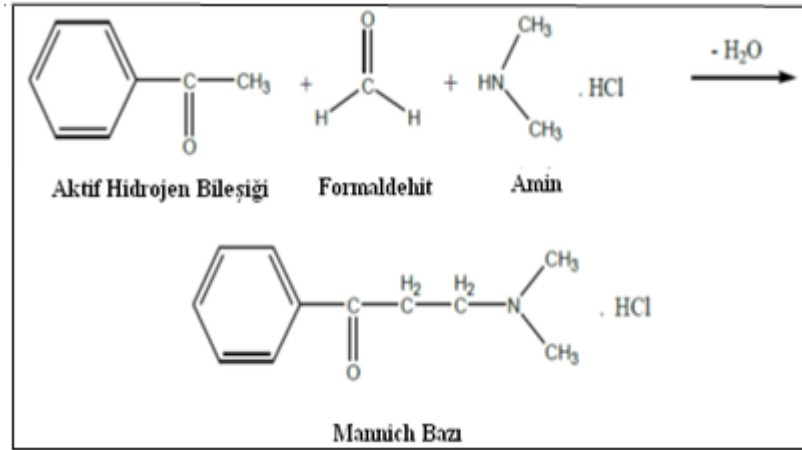


Şekil 2.4. P-450 enziminin etki mekanizması (Lea et al. 2017)

2.3. Mannich Bazları

Genellikle aktif hidrojen atomu içeren Mannich bazları, bir sekonder amin ve formaldehit bileşikleri arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelir (Dimmock et al. 1997). Bu reaksiyonda hidrojen amino grupları ile yer değiştirir (Şekil 2.5). Mannich bazı olarak adlandırılan amino substitüe bileşikler elde edilir. Kimyager Carl Mannich ve arkadaşları tarafından 1912 yılında bu reaksiyon “Mannich Reaksiyonu” olarak adlandırılmıştır (Mannich et al. 1912).

Mannich bazlarının; sitotoksik (Gul et al. 2001; Gul et al. 2002; Satyanarayana et al. 2002; Ying et al.2003; Gul et al.2003; Holla 2003; Gul et al.2005; Karthikeyan et al. 2006; Gul et al. 2009), antineoplastik (Dimmock et al. 1978; Hamon et al. 1978), antimikrobiyal (Gul et al. 2002), antikonvülzan (Dimmock et al. 1992; Gul et al. 2002; Gul et al. 2004; Karthikeyan et al. 2006; Gul et al. 2007), antienflamatuvar (Suleyman vd. 2007), antimalaryal (Kotecka et al.1997; Ying et al.2003; Karthikeyan et al. 2006) ve antiviral (Varma et al. 1981; Satyanarayana et al. 2002) etkileri gibi birçok biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir.

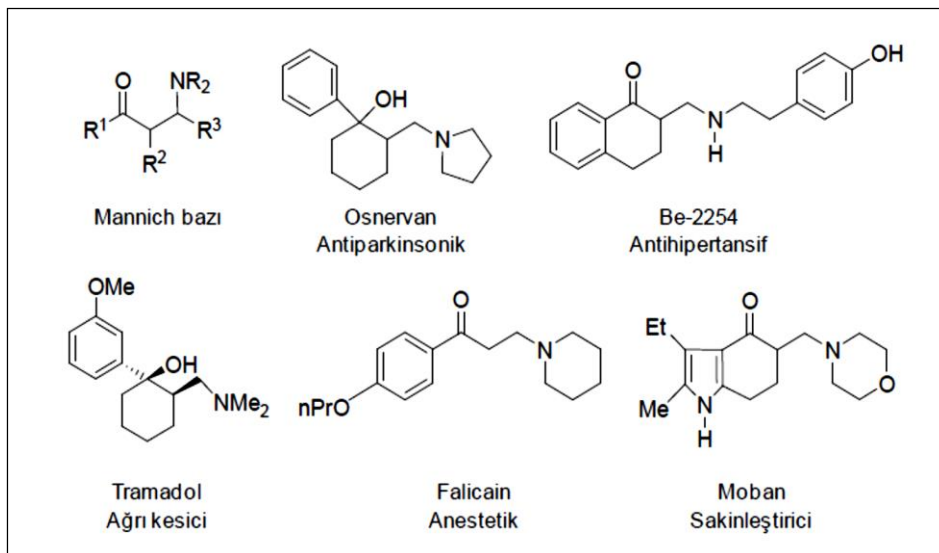


Şekil 2.5. Mannich reaksiyonu ve mannich bazı (Mannich et al. 1912)

Biyoaktif molekül elde etme çalışmalarında Mannich reaksiyonu sıklıkla başvurulmuş bir reaksiyon tipidir. Mannich bazlarından *in vitro* veya *in vivo* şartlarında amin grubunun çıkarılması ile biyoaktif α , β - doymamış ketonlar oluşmaktadır (Edwards et al. 1983; Dimmock et al. 1984). α , β - doymamış ketonlar ihtiva eden kimyasallar antineoplastik aktivitelerini hücre nükleofillerini β -tiyoeterleri oluşturmak üzere alkilleme suretiyle gerçekleştirirler (Lee et al. 1972). Bundan dolayı bu yapıdaki sentezlenmiş bileşiklere biyolojik alkilleyiciler denir. Mannich bazlarının antifungal, antiherpes, antibakteriyel ve toksisite gibi biyolojik aktiviteleri ile alkilleme kuvvetleri arasındaki bağlantı çoğu bilimsel çalışmanın konusu olmuştur (Lee et al. 1972; Edwards et al. 1983; Dimmock et al. 1984; Dimmock 1984). Kanseri tedavisinde son yıllarda Mannich bazlarının kullanımı artmıştır (Gheorghe 2014).

Bilim dünyasına Mannich reaksiyonunun katılmasından itibaren, yeni özgün bileşiklerin sentezinde ara ya da ana kademe olarak daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Bundan dolayı organik kimyanın en önemli reaksiyonu olan, karbon-karbon bağı reaksiyonlarından biri olup azot ihtiva eden pek çok doğal ürünün (alkaloid) ve aktif maddenin sentezinde kilit basamak olarak görülmektedir (Ciba et al. 2009). Mannich reaksiyonları değişik fonksiyonel grupların tek bir moleküler yapıda ihtiva eden organik moleküllerin bir basamakta sentezine yol açmıştır. Ayrıca ilaç dizaynı çalışmalarında çoğu kez başvurulmuş yöntemlerden biri olmuştur. Suda çözünürlükleri yüksek olan Mannich bazları, ön ilaç hazırlamasında başvurulmuş kimyasal yapılardır (Şekil 2.6)

(Reynolds et al. 1973; AsHolla et al. 2001; Walczak et al. 2004; Amir et al. 2004; Tramontini et al. 2011).



Şekil 2.6. Mannich bazı ve mannich bazı türevlerinin ilaç kimyasındaki uygulamaları (Ciba et al. 2009)

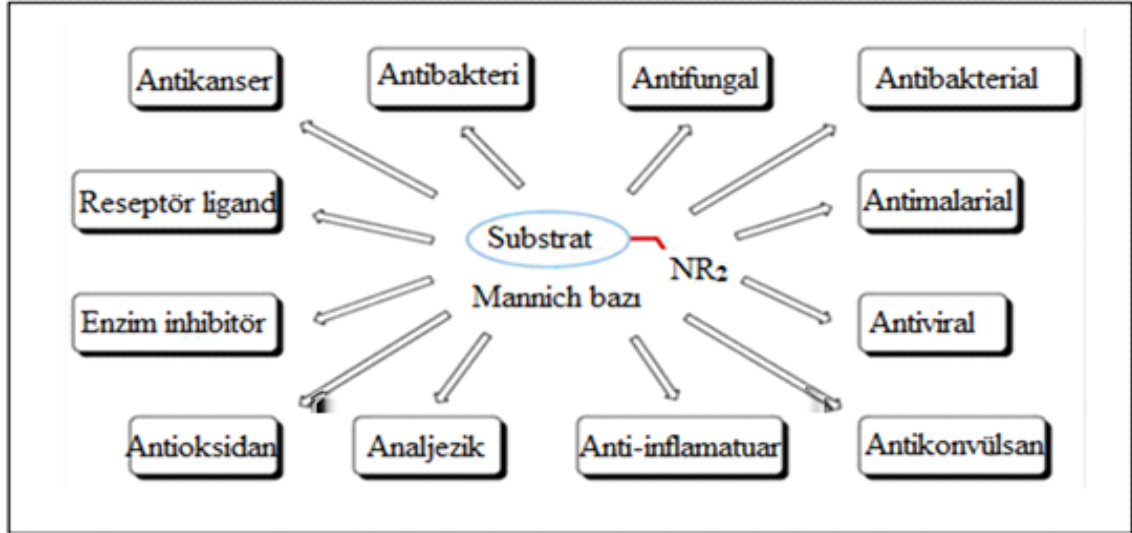
Mannich reaksiyonlarında çeşitli farmakolojik açıdan kıymetli ürünlerin veya şelatların elde edilmesi için kullanılan, piperidin, dimetilamin, dietilamin gibi pek çok sayıda amin bileşiği mevcuttur (Almajan et al. 2009). Mannich reaksiyonun meydana gelmesinde kullanılan diğer sekonder ve primer aminler Tablo 2.1’de gösterilmiştir (Tramontini et al. 1990).

Tablo 2.1. Mannich reaksiyonunda kullanılan diğer sekonder ve primer aminler (Tramontini et al. 1990)

Primer Amin	Sekonder Amin
Etilamin	Dietilamin
Metilamin	Dimetilamin
Alilamin	Dizaoamilamin
Etilaminoasetat	Morfolin
Benzilamin	Piperidin
β -kloretilamin	Piperazin
Tetrahidro- β -nafilamin	1 -Metoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin
B-hidroksietilamin	Benzil-(-2-sikloheksanonilmetil)-amin

Son yıllara kadar mannich bazlarının en önemli uygulama alanlarından biride doğal ürün sentezi ve ilaç kimyası olmuştur. Mannich bazı ve Mannich türevleri tarımda, boyada,

bitki koruma amaçlı ve polimer kimyasında kuvvetlendirici, çapraz bağlayıcı ve reaksiyon hızlandırıcı etkisi olarak geniş bir kullanım alanlarına sahiptir (Şekil 2.7).



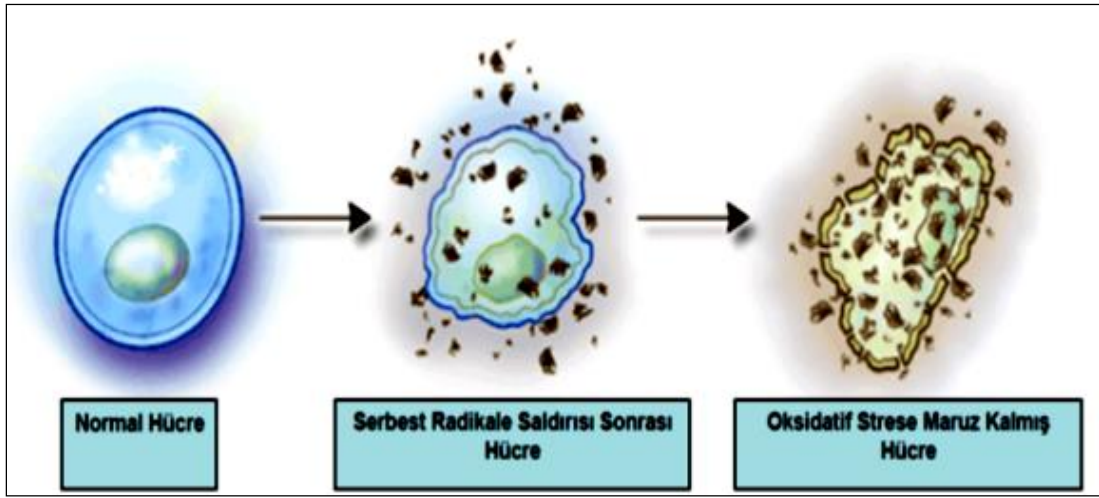
Şekil 2.7. Mannich bazları kullanım alanları (Gheorghe 2014)

2.4. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.4.1. Oksidatif Stres

Antioksidan savunma sistemi ile reaktif oksijen türleri arasında bulunan dengesizlik Oksidatif stres olarak tanımlanır (Şekil 2.8). Bu durum da dengesizlik reaktif oksijen türleri yanında, diğer bir deyişle antioksidan savunma sistemi tersinedir. Güçlü bir oksidatif stres, hücre hasarlarına ve hatta hücre ölümlerine bile neden olabilmektedir (Percival 1998; İşbilir 2008). Buna ek olarak serbest radikaller olarak adlandırılan ortaklanmamış elektrona sahip bileşikler hücrelerimizde DNA'ya, lipidlere ve proteinlere saldırarak bu yapılara zarar verir. Metabolizma sonucu oluşan serbest radikallerin kötü etkilerinden korunmak için, hücreler bunları zararsız hale getirebilecek antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin meydana çıkma hızı ile serbest radikallerin antioksidanlar tarafından zararsız hale getirilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Bu durumda hücre serbest radikallerin kötü etkilerinden korunmaktadır. Fakat bu var olan denge serbest radikaller tarafına bozulacak olursa, yani oluşum daha yavaş nötralize edilirse, serbest radikallerin oranı hücrede artar. Serbest radikallerin hücre fonksiyonlarının ve hücre artışı üzerine yaptıkları kötü etkiye “Oksidatif Stres veya

oksidatif hasar” denir. Kısaca özetlersek; oksidatif stres, antioksidan savunma mekanizması ile serbest radikal oluşumu arasındaki dengesizliği göstermekte olup, sonuç olarak doku tahribatına neden olmaktadır (Şekil 2.8) (MacDonald and Wicks 2006). Organizmada radikallerin ortadan kaldırılma hızı ile serbest radikallerin oluşum hızı mevcut bir denge içerisinde, bu duruma oksidatif denge denir. Organizma, oksidatif denge sağlandığı müddetçe, serbest radikallerden kaynaklanan olumsuz etkilerden zarar görmemektedir.



Şekil.2.8. Oksidatif stresin hücre yapısına etkisi (Ekchariyawat et al. 2013)

2.4.2. Serbest Radikaller

Orbitalinde ortaklanmamış bir ya da daha çok sayıda elektron taşıyan herhangi bir bileşik serbest radikal olarak tanımlanır. Bu serbest radikaller oldukça reaktif olup, ortamda bulunan diğer moleküllerle birleşerek, son kabuktaki ortaklanmamış elektron çiftini eşleştirmesiyle daha kararlı bir bileşiğe dönüşmeye çalışmaktadırlar (Akkus 1995). Reaktif karakterli serbest radikaller ile bu maddeleri oluşturan tüm faktörler “oksidan” veya “prooksidan” olarak adlandırılır (Mecoci et al. 1997). Hücrelerde serbest radikaller, ekzojen ve endojen kaynaklı nedenlere bağlı olarak meydana gelir. Ekzojen kaynaklı nedenler arasında parakuat gibi kimyasalların etkisi altında kalma, parasetamol, karbon tetraklorür gibi ilaç toksikasyonları, ultraviyole radyasyon ve iyonize, hava kirliliği yapan sigara dumanına maruz kalma, fitokimyasal maddeler, solventler gibi çevresel faktörlerin etkileri, nitrofurantoin, doksorubisin, bleomisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlara

maruz kalma ve alkol- uyuşturucu gibi bağımlılık yapıcı maddelerin kullanımı sıralanabilir (Özdem vd. 1994).

Endojen kaynaklı nedenler arasında doğal metabolik yollarla vücutta meydana gelen serbest radikaller, radikal bölen parçalayan antioksidan sistemlerle bertaraf edilememesi yatmaktadır. Doğal metabolik işleyişin radikaller tarafına bozulmasında bir dizi patolojik durum ortaya çıkar. Serbest radikalleri organizmada oluşturan doğal olayların başlıcaları, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, mitokondrial elektron transportu, biyosentetik ve biyokimyasal bozulma olaylarıdır. Serbest radikaller biyolojik sistemlerde hücreler arası boşluk, hücre içi ve hücre dışı sıvılarda meydana gelir. Antioksidan savunma sistemi eksikliği olması sebebiyle özellikle beyin omurilik ve eklem sıvılarında, serbest radikallere bağlı olarak hasarın daha çok olduğu gözlenmektedir. Hücreler doğal olarak oluşan serbest radikallerin oluşturacağı zarardan korumak için antioksidanlar, enzimler ve serbest radikal bertaraf edici detoksifikasyon sistemlerine bağlıdırlar (Haskell et al. 1970). Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi sonucu meydana gelir. Organizmada oluşan serbest radikaller negatif yüklü, pozitif yüklü veya nötral olarak oluşabilmektedirler. Biyolojik sistemlerde meydana gelen en kayda değer radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla birlikte; N, S, C elementlerinden oluşan farklı inorganik moleküller ve radikaller de mevcuttur. Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mo^{5+} , Mn^{2+} gibi geçiş metalleri olarak adlandırılan elementlerde, eşleşmemiş elektronları bulunduğu halde serbest radikal olarak adlandırılmaz. Ama bu tür iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal meydana gelmesinde yardımcı rol oynarlar (İşbilir 2008; Yokuş ve A.Ö. 2012). Serbest radikaller toksikolojide, tıpta, biyolojide ve gıdaların bozulmasında oynadıkları rol ile gittikçe artan bir öneme sahip olmaktadır. Gıda endüstrisinde imalat süreçleri boyunca, lipid peroksidasyonu karşılaşılan sorunlardan biridir. Lipid içeren gıdaların oksidasyonunu en aza indirmek için imalatçılar antioksidanları kullanırlar. Bununla birlikte klinisyenler ve biyomedikalciler de organizmayı, reaktif oksijen çeşitleri tarafından oluşturulan hasardan korumak için antioksidan kaynaklara ihtiyaç duymaktadırlar (Aruoma and O.I. 1996; Pezzuto and J.M. 1997).

2.4.3. Reaktif Oksijen Türleri

Dokularda oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri DNA, lipid, karbonhidrat ve proteinler gibi biyolojik olarak önemli materyallere de zarara neden olabilmektedirler. Organizmanın hücrelere hiçbir engelle karşılaşmadan giren ve en fazla kullanılma özelliği olan moleküler oksijen (O_2), yapısından dolayı radikal olmaya çok elverişli olmasından dolayı serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tanımlama ile reaktif oksijen türleri (ROT) akla gelmektedir (Odabaşoğlu vd. 2006; Akyıldırım 2011; İşbilir 2008). Bunlar, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Biyolojik sistemlerde oluşan oksijen radikalleri en önemli serbest radikallerdir. Oksijen iki kovalent bağ yapmasından sebebi ile moleküler oksijen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. İki elektronu dış orbitallerinde bulunan, farklı orbitallerde ve spinleri aynı yönde iken molekül minimum enerji seviyesindedir (İşbilir 2008; Lee 1991).

Meydana gelen serbest radikal, radikal özellik ihtiva etmeyen bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal meydana getirebilir. Biyolojik sistemlerdeki moleküller ve yapıların çoğu radikallik özellik göstermediğinden dolayı, *in vivo* şartlarda reaktif bir radikalın oluşması, çoğunlukla zincir reaksiyonunun başlamasına sebep olabilmektedir (Nehir vd. 1999; İşbilir 2008). Reaktivite radikale ve ortamda bulunan moleküle bağlıdır. Reaktif oksijen türleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Tür	Adı
O_2	Singlet oksijen
$OH^\bullet$	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$ROOOH$	Hidroperoksit
$ROO^\bullet$	Peroksi radikali
$RO^\bullet$	Alkoksil radikali
(O_3)	Ozon
$ROOH^\bullet$	Hidroperoksil radikali
$(HOCl)$	Hipoklorik asit

2.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin reaksiyonlara hızlı girme eğilimlerinden dolayı kuvvetli reaktif özellikleriyle tüm hücre bileşenleriyle rahatlıkla etkileşebilirler. Biyolojik sistemlerde savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyon başlatabilirler (İşbilir 2008). Oldukça reaktif moleküller olan serbest radikaller, farklı biyomoleküller ile reaksiyona girerek çeşitli yeni bileşikler oluştururlar. Çoğu kez toksik özellikler taşıyan bu bileşikler, en çok zararlı oldukları kısım membranlardır. Serbest radikaller membrandaki enzimleri aktif olmayan hale getirirler. Bu durumda, hücre membranlardaki yağ asitlerinin doymamış bağları ve kolesterol ile kolaylıkla reaksiyon oluşturarak çeşitli peroksidasyon ürünleri meydana getirirler. Bununla beraber membranların yapısını, fonksiyonunu bozdukları ve geçirgenliğini değiştirdiği bildirilmiştir (Akkuş 1995).

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksialdehitler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patojenik süreçlerde de önemli rol oynarlar. Özellikle glukoz, mannitol ve bazı sakkarit türevleri, hidroksil radikalleri ile reaksiyon verirler. Monosakkaritlerin yükseltgenmesi ile oluşan çeşitli peroksit türevleri ve oksialdehitler, protein ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllerle etkileşerek ve bu moleküller üzerinde çapraz bağlar oluşturarak bu moleküllerin yapısını bozabilmektedir. Böylece oluşacak hasar hücre yaşlanması veya kansere sebep olmaktadır (Türkoglu 2011).

Serbest radikaller proteinleri de hedef alır. Serbest radikallerin proteinleri etkileme dereceleri aminoasit içeriğine bağlıdır. –SH grubu ihtiva eden ve doymamış bağ içeren proteinler (fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, sistein, metiyonin) hiçbir engelle karşılaşmadan okside olabilirler. Oksijen radikalleri proteinlerin tersiyer, sekonder ve primer yapılarını etkileyebilir. Bu olaylar sonucunda primer yapının oksidatif modifikasyonu tersiyer ve sekonder yapı değişmelerine sebep olur. Membran proteinleri ve sitoplazma proteinleri bozunduklarında, çapraz bağlanarak dimerleşir ve bu şekilde daha çok agregat oluşur. Süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit, oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesine neden olur (İşbir 2008).

Serbest radikaller DNA'yı kolayca etkileyebilir. İyonize radyasyondan kaynaklanan ölüm ve hücre mutasyonları, serbest radikallerin DNA ile etkileşimi sonucu meydana gelir. Oluşan radikaller, DNA'yı etkileme sonucu hücre değişimine ve ölümüne yol açabilirler. Nükleik asit baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları sitotoksositeye sebep olur. Hidroksil radikali bu olaydan özellikle sorumlu tutulmaktadır. Onarım sistemlerindeki eksiklik sonucu mutasyonlar gelişebilir (Kanofsky and J.R1989; Floyd and R.A 1990). DNA hasarı düzeltilmezse hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne sebep olabilir (Akkuş 1995; İşbilir 2008). Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 hücre membranlarını rahatlıkla geçebildiğinden dolayı hücre çekirdeğine kadar ulaşır. Çekirdekte meydana gelen hidroksil radikali dört DNA bazıyla rahatlıkla reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına sebep olur (Dainippon et al. 1981; Kılinc vd. 2002).

Serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküller lipidlerdir. Serbest radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Hücre membranlarındaki yağ asitleri ve gıdalardaki kolesterol serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonunu aktive eden radikaller; peroksil, alkoksil, süperoksit ve hidroksil radikalleridir. Doymamış çoklu yağ asitlerinin serbest radikallerin etkisi ile oksidatif yıkımı “nonenzimatik lipid peroksidasyonu” olarak bilinir ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (Dainippon et al. 1981; Halliwell et al. 1990).

2.5.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu hücre membranında bulunan gliserit, glikolipid, fosfolipit ve sterol yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla aldehitler, alkoller, peroksitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi farklı ürünlere yıkılması olayıdır. Serbest radikaller reaktif yapıları sebebiyle, özellikle lipitler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere yükseltgenebilen bütün hücre elemanları etkileşim halindedir (Nordberg et al 2001).

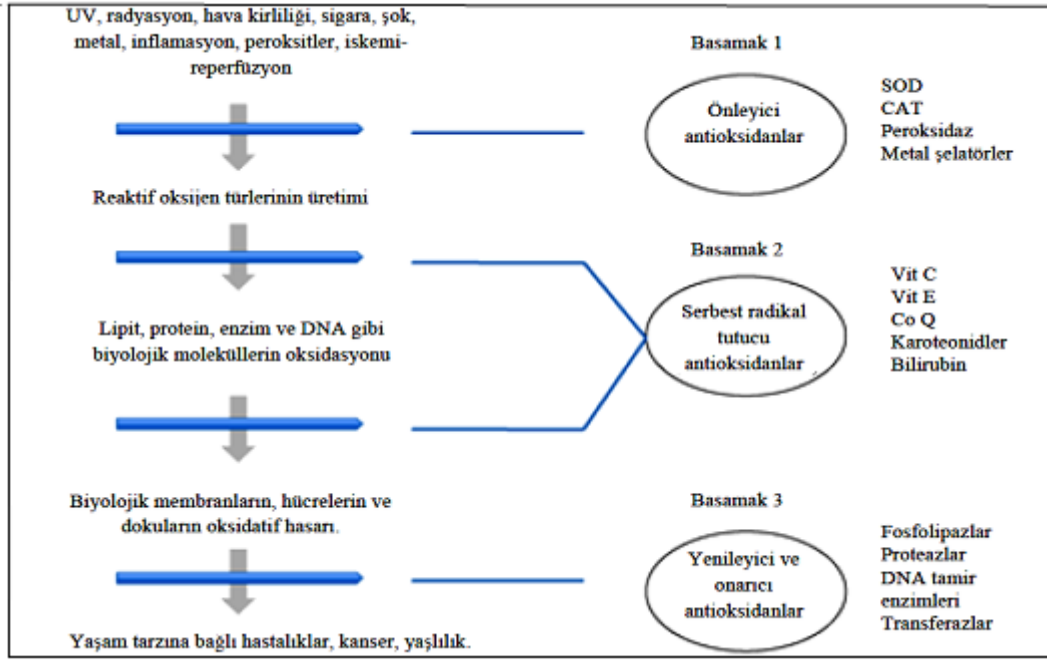
Biyolojik sistemde lipidlerin oksidasyonu sonucunda MDA (Malondialdehit) oluşmaktadır. LPO'nun değerlendirilmesi ile MDA ölçümü yapılabilir. Bu bileşikler hücresel olarak metabolize oldukları veya ilk olarak etkili oldukları

kısmalara diffüze olup, meydana gelen hasarı hücrenin diğer bölümlerine dağıtırlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması sebebi ile reaksiyonların çoğu hücre membrana bağlı moleküllerde oluşmaktadır. Aldehitler ve Peroksil radikalleri membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna oluşmasına sebep olurlar. Bundan dolayı membranlarda, membrana bağlı enzimleri ve reseptörleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de çok fazla hasar oluşturabilirler. Plazma lipoproteinleri ve düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının hasara uğramasına sebebiyet verebilirler (Rice-Evans et al 1991).

Hem insandaki hem de doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır (Köse vd. 1992).

2.6. Antioksidanlar

Organizma da reaktif oksijen türlerinin (ROT) meydana getirdiği ve oluşturduğu hasarı bertaraf etmek için çok sayıda savunma mekanizmaları mevcuttur (Şekil 2.9). Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak tanımlanır. Antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerini (ROT), serbest radikalleri, uzaklaştıran ve bunların oluşturulabileceği tahribatları önleyen ajanlar olmalarıyla birçok hastalığın oluşmasının önlenmesinde ve tedavisinde hayati öneme sahiptir. Vücudumuzu radikallere karşı koruyan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerden meydana gelen enzim sistemi olarak bildiğimiz savunma mekanizmaları ile Vitamin E, C, A, lipoik asit gibi antioksidan Vitaminlerden meydana gelen yardımcı savunma mekanizmaları bulunur (Dergel 1992).



Şekil 2.9. Antioksidan gruplar ve görevleri (Fridovich 1975)

2.6.1. A Vitamininin Antioksidan Etkisi

A Vitamini suda çözünmeyen, organik çözücülerde ve yağda çözünen bir bileşik olup, çok sayıda doymamış bağa ve bir primer alkol grubuna sahiptir. A Vitamini sadece memelilerde retinol etkisi göstermez, karotenoidler de (α , β ve γ - karotenler) A Vitamini etkisi gösterir. Bunun yanı sıra γ - karotenin ve α -karotenin bir araya gelmesiyle bir molekül A Vitamini meydana gelir. Karaciğerde A Vitamini depolanması yağ asidi esteri şeklinde olur (Tüzün 1997). Günlük besinler ile vücuda alınan β -karotenler ve karoten dioksigenaz enzimi ile birlikte oksidatif bozunmaya uğramaktadırlar. Bu bozunma safra tuzlarının ortamda bulunmasıyla hızlanır ve olayın devamında iki molekül retinal meydana gelmektedir. Retinal NADPH yardımıyla intestinal mukozada retinala has bir retinal redüktaz enzimi vasıtasıyla retinole indirgenmektedir. Retinolün çoğu kısmı doymuş yağ asitleri ile birlikte reaksiyona girmesiyle ester oluşturarak kan dolaşımına lenf kanalı ile iletmektedir.

A Vitamini görme, üreme, büyüme ve epitel hücrelerin dayanıklılığı fonksiyonlarında önemli bir fonksiyona sahip ve insanların günlük olarak ihtiyacı 1 mg civarındadır. Böbrek, karaciğer, yumurta sarısı, yağ A Vitamini bakımından oldukça zengin kaynaklardır. A Vitamini koyu, yeşil ve sarı sebzeler ile meyveler bakımından zengindir.

A Vitamininin yetersizliğinde vücuttaki eklemlerde iltihaplanmalar, akabinde göz kornealarında iltihaplar, görme duyusunda azalma, gözaltı deriler de kırışma, ortama adapte olamama, gece ile gündüz arasında görme duyusundaki dengesizlik oluşabilmektedir (Özer 1996).

A Vitamini etkili radikal olan singlet oksijen temizleyicisi özelliğinden dolayı diğer oksijen radikallerine karşı da savunma etkisi yapar. A Vitamininin oluşmasında ilk bileşik olan β - karotenin süperoksit radikalini temizlediği, singlet oksijeni ve peroksit radikalleriyle hemen etkileşerek antioksidan savunma görevi gördüğü belirlenmiştir. Lipit peroksidasyonu esnasında meydana gelen karotenoitler radikallerin oluşmasını engellemede etkilidirler. Karotenoitler aktif oksijen türlerini sonlandırmada etkili olan pigmentler olarak bilinmektedirler (Stratton 1997).

2.6.2. α -Tokoferol

E Vitamini ailesinin ana bileşiğ olan α -tokoferol doğada yaygın olarak bulunur. Antioksidan aktivitesi olarak yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka yapısından kaynaklanır (Akkuş 1995). Lipofilik özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı plazma lipoproteinlerinin ve hücre membranlarının kayda değer zincir kırıcı antioksidanıdır. Peroksil radikallerini gidererek lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

α -tokoferol radikali kısmen stabil ve reaktivitesi az olan bir radikaldır. Glukuronik asit ile konjugasyona uğrayıp safra ile atılabilir. Atılmadan önce veya okside olduktan sonra askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilir. Böylece rejenere edilmiş olur. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar glutatyon peroksidaz ile α -tokoferolun serbest radikallere karşı birbirini destekleyici etkisi olduğunu göstermiştir. GSH-Px meydana gelmiş peroksitleri ortadan yok ederken, α -tokoferol peroksitlerin oluşumunu engeller (Akkuş 1995).

Günümüzde aterosklerozun oluşumunda lipid peroksidasyonunun özellikle de LDL peroksidasyonunun kritik ve etkili bir rol oynadığı bildirilmektedir. Lipid peroksidasyonu α -tokoferol tarafından yayılma basamağında engellenir. α -tokoferol koroner kalp hastalıkları riskinin deneysel olarak azaldığı gösterilmiştir (Anderson 2007). Ayrıca antikarsinojen etki gösterir, immüniteyi artırır, iskemi/reperfüzyon ile ilişkili peroksidatif

hasarı önlemede etkilidir, eritrosit membranının stabilitesi için esansiyeldir. Selenyumun organizmadan kaybını önleyerek ve selenyum aktif halde tutarak metabolizmasında da önemli rol oynar (Seven ve Candan 1996; Anderson 2007).

2.7. Kanser

Kanser tek tür bir hastalık olmayıp, farklı nedenlerle ve semptomlarla tanımlanmış çok fazla hastalığın birleşimidir (Silverstein et al. 2006; Ruddon 2007; Almeida and Barry 2011; Xuan et al. 2014). 2020 yılına kadar her yıl için 20 milyon yeni kanser hastasının olacağı tahmin edilmektedir (Vainio et al. 2003; Shewach ve Kuchta, 2009). Organizmalardaki kanserin nedeni ya da nedenleri günümüze kadar hala kesin olarak bilinmemektedir. Risk faktörleri cinsiyete, yaşam şekillerine, yaşa, aile öykülerine, beslenmeye, fizyolojik ve metabolik süreçlere ve genetik faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ayrıca bireyi kanser çeşitlerine yatkın hale getiren genler, kanser oluşumuna neden olan radyasyona maruziyet, virüsler, çeşitli kimyasallar kanser nedenleri arasında sayılmaktadır. Bağışıklık sisteminin güçlü olmaması, bozulması, yetersiz beslenme tarzı ve çeşitli çevresel faktörler de kanser oluşumuna sebep olmaktadır (Halliwell 1994). Vücudumuzun yapı taşları olan hücrelerin çekirdeği içerisinde yer alan kromozom ismi verilen ipliksi birimler bulunur. Kromozomlar vücudumuzun büyümesini, davranışlarını ve fonksiyonlarını nasıl yapacağını anlatan milyonlarca bilgiyi ihtiva eden birimlerdir. Kromozamlardaki genler genellikle düzgün çalışır ve hatasız mesajlar gönderirler. Kromozomların kendilerini çoğaltması hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hücre bölünmesi aşamasında meydana gelen hataların büyük kısmı dış faktörlerin sebep olduğu hatalardır. Organizma genellikle bu hataları kendi başına onarabilse de ara sıra bu onarma gerçekleşmez ve bir ya da daha çok gen mutasyona uğrar. Sonuç olarak kanser; bir hücrede bulunan kromozomun hasar görmesi ve çoğunlukla değişime uğraması sebebiyle meydana gelmektedir. Genlerin veya gen ekspresyonlarının hatalı değişimi ile hücreler farklı mesaj gönderir ve çabuk büyür ve yine bölünürler. Vücutta bunun haricinde meydana gelen doku tahribi ve yaralanma vakalarında, dokuların çabuk yenilenmesi sırasında da çabuk hücre artması görülür. Bu normal süreçlerin sonunda durdurma komutunu hücre içindeki özel genler verir. Lakin bu ‘dur’ komutuna kanserli hücre uymaz ve kontrolsüz, anormal bir şekilde büyümeye başlar. Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar, vücutta herhangi bir kanser tipinin

oluşması için 300-500 arası normal genin modifikasyona uğraması ile kanserin ortaya çıkmasına işaret etmektedir (<https://www.saglik.gov.tr/> 2005).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda istatistiksel sonuçlara göre, erkeklerde larinks, akciğer ve mesane gibi sigara kullanımına bağlı olarak oluşan kanser ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri ise kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Hem kadınlarda hem de erkeklerde en çok kolorektal kanserleri görülmektedir. Bu veriler sonucunda, Türkiye’de en sık görülen kanserlerin türlerinin önlenabilir kanserler olduğu ortaya çıkmaktadır (<https://www.saglik.gov.tr/> 2005). Son yıllarda kanserli olan hastaların tedavisinde çoğunlukla ışın tedavisi ve cerrahi tedavi kullanılmaktadır. Yapılan bu tedavilere ilave olarak kemoterapi de uygulanmaktadır. Kemoterapi, genellikle çok sayıda ilaçla gerçekleştirilen bir tedavi yöntemi olup, kanserli olan hücreleri ortadan kaldırmak için ilaçlarla uygulanan tedavi yöntemidir. Bu yöntemde istenen özellik, ilacın kanser hücrelerini öldürmesi normal sağlıklı hücrelere ise zarar vermemesidir. Lakin böyle bir özellik şu anda tedavide kullanılan ilaçların birçoğunda bulunmaz. Çünkü normal sağlıklı hücre ile malign kanser hücresi arasında nicelik olarak kayda değer bir fark yoktur. Kullanılan ilaçlar çoğunlukla dokulara ve sağlıklı hücrelere hasar verir. Oluşmasını istemediğimiz yan etkiler temel olarak tedavinin kapsam ve tipine bağlıdır ve her bireyde benzer şekilde etki etmez hatta aynı bireyde bile bir seanstan diğerine farklılık gösterebilir. Örneğin, sitotoksik ilaçlarla yapılan tedavilerde hastalarda genellikle istah kaybı, kusma, bulantı, kansızlık, halsizlik ve zayıflama ile enfeksiyon riskine yol açan kan hücrelerinin sayısında azalmaya sebep olur. Kanserli hastalarda kemoterapi ile tedavilerde hastanın genellikle saçı dökülürken, diğer istenmeyen etkileri ise verilen ilacın tipine göre farklılık gösterir.

Yapılan çalışmalar ve ulaşılan istatistiksel sonuçlar göz önüne alındığında günümüzde kanserin herhangi bir şeklini tamamen ortadan kaldıracak ve tedavi edecek veya engelleyecek kimyasal bir bileşik veya etken madde henüz keşfedilmemiştir (Cloughesy et al. 2002; Patil et al. 2013; Rx MediaPharma 2015). Kanser ilaçlarında istenen etki, hem selektif toksisitesi değerini çoğaltarak daha fazla verimli bir tedaviye olanak veren hem de iyileşme süreci ve akabinde ortaya çıkan birçok istenmeyen yan etkisi azaltılmış veya yan etkisi olmayan var olan bileşiklerin geliştirilmesi veya yeni bileşiklerin keşfedilmesidir. Yeni sentezlenen ilaç etken maddelerinin araştırılması ve var olan etken

maddelerin geliştirilmesi, potansiyel kanser ilaçlarına yeni, özgün farklı yaklaşımlar sağlayacaktır.

Yaptığımız bu tez çalışmamızda, biyolojik etkisini araştırdığımız triazol bileşiklerinin, kolon kanseri üzerindeki antitümoral etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak; yine reaktif oksijen türlerine karşı mevcut antioksidan özellikleri *in vitro* ve *in vivo* olarak; ve çeşitli patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

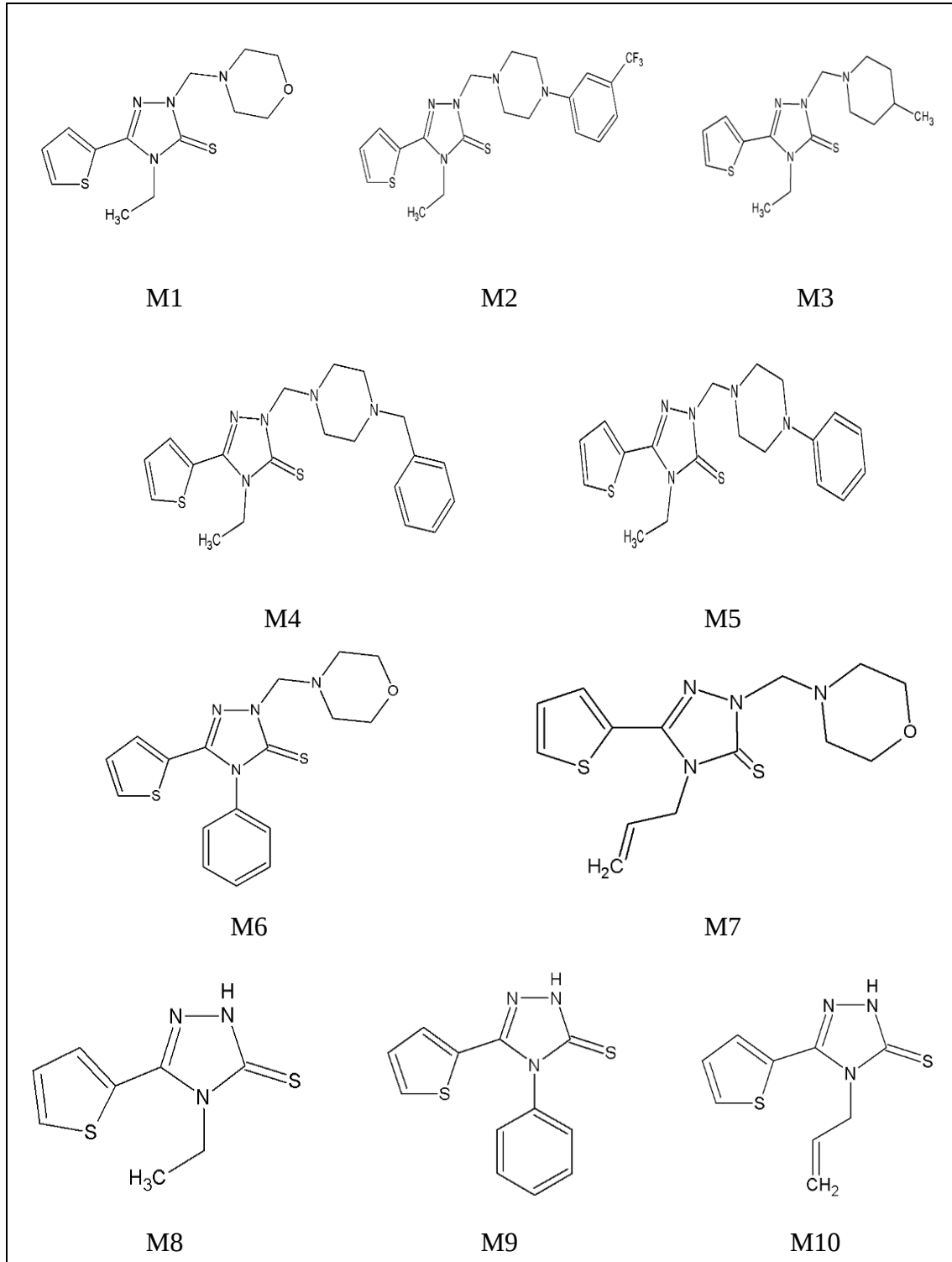
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Bileşikler

Biyolojik aktiviteleri araştırılacak olan triazol türevleri Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Anabilim Dalında sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. *In vitro* denemeleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarlarında ve *in vivo* hayvan denemeleri FÜDAM merkezinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda biyolojik özellikleri araştırılacak olan triazol bileşiklerinin şematik gösterimi ve UIPAC adları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1 ve Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Triazol bileşiklerin kodları ve IUPAC adlandırılması

M1	4-etil-2-(mofin-4-metil)-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M2	4-etil-5-(2-tiyenil)-2-({4-[3-(triflorometil)fenil]piperazin-1-il}metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M3	4-etil-2-[(4-metilpiperidin-1-il)metil]-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M4	2-[(4-benzilpiperazin-1-il)metil]-4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M5	4-etil-2-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M6	2-(morfolin-4-ilmetil)-4-fenil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M7	4-etil-2-(morfin-4-metil)-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazole-3-tiyon
M8	4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazole-3-tiyon
M9	4-Fenil-5-(2-tiyenil)- 2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M10	4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazole-3-tiyon



Şekil 3.1. Triazol bileşiklerinin moleküler yapısı

3.2. *In Vitro* Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi

3.2.1. *In Vitro* Yöntemlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

1. 0,2 M Fosfat Tamponu (pH=6,6): 6,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözülmesi sağlanarak 250 mL'ye yakın bir hacme tamamlandı ve pH metre de ölçüm yapılarak NaOH çözeltisiyle çözeltinin pH=6,6'ya ayarlandı ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. %0,1'lik FeCl_3 çözeltisi: 83 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ saf suda çözöldü, son hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisi: 25 g TCA bir miktar distile suda çözöldü, son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
4. %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi: 2,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ bir miktar distile suda çözöldü, son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
5. 150 μM NBT çözeltisi: 6,1 mg NBT 50 mL balon jojeye alındı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0,1 M, pH=7,4) tamamlandı.
6. 468 μM NADH çözeltisi: 34 mg NADH alındı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye kadar fosfat tamponuyla (0,1 M, pH=7,4) tamamlandı.
7. 60 μM PMS çözeltisi: ilk olarak 18 mg PMS alındı ve son hacim 1 litreye fosfat tamponuyla (pH=7,4, 0,1 M) tamamlandı. Akabin de bu çözeltiden 10 mL alındı ve 100 mL'ye aynı tamponla seyreltildi.
8. 0,1 M Fosfat Tamponu: 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80 mL saf suda çözölerek, pH metre deki yardımıyla pH=7,4'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
9. 2 mM FeCl_2 çözeltisi: 0,02 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ alındı ve son hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
10. 43 mM H_2O_2 çözeltisi: %30'luk H_2O_2 'den 343 μL alındı ve 0,1 M'lık fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
11. 5 mM ferrozin çözeltisi: 0,123 g ferrozin alındı, 5 mL suda çözöndü ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
12. 200 mM, 5 mL Deoksiriboz çözeltisi: 0,135 g alınıp bir miktar suda çözöndü ve son hacim distile su ile 5 mL'ye tamamlandı.
13. 20 mM, 50 mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,278 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alınıp bir miktar suda çözöndü ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

14. 10 mM, 50 mL EDTA Çözeltisi: 0,011 g EDTA alınıp bir miktar suda çözündü ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

15. 1 M, 50 mL H₂O₂ çözeltisi: 5,107 mL H₂O₂ alınıp son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

16. 500 mM, 5 mL askorbik asit çözeltisi: 0,495 g askorbik asit alınıp bir miktar suda çözündü ve son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

17. 50 mM, 50 mL KH₂PO₄ çözeltisi: 0,345 g KH₂PO₄ alınıp 10 mL suda çözündü ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.2.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

pH metre	: Hanna HI221
Çalkalamalı su banyosu	: Memmert VNB14
Magnetik karıştırıcı	: IKARHBasic
HPLC cihazı	: Shimadzu
Homojenizatör	: Micra-D8
Etüv	: Memmert UNB 400
UV-Vis spektrofotometre	: Shimadzu UV-1700
Vorteks	: IKA
Hassas terazi	: Denver TP 323
Soğutmalı santrifüj	: Hettich 320 Derin dondurucu

Ayrıca vida kapaklı deney tüpleri, otomatik pipet ve pipet uçları kullanıldı.

3.3. İn Vitro Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri

3.3.1. İndirgeme Kuvveti Tayini

Oyaizu metodu ile test edilecek olan bileşiklerinin (M1-M10) indirgeme kuvveti Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye değişim prensibine göre yapıldı (Oyaizu 1986). Farklı konsantrasyonlar da DMSO'da çözünmüş bileşiklerden (50, 100, 250 µg/mL) farklı tüplere 1'er mL konuldu. Her bir tüpe daha sonra 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrosiyaniür (K₃[Fe(CN)₆]) ilave edilerek oluşan karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildi.

Yapılan bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımlarına 2,5 mL %10'luk triklor asetik asit (TCA) ilave edildi. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üst fazdan kalan çözeltinin 2,5 mL'si alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve %0,1'lik 0,5 mL FeCl₃ ilavesinden sonra 700 nm'de absorbans okundu. Kör olarak DMSO kullanıldı. Kontrolde ise sadece triazol bileşikleri içermeyen DMSO'lu karışım kullanıldı. Numune yerine ise standart antioksidanlar olan BHT kullanılarak indirgeme kuvvetinin karşılaştırılması yapıldı. Her bir ölçüm 3'er kez tekrarlanarak alınan sonuçların ortalamaları hesaplandı. Çalışılan bu metotta, yüksek indirgeme kuvveti, yüksek absorbans değeri olarak değerlendirildi.

3.3.2. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktiviteleri için test bileşikleri (M1-M10), Dinis ve ark.,'nın geliştirdiği yöntem (T.C.P. Dinis et al. 1994) göre çalışıldı. Bu yöntemde farklı konsantrasyondaki (50, 100, 250 µg/mL) örneklerden 0,4 mL alınarak üzerine 2 mM'lık 0,05 mL FeCl₂ çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon 0,2 mL ve 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. Vortekste çözeltinin kuvvetli bir şekilde karıştırılması sağlandıktan sonra 25 °C sıcaklığında 10 dk bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı ferrozin dışında kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak test numuneleri haricinde geriye kalan çözelti kullanıldı. Aynı derişimlerdeki standart antioksidan olarak kabul görülen BHT metal şelatlama aktivitelerini karşılaştırmak için kullanıldı. Her bir ölçüm 3'er kez yapılarak alınan sonuçlar ortalamaları hesaplandı. Bu metotta, yüksek metal şelatlama aktivitesi, düşük absorbans değeri olarak değerlendirildi.

Metal şelatlama aktivitesi aşağıdaki verilen förmülde hesaplandı.

$$\% \text{ Metal Şelatlama Aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_1 = Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı

A_0 = Kontrol Absorbansı

3.4. *İn Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Kullanılan Kimyasallar

Pensilin-streptomisin Biological Industries'den (İsrail) ve Fetal calf serum (FCS), dimetilsülfoksit (DMSO), NaOH, NaCl ve HCl Merck'ten (Dormstadt, Almanya) satın alındı. Deneyisel çalışmalarda kullanılacak diğer kimyasallar Sigma–Aldrich'ten (St. Louis, MO, USA) temin edildi. Yapılan tüm deney safhalarında bi-distile su kullanıldı. Test edilecek farklı triazol bileşikleri DMSO'da çözülerek son derişimleri 5, 10 ve 20 μM olacak şekilde hücre ortamına bırakıldı.

3.4.2. Hücre Kültürleri

Hücre kültürü çalışması, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Araştırmalar Laboratuvarında yapıldı. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden (Ankara) insan kolon karsinoma (HT 29) hücreleri temin edildi. Bütün hücreler 25 cm^2 kültür flasklarında, RPMI-1640 medyum (içerisine %10 FCS, 100 U/mL penisilin ve 0,1 mg/mL streptomisin ilave edilerek hazırlanan) ile beslendi. Ortam koşulları 37 °C'de, karbondioksitli (%5 CO_2) inkübatörde ve nemli koşullarda tutulan hücrelerin medyumları belli aralıklarla (haftada iki defa) değiştirildi. Bu süreçte hücreler konfluent olduğunda, solüsyon olarak tripsin-EDTA kullanılarak flasklardan ayrıldı ve 96 kuyucuklu plaklara aktararak 3-(4,5-dimetiltiazol–2-il)-difeniltetrazoliumbromid (MTT) analizlerde kullanıldı.

3.4.3. Hücre Kültürlerine Triazol Bileşiklerinin Uygulanması

Çalışmamızda test edilecek farklı triazol bileşikleri 5, 10 ve 20 μM 'lık konsantrasyonları ve aynı miktarlarda çözücü (DMSO) hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara eklendi ve 24 saat süreyle karbondioksit inkübatöründe (NuairCo, Plymouth, MN, ABD) 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar akabinde hücrelerin canlılık oranı hemositometrede %0,4 trypanblue kullanılarak analizlendi. Canlılık oranı %90'ın altında olduğu koşullarda deneylere başlanmadı.

3.4.4. MTT Assay

Triazol bileşiklerinin sitotoksik etkileri MTT assay yöntemi ile belirlendi. Çalışılan bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mor-mavi renkli, suda çözünürlüğü olmayan formazana indirgenir. Oluşan formazan, yalnızca aktif mitokondrinin ihtiva ettiği canlı hücrelerde görülmektedir. Spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Bu yöntemin uygulaması esnasında, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı, steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan ve 96 kuyucuklu plaklara eklendi. 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri, dalga boyu 550 nm de ELISA cihazında (Synergy, HT, USA) okutuldu. Deneysel çalışmadaki kontrol kuyucukları absorbans değerleri okundu ve elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Test bileşiği ve çözücü uygulanan kuyucuklardan okunan absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. Farklı günlerde MTT denemeleri üç kez tekrar edildi.

3.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.5.1. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi

Bu çalışmada, sentezlenen kimyasalların mikroorganizmalara karşı Minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) belirlemek amacıyla mikrodilüsyon broth yöntemi kullanıldı (Eloff 1998). Çalışmada bir gram-pozitif bakteri olan *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) olmak üzere 1 adet mantar suşu kullanıldı.

Kimyasallar Dimethyl sulfoxide (DMSO; 5000 µM) içerisinde çözdürülerek stok çözeltiler hazırlandı ve steril distile su içerisinde 1/10 kat seyreltildi. 50 µL steril distile su 96 kuyucuklu plaka üzerinde her bir kuyucuğa ilave edildi. Daha sonra test bileşiklerinden 50 µL alınarak kuyucuklara ilave edildi ve seri seyreltmeler yapıldı. Bakteriler için Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072), *Candida albicans* için Saboraud Dekstroz Broth (Himedia ME033) besiyerleri kullanıldı. Kimyasal bileşiklerin kuyucuklardaki konsantrasyonları 125 µM ile 0.48 µM arasında ayarlandı. Bakteriler için 5×10^5 CFU/mL, *Candida albicans* için $0,5-2.5 \times 10^3$ CFU/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µl mikroorganizma süspansiyonu eklendi (CLSI 2002, 2012). Bakteri eklenen plaklar 37 °C’de, *Candida albicans* eklenen plaklar 35 °C’de 16-24 saat inkübe

edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görünür hale gelmesi için her kuyucuğa 50 µl 2 mg/mL 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Merck, Germany) eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklarda renk değişiminin olmadığı ilk kuyucuklar MIC değeri olarak kabul edildi. Test üç kez tekrarlandı ve aynı sonuçlara ulaşıldı.

3.6. Test Bileşiklerinin *Saccharomyces Cerevisiae* Hücrelerindeki MDA Düzeylerine Etkisi

Saccharomyces cerevisiae maya hücreleri, sentezlenen triazol bileşiklerinin hücre içindeki antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için kullanıldı. Tek hücreli olan *Saccharomyces cerevisiae* Fungi alemine dahil bir mikroorganizmadır. Diğer mayalar da olduğu gibi *Saccharomyces cerevisiae* de karbonhidratları fermente eder. Yüksek vitamin içeriği olan mayaların, besin olarak değerlerini artırır. Bir kısım *Saccharomyces cerevisiae* türü diğer vitaminler birlikte B Vitaminini özellikle sentezlerler. Moleküler düzeyde maya hücreleri sıklıkla metabolizmanın oksidatif strese yanıtı çalışmalarında bir model olarak kullanılmaktadır (Herdeiro et al. 2006). İnsan ve maya genomunun dizileri %23 ortaktır. Bu çalışmada maya araştırmaları için, Malt extract broth'da aşıl原因 *Saccharomyces cerevisiae* etüvde 25 °C'de inkübe edildi ve eksponensiyel kısımdan 10⁶ hücre/mL alınarak deneysel çalışmalar gerçekleştirildi. MDA ölçümleri için birer deney tüpüne 2'şer ml hücre içeren çözelti konuldu. Maddeler DMSO da çözülerek belirli konsantrasyonlar da çözeltileri hazırlandı ve son derişimler 50 µM ve 100 µM 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 mL deki hücre sayısının 10⁶ hücre/mL olmasına ve maddelerin çözünürlüğü de göz önüne alınarak dozlara karar verildi. MDA analizi için kimyasal maddelerle muamele edilmiş hücrelere %15'lik trikloroasetik asitten 250 µL ve 0,5 M HClO₄'den 750 µL ilave edilerek çalkalandı. Küçük parçalara ayrılan hücreler lizat 5 dakika 4500 devirde santrifüjlendikten sonra dikkatlice berrak kısım alınarak HPLC'de analizlendi (Karatepe 2004).

3.7. In Vivo Antioksidan ve Antitümör Aktivite Çalışmaları

Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (tarih: 18.11.2015, toplantı sayısı: 2015/20, karar no: 189, protokol no: 2015/130) standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü. Bu çalışmada *Rattus Norvegicus* cinsi 8 hafta ortalama 250 g ağırlığında erkek ratlar kullanıldı. Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (BÜDAM)’ndan alınan ratlar uygun kafeslerle özel araçla Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) getirilerek buradaki ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra deneysel uygulama gerçekleştirildi. Ratlar, uygun yaşam koşulları sağlanan bir ortamda, her gün altları özel olarak temizlenen kafeslerde beslendi. Özel çelik kaplarda yemler verildi. Ratlara paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu verildi. Elazığ yem fabrikasında deney hayvanları için özel olarak hazırlanan pelletler halindeki getirilmiş rat yemleriyle beslendi. Deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar ratların beslenmesi bu şekilde devam edildi. Deneysel çalışmalarda ratlar gruplandırıldıktan sonra kolon kanseri oluşumu için Azoksimetan uygulaması yapıldı. Çalışma süresince hiçbir nedenle rat ölümü yaşanmadı. Tablo 3.2’de ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan besin madde oranları gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Kepek	8
Arpa	14
Soya Küspesi	25
E-Kemik unu	4
Balık Unu	8
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

3.7.1. *In Vivo* Antitümör Aktivitesi ve Histopatolojik Uygulamalar

3.7.1.1. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Araştırmada kullanılacak ratlar 1 kontrol, 5 uygulama grubundan oluşturuldu ve her grupta 5'er denek olmak üzere toplam 30 rat yer aldı. İlgili literatür (Skehan 1990) taramasından sonra uygulamaların kontrol ve denek grupları için 0. gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün olacak şekilde 3 gün ara ile yapılmasına karar verildi ve 30 gün uygulandı. Ratlara 3 günlük aralıklarla 30 gün boyunca belirli dozlarda deri altı enjeksiyon yapıldı. Bu sürenin bitiminde ratlar dekapite edilerek karaciğer ve kan örnekleri alındı. Ratlardan alınan kan örnekleri pıhtılaşma olayını takiben santrifüjlenerek serum ayrıldı. Alınan kan örnekleri santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç üç gün içerisinde analizlendi. Analiz anına kadar serum örnekleri -20°C'de bekletildi. Doku örnekleri ise uygun boyutta kesilerek hazır hale getirildi. Uygulama maddelerinin dozları literatürden (Varvaresou et al. 2000) faydalanılarak kararlaştırıldı ve şartlara uygun olarak 25 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde önce DMSO'te çözüldü ve DMSO miktarı %10'un altında olacak şekilde mısır özü yağı ile seyreltildikten sonra hayvanlara deri altından uygulandı. Kontrol gruplarına, DMSO miktarı % 10'un altında olacak şekilde yağ hazırlanarak 0,5 ml çözelti deri altına enjekte edildi. Uygulama gruplarına ise 0,5 ml çözelti içerisindeki ligand derişimi 25 mg/kg vücut ağırlığı dozunu ihtiva edecek şekilde hazırlanan çözeltiler deri altına enjekte edildi.

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezindeki (FÜDAM) ratlar, 22 ±2°C sıcaklıkta, %55 ±5 nisbi nem bulunan havalandırma sistemine sahip özel olarak hazırlanmış ve günlük altları temizlenen kafeslerde beslendi. 8 haftalık ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 30 adet *Rattus norvegicus* cinsi erkek ratlar kullanıldı. Bu amaçla, ratlar her grupta ortalama 5 hayvan bulunacak şekilde altı gruba ayrıldı. (i) AOM + (Yağ + DMSO) grubu: 15 mg/kg CA dozunda AOM enjeksiyonu yapılan grup; (ii) AOM + Cisplatin10 grubu (AOM + Cis10): (AOM) enjeksiyonu yapılan ve 10 mg/kg CA dozunda cisplatin verilen grup; (iii) AOM + Cisplatin15): (AOM) enjeksiyonu yapılan ve 15 mg/kg CA dozunda Cisplatin verilen grup; (iv) AOM + M-8, (AOM) enjeksiyonu yapılan ve 25 mg/kg CA dozunda M-8 bileşiği verilen grup; (v) (AOM) +M-9 grubu (AOM+ M-9): AOM enjeksiyonu yapılan ve 25 mg/kg CA dozunda M-9 bileşiği verilen grup, (vi) AOM + M-10 grubu (AOM+M-10): AOM enjeksiyonu yapılan ve 25 mg/kg

CA dozunda M-10 bileşiği verilen grup. Test edilecek maddeler DMSO’da çözüldülmesi sağlandıktan sonra mısır özü yağı ile seyreltildi. 25 mg/kg vücut ağırlığı dozuna göre hazırlanan maddeler hacmi 1mL olacak şekilde karışım yağ DMSO ve madde olacak şekilde ratlara subkutan enjeksiyonlarla uygulandı. Aynı oranda kontrol grubuna da DMSO içeren yağlı karışımdan yine 1 mL deri altı enjekte edildi. Çalışma altı ay sürdü.

AOM enjeksiyonu 3 defa (haftada bir kez) subkutan (derialtı) olarak yapıldı. AOM, ratlara 15 mg/kg canlı ağırlığı (CA) dozunda enjekte edildi (Thirupurasundari et al. 2009). Akabinde hayvanlarda tümör oluşumu incelemek için 5 ay beklenildi ve tümör oluşumu takip edildi. Her gruptan 2 hayvan kesilerek mikroskobik ve makroskobik olarak incelendi ve tümör oluşumu gözlemlendi. Daha sonra cisplatin (10 mg/kg CA), cisplatin (15 mg/kg CA) ve 4-Etil, 5-Tiyenil,1,2,4-Triazol (M-8), 4- Fenil, 5-Tiyenil, 1,2,4- Triazol (M-9), 4- Allil, 5-Tiyenil,1,2,4- Triazol (M-10)’ün tedavici edici etkisini belirlemek için kompleksler 25 mg/kg CA dozunda 1 ay boyunca 0., 3., 6. ve 9., günlerde hayvanlara deri altı olarak verildi.

Deneysel çalışma süresinde tüm veriler not edilerek ölen hayvanların patolojik incelemeleri yapılarak kaydedildi. Deneysel çalışma sonunda hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek kolorektal dokular alındı ve dokulardan bloklar ve kesitler hazırlanıp, hacmi, tümörün insidansı ve yayılımı histopatolojik olarak incelendi. Makroskobik tümörler alınıp %4’lük paraformaldehit solüsyonunda fiksle edilerek ışık mikroskobunda incelendi. Ayrıca antioksidan parametrelerin analizi için kan ve doku örnekleri alınarak analiz anına kadar -80°C’de saklandı.

3.7.1.2. *İn Vivo* Histopatolojik İnceleme

Ötenaziyi takiben karın boşluğu açılan sıçanlarda, rektum sınırından başlayarak 10 cm’lik kolon bölümünden 2’şer cm uzunluğunda alınan doku örnekleri, 48 saat %10’luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Bilinen klasik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 5 µm kalınlığında ve 300 µm’lik aralıklarla alınan seri kesitler Hematoxylin Eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

3.7.1.3. Doku Örneklerindeki Vitamin MDA Analizi

Parçalanmış yaklaşık 0,3 gr doku örneği üzerine 0,5 M HClO₄'den 1,5 mL ilave edildi. Proteinlerin çöktürülmesi sağlandıktan sonra 1,5 mL distile su ilave edilerek son hacim 3 mL'ye tamamlandı. Bu karışım 4500 devirde 25 dakika santrifüjlenerek akabinde üst kısımdaki berrak kısımdan dikkatlice alınarak viallere konuldu enjeksiyon hacmi 20 µL HPLC'de analizlendi (Karatepe 2004).

3.7.1.4. Doku Örneklerindeki Vitamin A ve Vitamin E Analizi

Doku örneklerindeki A ve E Vitamini Analizi için parçalanmış 0,3 gr doku örneği alınarak üzerine %1'lik H₂SO₄ ihtiva eden etil alkolden 4 mL ilave edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Elde edilen karışım vorteks ile iyice karıştırılarak homejen hale getirildi ve akabinde 4500 devirde 25 dakika süre ile santrifüjlendi. Daha sonra örnekler 0,3 mL n-hekzan üzerine ilave edildi. Karışıma hekzan ilavesiyle yağda çözünen vitaminler hekzan fazında ekstrakte edildi. Karışıma hekzan ilave edildikten sonra iyice homejen dağılması için tekrar vorteksde karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hekzan fazı hassas bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Kalan kısım üzerine tekrar 0,3 mL n-hekzan eklenerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hekzan fazı cam tüpteki hekzan fazı ile birleştirildi. Hekzan, kuru azot altında yavaş ve dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan kalıntı 100 µL metanolde çözüldü (Çetinkaya vd. 1991). Bu çözeltiden 20 µL alınıp HPLC'ye enjekte edildi.

3.7.1.5. Kan Örneklerindeki Vitamin MDA Analizi

Hazırlanan serum örneğinden 0,3 ml alınıp üzerine 0,5 M HClO₄ den 0,3 ml ilave edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Akabinde karışım vortekslelendikten sonra üzerine distile su ilave edilerek son hacim 1 mL tamamlandı. Daha sonra karışım 15 dakika santrifüjlendikten (2500 devir /dak) sonra örneklerin üzerindeki berrak kısımdan 20µl alınarak HPLC'de analiz edildi. MDA ve askorbik asit, HPLC'de analiz edildi. Analizler hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (%82,5 – 17,5; pH:4) karışımında 250 nm'de inertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu kullanılarak akış hızı ml/dk yapıldı (Karatepe 2004).

3.7.1.6. Kan Örneklerindeki Vitamin A ve Vitamin E Analizi

Serum örnekleri derin dondurucudan alındıktan sonra çözündürme işlemi yapıldı daha sonra 0,3 ml serum %1'lik H₂SO₄ ihtiva eden etil alkolden 0,3 ml ilave edilerek proteinler çöktürülmesi sağlandı. Daha sonra karışım 2500 devirde 5 dakika vortekslendikten sonra santrifüjlendi. Akabinde örnekler üzerine 250 µl n-hegzan eklendi. Karışıma hegzan ilavesiyle ortamda bulunan yağda çözünen vitaminler hegzan fazına geçti. Hekzan ilave edildikten sonra tekrar içe vortekste karıştırıldı ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hegzan ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine 250 µl n- hegzan eklenerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hegzan fazı cam tüpteki hegzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hegzan, kuru azot altında hata getirmeyecek şekilde uzaklaştırıldı. Kalan kalıntı 100 µl metanolde çözüldü. HPLC'de analiz edildi. Örneklerdeki E Vitamini 296 nm ve A Vitamini 326 nm dalga boyunda İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu ve kloroform: metanol: diklormetan: asetonitril: hegzan (60: 10: 15: 10: 5) fazında akış hızı dakikada 1 mL olacak şekilde analizlendi (Catignani 1983; Henning et al. 1997).

3.8. İstatistiksel Analiz

Grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi yapıldı. Varyansların homojenliği, Levene testi ile analiz edildi. Tek yönlü varyans analizi sonrası varyansların homojen olmadığı gözlemlendi ve çoklu karşılaştırmalar için Tamhane T2 testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler, antitümör özellik için One-way Anova analizi, Tukey testi yapıldı. Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler IBM SPSS İstatistik, Version 22,0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

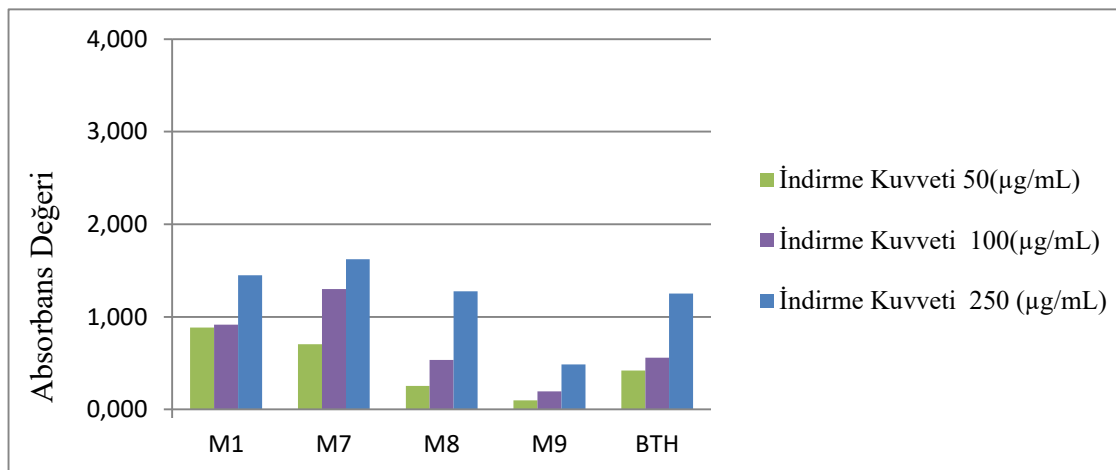
4.1. *İn Vitro* Antioksidan Aktivite Ölçümleri

4.1.1. İndirgeme Kuvveti Tayini Bulguları

Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi, o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir indikatörü olarak bilinir (Niki 1991). İndirgeme kuvveti her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/mL'lerinin içinde bulunduğu çözeltilerinin 700 nm'de absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgulara Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Test bileşikleri ve standart antioksidanın indirgeme kuvveti sonuçları

Test Bileşikleri	İndirme Kuvveti 50 (µg/mL)	İndirme Kuvveti 100 (µg/mL)	İndirme Kuvveti 250 (µg/mL)
M1	0,884	0,917	1,450
M7	0,704	1,302	1,624
M8	0,255	0,535	1,275
M9	0,097	0,197	0,485
BHT	0,420	0,560	1,251



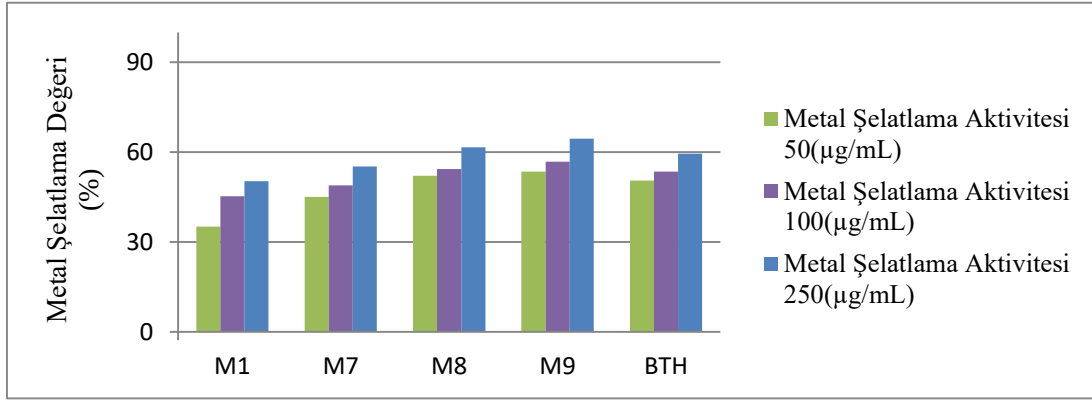
Şekil 4.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı indirgeme kuvveti grafikleri

4.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini Bulguları

Bir maddenin metal şelatlama aktivitesi, lipid peroksidasyonuna sebep olan metalleri etkisiz hale getirme gücünü gösterdiği için önemlidir (Kandepu 1999). Test bileşikleri veya standart antioksidantların varlığında ferrozin-Fe⁺² kompleksi, tam meydana gelmez. Bu durum kullanılan bileşiklerin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir. Metal şelatlama aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen BHT örneklerinin 562 nm’de absorbansları alınmış ve tutuklanan metalin yüzdesi hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanın metal şelatlama yüzdeleri

Test Bileşikleri	Metal Şelatlama Aktivitesi 50 (µg/mL)	Metal Şelatlama Aktivitesi 100 (µg/mL)	Metal Şelatlama Aktivitesi 250 (µg/mL)
M1	35,13	45,29	50,3
M7	45,04	48,85	55,21
M8	52,05	54,35	61,63
M9	53,44	56,84	64,45
Kontrol (BHT)	50,45	53,48	59,5



Şekil 4.2. Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Kimyasalların antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 4.3'te görülmektedir. Çalışılan örneklerin antimikrobiyal aktivite değerleri 0,1 mg/mL veya daha düşük olduğunda önemli, $0,1 < MIC \leq 0,625$ mg/mL aralığında orta derecede etkili ve MIC değeri 0,625 mg/ml'den fazla olduğunda zayıf etkili olarak bildirilmektedir (Kuete 2010; Awouafack et al. 2013). Bu çalışmada denediğimiz triazol bileşiklerinin MIC değerleri 15,625 mg/mL'dan daha büyük ve genel olarak $>125 \mu\text{M}$ olarak elde edilmiştir. Bu durumda triazol bileşiklerimizin denediğimiz mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

Tablo 4.3. Test bileşiklerin antifungal ve antimikrobiyal aktivite sonuçları

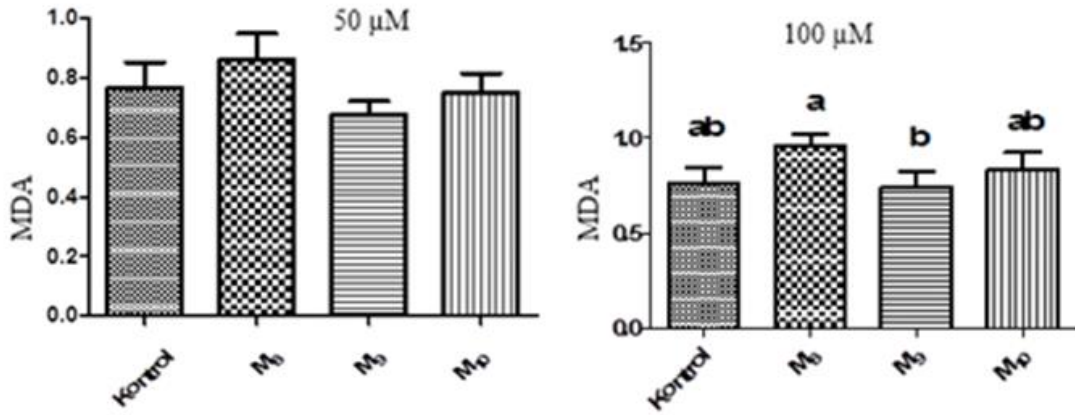
Bileşik kodları	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
M-1	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-2	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-3	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-4	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-5	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-6	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-7	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-8	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-9	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$
M-10	$>125 \mu\text{M}$	$>125 \mu\text{M}$

4.3. *Saccharomyces cerevisiae* Örneklerindeki MDA Düzeyleri

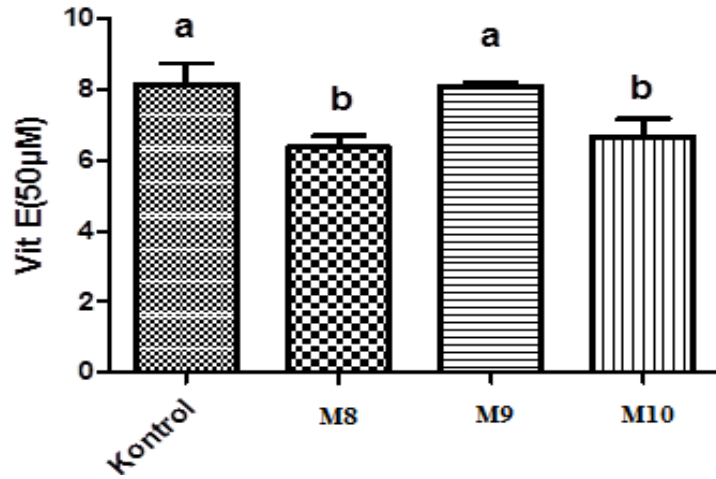
Test maddeleriyle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin belirli MDA, Vitamin A, E düzeylerine ait sonuçlar Tablo 4.4 ve şekil 4.3 – Şekil 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.4. Bileşiklerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA, Vitamin A ve Vitamin E değerleri

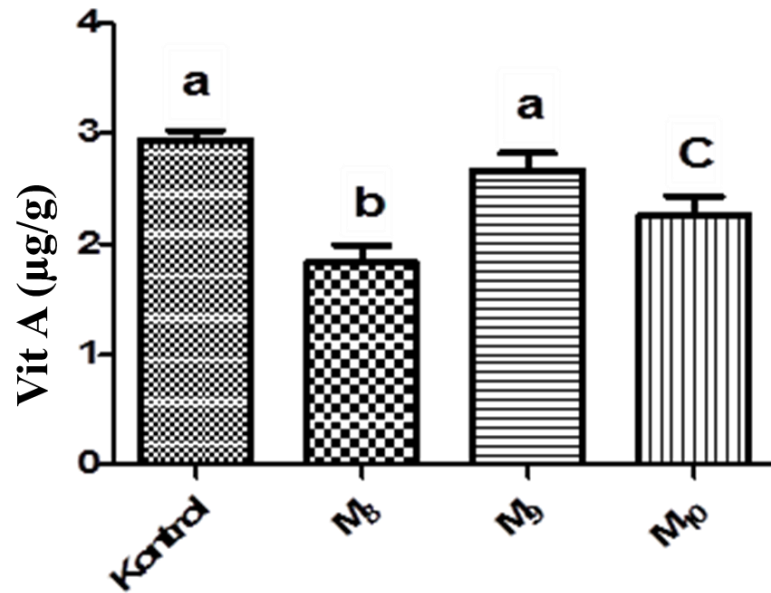
	Kontrol	M-8	M-9	M-10	P değeri
MDA 50 μ M (mg/2.10 ⁶ hücre)	0,76 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,04	>0.05
MDA 100 μ M (mg/2.10 ⁶ hücre)	0,76 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,03 ^a	0,74 $\pm$ 0,04 ^b	0,83 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,01
Vit E 50 μ M (mg/2.10 ⁶ hücre)	8,15 $\pm$ 0,35 ^a	6,36 $\pm$ 0,19 ^b	8,09 $\pm$ 0,06 ^a	6,67 $\pm$ 0,29 ^b	0,001
Vit A 50 μ M (mg/2.10 ⁶ hücre)	2,94 $\pm$ 0,05 ^a	1,83 $\pm$ 0,09 ^b	2,67 $\pm$ 0,09 ^a	2,26 $\pm$ 0,09 ^c	0,0001



Şekil 4.3. Triazol bileşikleriyle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin MDA düzeyleri grafiği



Şekil 4.4. Bileşiklerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin Vitamin E değerleri



Şekil 4.5. Bileşiklerle muamele edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin Vitamin A düzeyleri

4.4. İn Vivo Antioksidan Aktivite Ölçümleri

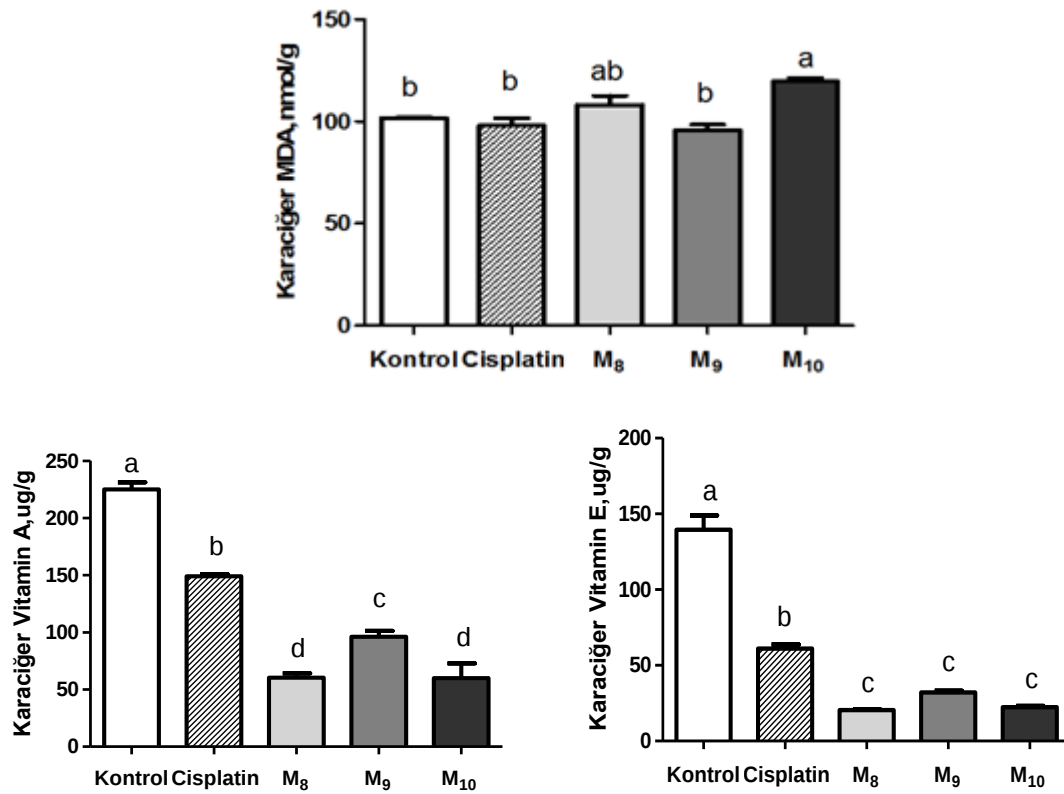
4.4.1. Karaciğer Dokusundaki A Vitamini, E Vitamini ve MDA Düzeyleri

Test bileşikleri uygulanmış ratlara ait karaciğer dokusunda A Vitamini, E Vitamini ve MDA düzeylerini gösteren sonuçlar aşağıda Tablo 4.5 ve şekil 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.5. Bileşiklerle muamele sonrası rat karaciğer dokularında A Vitamini, E Vitamini ve MDA düzeyleri

	Gruplar					
	Kontrol	Cisplatin	M-8	M-9	M-10	P değeri
Karaciğer MDA	101,7±0,43 ^b	98,05±3,56 ^b	108,2±4,42 ^{ab}	95,71±2,80 ^b	119,6±1,03 ^a	0,01
Karaciğer Vit A	225,0±6,22 ^a	149,1±1,67 ^b	60,40±3,81 ^d	96,13±5,20 ^c	59,95±7,50 ^d	0,0001
Karaciğer Vit E	139,5±9,35 ^a	60,95±2,78 ^b	20,45±0,46 ^c	32,04±1,19 ^c	22,29±0,52 ^c	0,0001

a-d Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Veriler ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur



Şekil 4.6. Karaciğer dokusundaki Vitamin A, E ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri

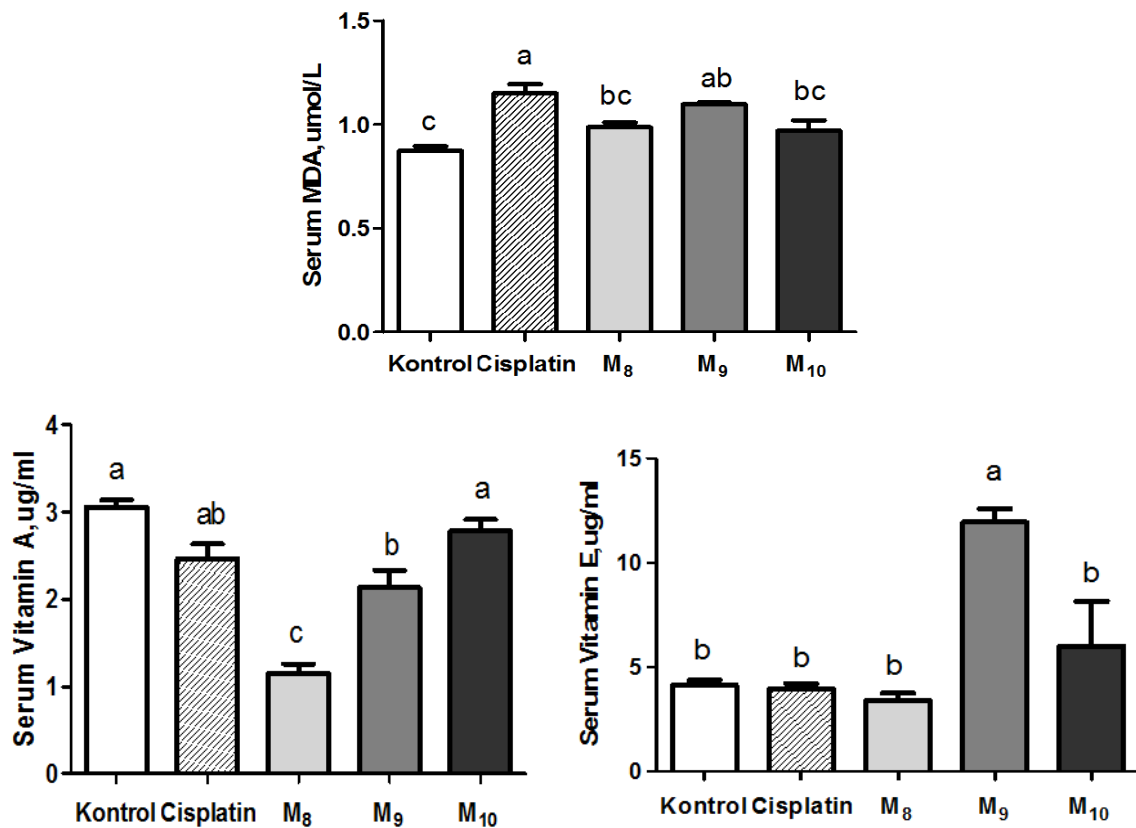
4.4.2. Serum Örneklerindeki A Vitamini, E Vitamini ve MDA Düzeyleri

Çalışmamızdaki triazol bileşiklerinin uygulandığı rat serum örneklerinde Vitamin A, Vitamin E ve MDA düzeylerini gösteren sonuçlar aşağıda Tablo 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.6. Bileşiklerle muamele sonrası rat serum örneklerindeki A, E Vitamini ve MDA düzeyleri

	Gruplar					
	Kontrol	Cisplatin	M-8	M-9	M-10	P değeri
Serum MDA	0,87±0,02 ^c	1,15±0,04 ^a	0,99±0,02 ^{bc}	1,10±0,09 ^{ab}	0,97±0,03 ^{bc}	0,001
Serum Vit A	3,06±0,08 ^a	2,46±0,17 ^{ab}	1,15±0,11 ^c	2,13±0,20 ^b	2,79±0,07 ^a	0,0001
Serum Vit E	4,15±0,23 ^b	3,98±0,23 ^b	3,40±0,37 ^b	11,95±0,65 ^a	6,02±1,23 ^b	0,0001

a-d Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Veriler ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur.



Şekil 4.7. Bileşiklerle muamele sonrası kan serum örneklerindeki A, E Vitaminleri ve MDA düzeylerinin istatistiksel grafikleri

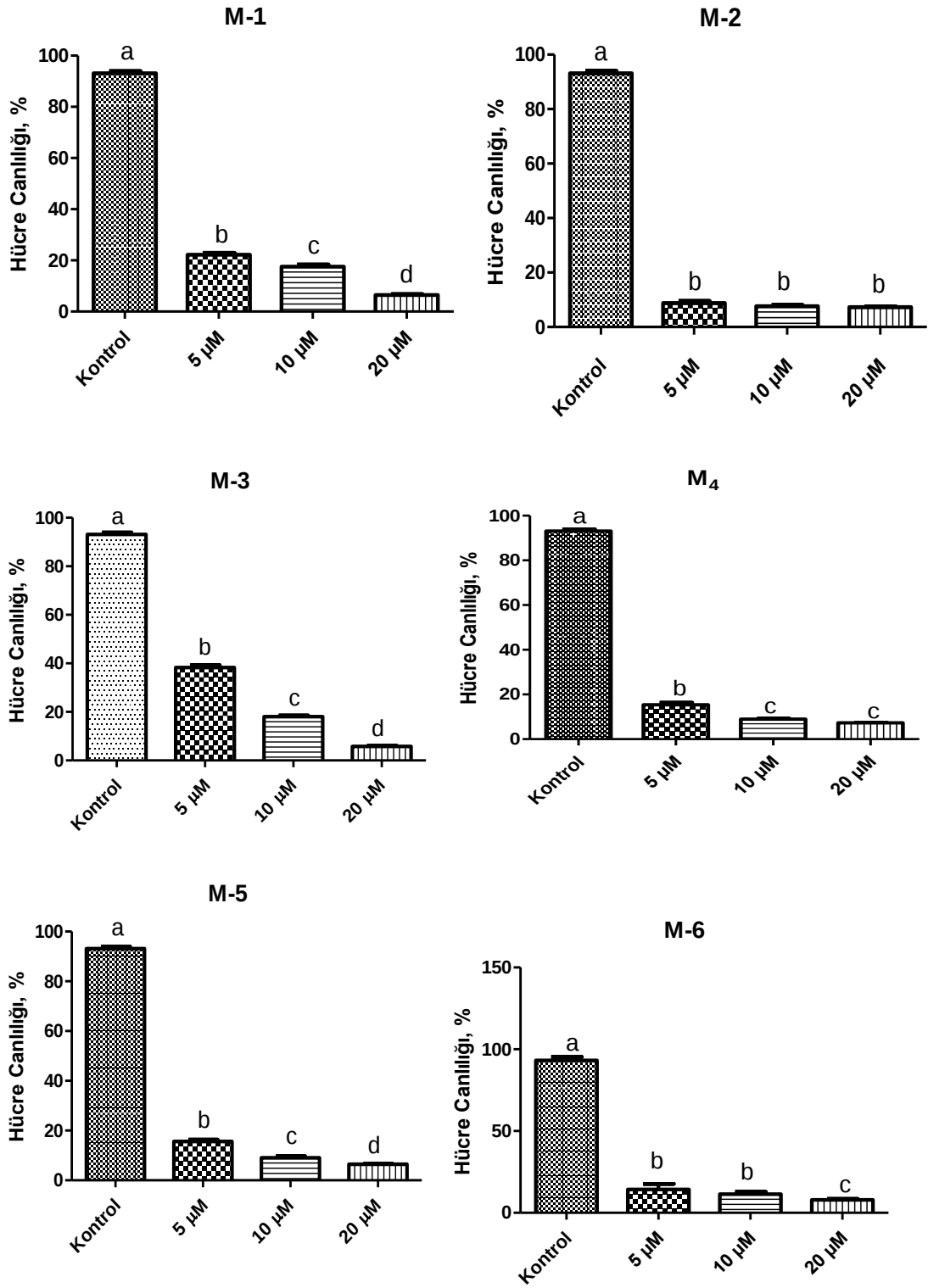
4.5. *In vitro* Antitümör Özelliklerin Araştırılması

HT 29 (insan kolon kanseri) hücrelerinin, triazol bileşikleriyle etkileşimi sonucunda elde edilen deneysel bulgular, deney grubu ve kontrol grubunun kıyaslamalarını gösterecek şekilde Tablo ve şekiller halinde verildi (Tablo 4.7 ve Şekil 4.8).

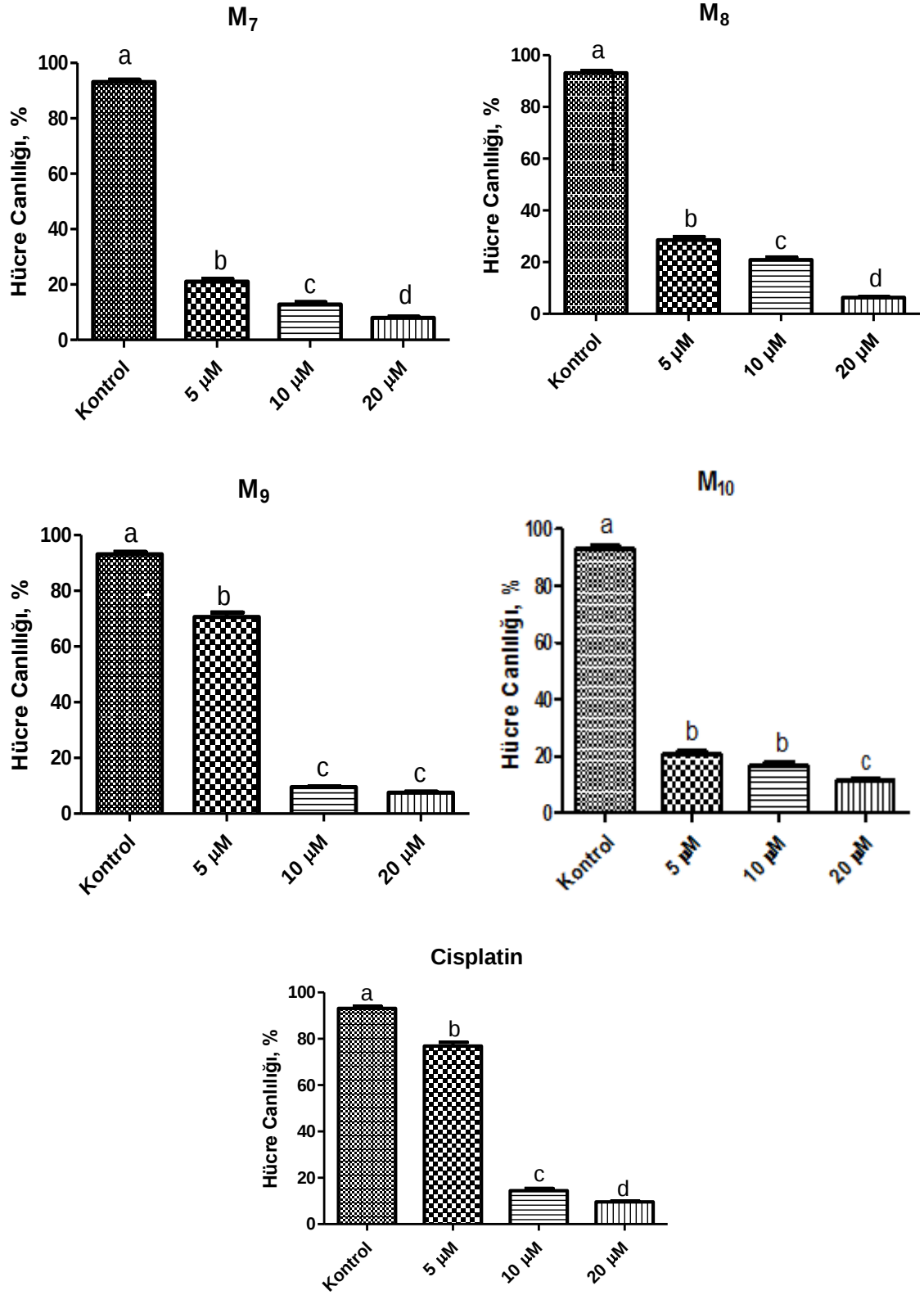
Tablo 4.7. Test maddeleri ile HT 29 (insan kolon kanseri) hücreleri doza göre etkileşimi ve yüzde oranında canlılık durumları

Hücre Canlılığı	Gruplar				P değeri
	Kontrol	5 µM	10 µM	20 µM	
M-1	93,14±0,78 ^a	22,21±0,78 ^b	17,58±0,76 ^c	6,44±0,36 ^d	0,0001
M-2	93,14±0,78 ^a	8,80±0,70 ^b	7,65±0,41 ^b	7,33±0,25 ^b	0,0001
M-3	93,14±0,78 ^a	38,30±0,97 ^b	18,03±0,49 ^c	5,80±0,33 ^d	0,0001
M-4	93,14±0,78 ^a	15,36±1,04 ^b	8,93±0,31 ^c	7,26±0,20 ^c	0,0001
M-5	93,14±0,78 ^a	15,64±0,77 ^b	9,03±0,68 ^c	6,42±0,23 ^d	0,0001
M-6	93,14±0,78 ^a	14,27±1,21 ^b	11,40±0,50 ^b	7,98±0,20 ^c	0,0001
M-7	93,14±0,78 ^a	21,01±1,05 ^b	12,82±0,78 ^c	7,99±0,43 ^d	0,0001
M-8	93,14±0,78 ^a	28,50±1,27 ^b	20,89±0,99 ^c	6,26±0,25 ^d	0,0001
M-9	93,14±0,78 ^a	70,60±1,63 ^b	9,54±0,26 ^c	7,55±0,28 ^c	0,0001
M-10	93,14±0,78 ^a	20,73±1,35 ^b	16,92±1,17 ^b	11,60±0,60 ^c	0,0001
Cisplatin	93,14±0,78 ^a	76,88±1,64 ^b	14,44±0,93 ^c	9,65±0,33 ^d	0,0001

a-d Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark $P < 0.05$ seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Veriler ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur



Grafiklerin devamı diğer sayfada



Şekil 4.8. Triazol bileşikleri ile muamele sonrası HT 29 (insan kolon kanseri) hücrelerinin doza göre % oranında canlılık durumlarının istatistiksel grafikleri

4.6. *In Vivo* Antitümoral Aktivite ve Histopatolojik Bulgular

Deney süresinin bitiminde sıçanlar, ketamin-xylazine (50 mg/kg-15 mg/kg) anestezi ile öldürüldü. Daha sonra abdominal kavite açılarak kolon mukozasında kitle oluşumu incelendi (Tablo 4.8). Pozitif kontrol (Yağ+DMSO) grubunda 2 hayvanda, makroskopik olarak kolon mukozasında kitleye rastlandı. Lezyonların proksimal ve distal kolona yerleştikleri ve daha çok polip tarzında oldukları gözlemlendi (Tablo 4.8). (Şekil 4.9). M-8, M-9, M-10 ve Cisplatin tedavi gruplarında kolon mukozasında herhangi bir kitle oluşumu gözlenmedi. Kontrol grubu ratları ve triazol bileşikleriyle cis platin bileşikleriyle uygulanan rat doku örneklerinden hazırlanan ışık mikroskopisi resimleri ise Şekil 4.10-4.17 arasında verilmiştir.

Tablo 4.8. Deneme gruplarında makroskopik ve mikroskopik lezyonların dağılımı

Gruplar	n	Makroskopik Kitle sayısı	Oluşum Yeri P O D*	Hafif displazi	Şiddetli displazi	Kötü huylu tümoral lezyon	Toplam lezyon
Yağ+DMSO	5	2	1 - 1	9	2	4	15
C10	5	-	- - -	7	-	-	7
C15	4	-	- - -	4	1	-	5
M-8	5	-	- - -	9	-	-	9
M-9	5	-	- - -	7	-	-	7
M10	5	-	- - -	9	-	-	9

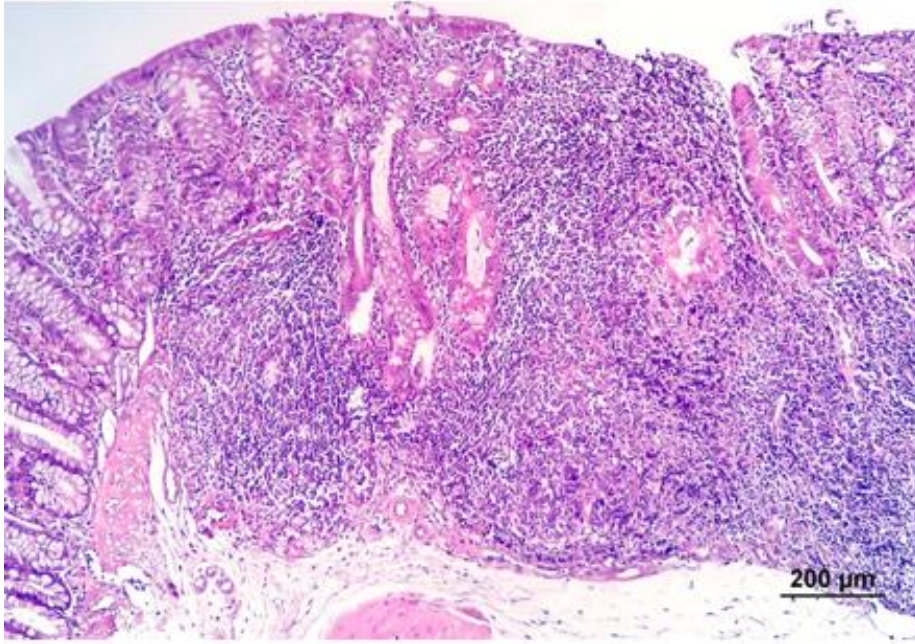
P O D* : Proksimal, Orta ve Distal Kolon



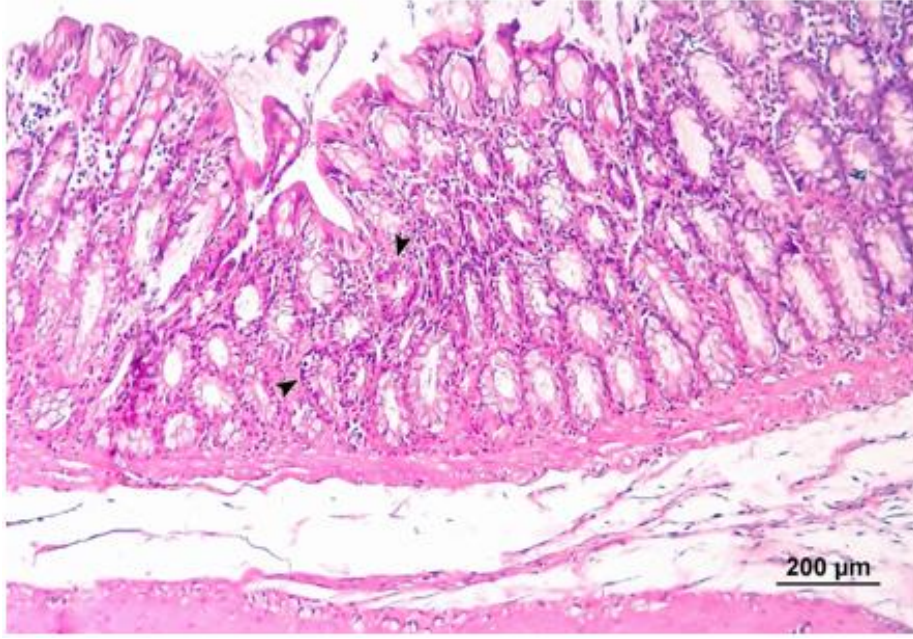
Şekil 4.9. Distal Kolon mukozasındaki kitlenin makroskopik görünümü



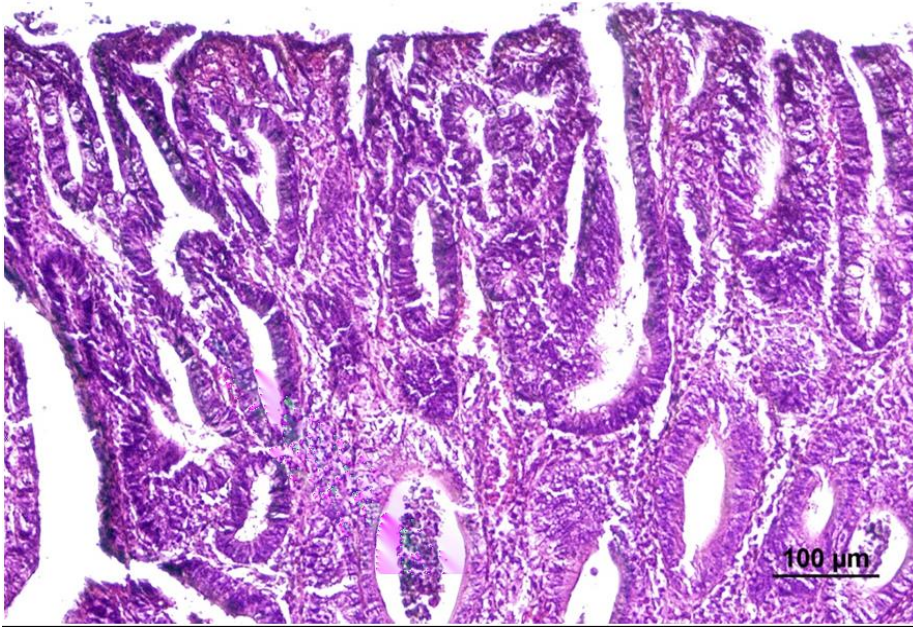
Şekil 4.10. Kontrol grubu ratlarında kolon histolojisinin görünümü, HE x 50



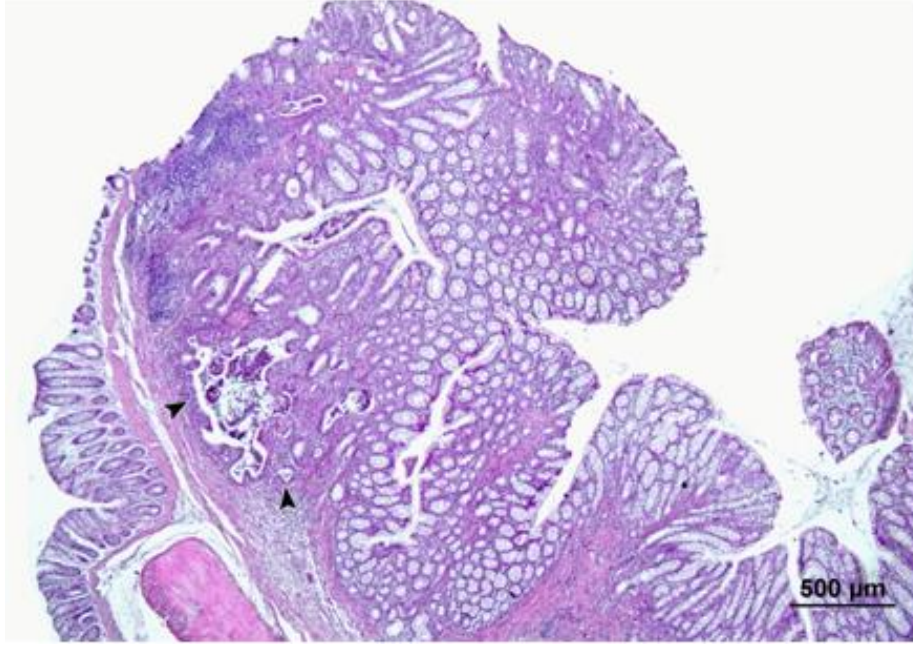
Şekil 4.11. M8 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kolon epitelinde hafif şiddette displazinin görünümü, HE x 50



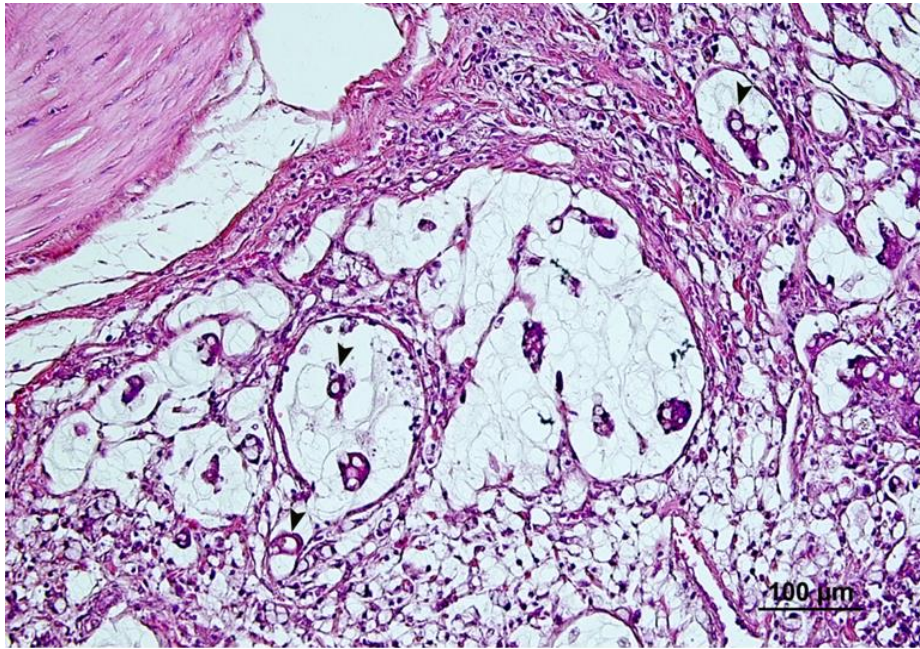
Şekil 4.12. M9 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kript epitelinde hafif displazi (ok başları), HE x 50



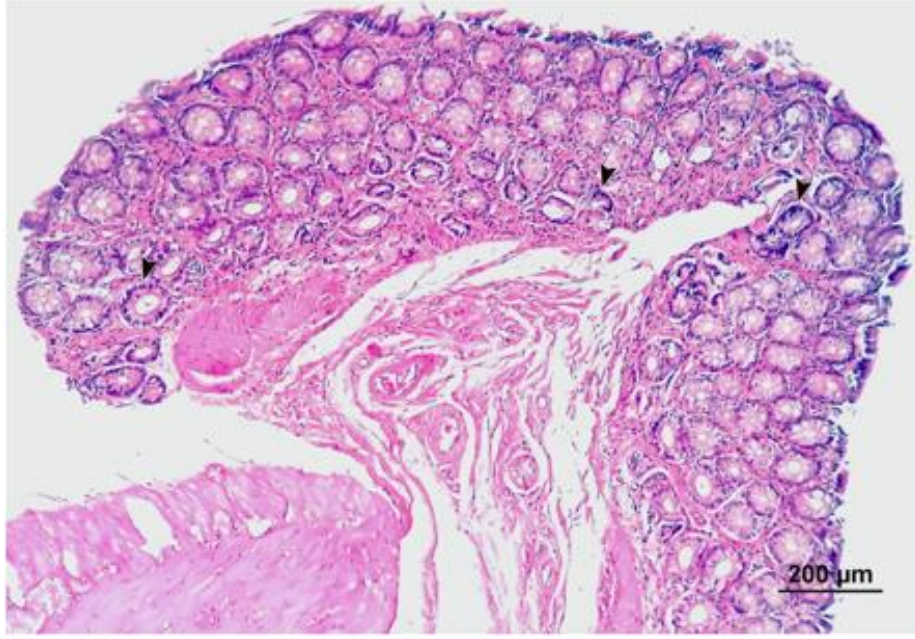
Şekil 4.13. Cis 15 bileşiği uygulanan rat grubunda kolon mukozasında şiddetli displazi, HE x 100



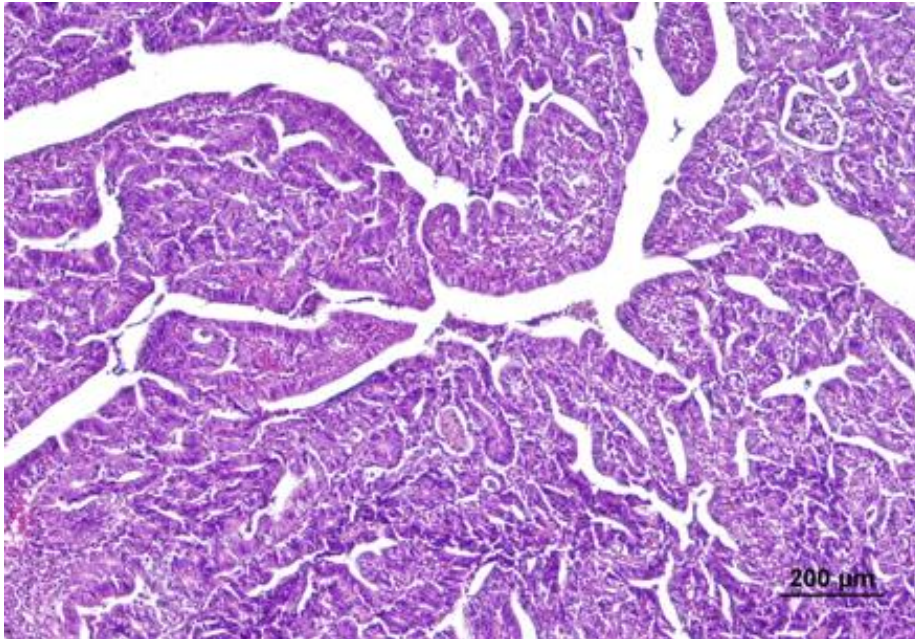
Şekil 4.14. Yağ+DMSO uygulanan grupta; submukozal bölgeye invazyon gösteren adenokarsinom, HE x 20



Şekil 4.15. Yağ+DMSO grubunda submukozal yerleşim gösteren, taşlı yüzük formunda (ok başı) musinöz adenokarsinoma, HE x 100



Şekil 4.16. M10 triazol bileşiği uygulanan rat grubunda kolon mukozasında hafif displazi, bez epiteli çekirdeğinde büyüme ve hiperkromazi (ok başları) HE x 50



Şekil 4.17. Yağ + DMSO grubunda diferansiye adenokarsinom; hiperkromatik çekirdeğe sahip atipik epitel ile döşeli glandüler yapıların görünümü, HE x 50

5. TARTIŞMA

Biyomoleküllerin bozunmasını geciktiren veya engelleyen eksojen ve endojen antioksidanlarla çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve canlıya olumsuz yönde etkilemeyen antioksidan özellik gösteren doğal olmayan bileşiklerin, üretimi ve bunların biyolojik sistemler üzerindeki etkileri her geçen gün artarak araştırılmaktadır (Hussain et al. 2003; McClements and Decker 2000; Hussain et al. 2013).

Son yıllarda insanların durağan yaşantı tarzı, betonarme yapıların çoğalması, doğal yaşam alanlarının azalması, doğal olan yiyeceklerin tüketiminin azalması, yiyecek ve içeceklerin genetiğinin değiştirilmesi, bunlarla birlikte çağımızda devamlı strese maruz kalma neticesinde, maruz kalınan oksidatif stres düzeyleri de artmaktadır. Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar, serbest radikallerin yeni, farklı ve çeşitli türden hastalıkların ortaya çıkması ve hastalığın gelişimi üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Bireysel olarak maruz kalınan oksidatif stresi azaltacak çeşitli yöntemlerin bulunması ve bu amaçla kullanılabilecek antioksidan nitelikli sentetik veya doğal bileşiklerin laboratuvar koşullarında sentezlenmesi bu bağlamda ilgi çeken konuların başında gelmektedir.

Triazol bileşiklerinin antioksidan, antitumor, antimikrobiyal, enzim inhibitörü, antihipertansif, antitüberküloz, antiinflamatuvar ve antidepresan gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Reitz 1994; Young et al. 2003; Donnelly 2004; Upanhayaya et al. 2004; Ünver vd. 2010; Sancak vd. 2010; Ünver vd. 2011). Oldukça geniş farmakolojik özelliklere sahip olmaları nedeniyle triazol bileşikleri farmasötik kimya, organik kimya ve biyokimyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tez çalışmamızda Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde sentezlenmiş ve karakterize edilmiş olan 10 adet triazol bileşiğinin çeşitli biyolojik özelliklerinin araştırılması *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çeşitli biyokimyasal etkinliklerinin belirlenmesinin önemli bir çalışma olacağı düşünülmüştür.

Tez kapsamında bu 10 adet triazol bileşiğinin farklı yöntemler kullanılarak *in vitro* ve *in*

vivo antitümör, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerindeki etkileri deneysel çalışmalarla araştırılmıştır.

İndirgeme kuvvetleri,

M1- M10 olarak kodladığımız triazol bileşiklerin 50 µg/mL konsantrasyona göre indirgeme kuvveti kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır; $M7 > M1 > BHT > M8 > M9$. 100 µg/mL konsantrasyona göre ise; $M7 > M1 > BHT > M8 > M9$. 250 µg/mL konsantrasyona göre indirgeme kuvveti kapasiteleri sıralaması da $M7 > M1 > BHT > M8 > M9$ şeklinde değişebilen indirgeme kapasitesine sahip oldukları görülmektedir. M7 triazol bileşiğimizin tüm konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bileşikler kendi aralarında oranlandığında en düşük indirgeme aktivitesi gösteren bileşiğin M9 olduğu verilerden anlaşılmaktadır. Her bir bileşik kendi içinde, artan konsantrasyonuna bağlı olarak aktivite artışları da göstermektedir.

Standart antioksidan olan BHT ile kıyaslandıklarında ise, 50 µg/mL, 100µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanan M7 ve M1 triazol bileşiklerinin, standart olarak kullanılan antioksidan olan BHT bileşiğinin indirgeme kapasitesinden daha yüksek bir indirgeme kapasitesine sahip oldukları görülmektedir. Buna göre, M7 ve M1 bileşiklerinin iyi derecede indirgeme kuvvetine sahip oldukları söylenebilir. Literatürde yapılan çalışma sonuçları incelendiğinde çalışmamızla uyum gösteren 1,2,4-triazol halkası içeren aminometil türevlerinin antioksidan etkisi olduğunu ortaya koyan bilimsel çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada, bazı triazol halkası taşıyan aminometil bileşiklerinin belirli derişimlerde indirgeyici özellikleri karşılaştırılmış ve bileşiklerin standart antioksidanlardan daha düşük indirgeme kapasiteleri sergiledikleri ama 4-nitrobenzoksi yapısını ihtiva eden 1,2,4-triazol bileşiğinin antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Gürsoy et al. 2014). Yapılan benzer başka bir bilimsel çalışmada 3-alkil(aril)-4-(4benzensulfoniloksibenzilidenamino)-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiğinin iyi indirgeyici aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Tomruk vd. 2010; Karatepe vd. 2010).

Metal şelatlama aktivitesi,

M1- M10 olarak kodladığımız triazol bileşiklerin 50 µg/mL konsantrasyona göre metal

şelatlama aktivitesi şu şekilde sıralanmıştır; $M9 > M8 > BHT > M7 > M1$. 100µg/mL konsantrasyona göre ise; $M9 > M8 > BHT > M7 > M1$. En yüksek konsantrasyon olan 250 µg/mL değerlerinde ise, metal şelatlama aktivitesi $M9 > M8 > BHT > M7 > M1$ şeklinde sıralanmıştır. Bileşiklerin metal şelatlama aktiviteleri artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. 250 µg/mL’lik konsantrasyonda BHT standart antioksidanına göre M9 ve M8 test bileşikleri daha yüksek metal şelatlama aktiviteleri göstermiştir. M7 ve M1 maddelerinin metal şelatlama aktivitelerinin düşük olduğu belirlenmiştir. 250 µg/mL konsantrasyon deneylerinde BHT standart antioksidanına göre M8 ve M9 test bileşiklerinin daha yüksek aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde çalışmamızla uyum gösteren, triazollerin antioksidan etkilerini ortaya koyan metal şelatlama aktivitesi çalışmaları mevcuttur.

Örneğin yapılan bir çalışmada, 3-alkil(aril)-4-formilamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on bileşiği sentezlenerek antioksidan aktivitesi incelenmiş ve metal şelatlama aktivitelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Yüksek vd. 2010). Yapılan başka bir bilimsel çalışmada, özellikle $CH_2C_6H_5$, $CH_2C_6H_4.CH_3$ (p-), siklopropil yapıları bulunduran bileşiklerin anlamlı olarak, standart antioksidanlardan daha iyi metal şelatlama aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir (Gürsoy 2014). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler de literatürdeki yapılan bu çalışmaları destekler nitelikte olup 1,2,4-triazol türevlerinin şelatör aktivitelerini ortaya koymuştur. Bununla birlikte triazollerin antioksidan özelliklerinin bulunduğunu kanıtlayan, tezimizde çalıştığımız yöntemlerden farklı metot kullanmış olan çok sayıda çalışmada mevcuttur (Kuş vd. 2004; Ayhan-Kilcigil vd. 2005; Alkan vd. 2008; Kuş vd. 2008; Ul-Haq et al. 2008; Tumosienė et al. 2009; Khan et al. 2010; Diwedi et al. 2011; Hanif et al. 2012; Birinci 2013; Aswathanarayanappa et al. 2013; Nadeem et al. 2013; Koparir vd. 2013; Kol et al. 2014; Düğdü 2014; El Sadek et al.2014; Kol et al. 2014).

Antimikrobiyal aktivite,

Enterococcus faecalis bakterisi ve bir fungal suş *Candida albicans* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Kimyasalların MIC değerleri, $> 125 \mu M$ aralığında bulunmasından dolayı triazol bileşiklerimizin *E.faecalis* ve *C.albicans* üzerinde etkili olmadığını söyleyebiliriz. Nitekim denediğimiz triazol bileşiklerinin MIC değerleri 15.625 mg/mL’den daha büyük ve genel olarak $>125 \mu M$ olarak elde edilmiştir. Bu durumda triazol bileşiklerimizin

denediğimiz mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

Saccharomyces cerevisiae hücrelerindeki MDA düzeyleri,

İki farklı konsantrasyon (50 μ M ve 100 μ M) üzerinden yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, M-8 kodlu triazol bileşiğinin her iki konsantrasyon da kontrole göre anlamlı şekilde MDA düzeyini artırdığı belirlenmiştir. Bu durum M-8 bileşiğinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. Bundan dolayı M-8 bileşiğimiz antioksidan etki göstermediğini söyleyebiliriz. M-9 kodlu triazol bileşiğimiz ise kontrole göre anlamlı şekilde MDA düzeyini düşürmüştür. Bu durumda M9 triazol bileşiğinin antioksidan potansiyelinin bulunduğu yorumu yapılabilir. M-10 kodlu triazol test maddemiz ise 50 μ M konsantrasyonda MDA düzeyini sayısal olarak azaltmış olmasına rağmen anlamlı değildir.

Diğer taraftan M-8 ve M-10 triazol bileşiklerimizin *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerindeki **Vitamin E düzeyini**, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı görülmektedir. Bundan dolayı antioksidan özellik göstermediği yorumu yapılabilir. M-9 kodlu triazol bileşiğimiz ise kontrole göre kıyaslandığın Vitamin E üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Ayrıca M-8, M-10 triazol bileşiklerinin *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine uygulanması sonrasında, maya hücrelerinde Vitamin A üzerindeki etkisi incelendiğinde, M-8 ve M-10 kodlu triazol bileşiklerinin kontrole göre anlamlı şekilde **Vitamin A** düzeyini azalttığı görülmektedir. M-9 test maddemiz ise kontrole göre kıyaslandığında maya hücrelerinde Vitamin A üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri üzerinde M-8, M-9, M-10 bileşiklerinin Vitamin A ve Vitamin E üzerindeki sonuçları benzerlik göstermiştir.

Mevcut literatürlere göre, lipid peroksidasyonu konusunda yapılan çalışmalar sonuçlarımızı kısmen destekler yöndedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, iki tür difenil alkil piperazin türevi bileşiklerin oksidatif hasar sonrası oluşan lipid peroksidasyonuna karşı inhibe edici aktiviteleri bildirilmiştir (Yao et al. 2000).

Başka bir çalışmada 1,2,4 triazol türevli bileşiklerin MDA düzeyini azalttığı rapor edilmiştir (Nagaraja et al. 2014).

Yapılan diğerk bir çalışma da ise, triazol dışında bazı Schiff bazı türevlerinin MDA'yı düşürdüğüne dair sonuçlara rastlanmıştır (Keleştemur vd. 2010; Genç vd. 2014; Kırbağ karatepe 2008).

In vivo antioksidan aktivite,

Kullandığımız triazol bileşiklerinin ratlarda karaciğerk dokularında ve kan örneklerinde lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ve bu dokulardaki antioksidan vitaminler olan Vitamin A ve E miktarını etkiledikleri görülmektedir. Triazol bileşiklerimizin, **karaciğerk dokusunda Vitamin A, E ve MDA zerindeki etkilerine bakıldığı zaman**, M-8 ve M-10 triazol bileşiklerinin MDA düzeyini anlamlı şekilde artırdığı ve M-9 bileşiğimizin ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile matematiksel olarak belirgin bir değerde olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde M-8 ve M-10 bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna neden olduğu, M-9 bileşiğinin ise lipit peroksidasyonuna etkisinin olmadığı söylenebilir. Diğerk taraftan karaciğerk dokusunda, M-8, M-9 ve M-10 triazol bileşiklerimizin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak Vitamin A ve Vitamin E değerlerini ($P < 0,05$) düşürdüğü görülmektedir. Literatürlere göre yapılan çalışmalar incelendiğinde bizim kullandığımız *in vivo* metot ile karşılaştırma yapılacak bir çalışmaya raslanmamakla birlikte kullandığımız bileşiklerin türevlerine ait çalışmalar vardır. Örneğin yapılan bir çalışmada, köpek beyin homojenatlarında iki çeşit difenil allkil piperazin türevi bileşik oksidatif hasar sonrası meydana gelen lipid peroksidasyonuna karşı inhibe edici aktiviteleri rapor edilmiştir (Yao et al. 2000). Yapılan başka bir çalışmada ise, serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyinde artmaya, E Vitamini düzeyinde ise azalmaya sebep olduğu rapor edilmiştir (Diplock et al. 1991; Bott et al. 1991; Novelli et al. 1997).

Ratlarda serum örneklerinde A, E Vitamini ve MDA zerine triazol bileşiklerinin etkilerine bakıldığı zaman, Vitamin A düzeyinin, M-8 ve M-9 kodlu triazol bileşiklerinin uygulandığı rat gruplarında anlamlı şekilde düşüş gösterdiği, M-10 bileşiğinin uygulandığı grupta ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile matematiksel olarak düşük değerde olduğu bulunmuştur. Diğerk taraftan kontrol grubu ile kıyaslandığında M-9 bileşiğinin uygulandığı rat grubunda, Vitamin E değerinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı görülmektedir. M-10 bileşiğinin uygulandığı grupta ise istatistiksel

olarak anlamlı olmasa bile, matematiksel olarak yüksek değerde Vitamin E değeri bulunmuştur. Rat gruplarında serumdaki MDA sonuçlarına göre M-8, M-9 ve M-10 bileşiklerinin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde MDA değerini artırdığı belirlenmiştir.

İn vitro antitümör aktivite,

Triazol bileşiklerimizin HT 29 (insan kolon kanseri) hücreleri üzerinde etki göstererek kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde, kanserli hücreleri yok ettiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu çalışmada, test bileşikleri üç farklı konsantrasyon (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) üzerinden hücre kültürlerine uygulanmıştır. M-1, M-3, M-5, M-7, M-8 kodlu triazol bileşiklerinin her konsantrasyon grubunda hücreler üzerinde farklı aktiviteler gösterdikleri ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçların olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Genel olarak elde edilen sonuçlara göre kullandığımız triazol bileşiklerinin, yüksek derişimlerinin kanserli hücreleri yok etmede daha etkili olduğu söylenebilir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmamızı destekleyen 4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on halkasına sahip benzer tip heterohalkalı bileşiklerin antitümör özellik gösterdikleri bilinmektedir (Yüksek vd. 1997; İkizler vd. 1998; Yüksek vd. 2006). Diğer bir çalışmada ise MCF-7, U-87-MG ve HCT-116 insan kanser hücrelerinde farklı triazol türevi bileşiklerin, sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiş ve kuvvetli anti-kanser etkili oldukları bildirilmiştir. 1,2,4-triazol piridin halkası sahip bileşiklerin *in vitro* antitümoral aktivitelerin incelenmesinde güçlü anti-kanser ajanlar olduğu belirtilmiştir (Xiao-Meng et al. 2005). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da insan kanser hücrelerine karşı bazı 4-arilmetilenamin-4H-1,2,4-triazollerin önemli ölçüde anti-kanser aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Bekircan 2006). Diğer bir çalışmada ise 1,2,4 triazol yapılı bazı bileşiklerin anti kanser aktivitesi değerlendirmesi yapılmış ve bu bileşiklerin böbrek, lösemi, kolon, meme kanserine karşı aktivite sergiledikleri bildirilmiştir (Lesyk et al. 2007).

İn vivo histopatolojik çalışma,

Kontrol grubundaki hayvanların kolon dokularında hiçbir histopatolojik lezyona rastlanmadı (Şekil 4.10). Deneme gruplarında ki hayvanların tümünde kolon mukozası epitelinde hafif displazi tespit edildi (Şekil 4.11, 4.12). Şiddetli displaziye Yağ+DMSO ve Cis-15 gruplarında (Şekil 4.13); adenokarsinomlara ise sadece Yağ+DMSO grubun da

rastlandı (Şekil 4.14). Mikroskopik olarak adenokarsinomlar, invazyon durumuna göre noninvaziv ve invaziv olarak değerlendirildi. Yağ+DMSO grubunda 3 hayvanda invaziv adenokarsinom tespit edildi. Bu gruptaki adenokarsinomlardan birinde taşlı yüzük formu dikkati çekti (Şekil 4.15). İnvazyonların muskularis mukozaya kadar indiği, tunika serozaya ise ulaşmadığı tespit edildi. M-8, M-9, M-10 ve Cisplatin tedavi gruplarında kolon mukozasında herhangi bir kitle oluşumu gözlenmedi. Histopatolojik değerlendirmede, displastik lezyonlarda bez epiteli çekirdeklerinde büyüme, hiperkromazi olduğu ve hücrelerin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.16). Ayrıca çekirdek sitoplazma oranlarının arttığı tespit edildi. Bezlerde yapısal düzensizlik ve şekilsizlik mevcuttu. Karsinomlarda ise neoplastik hücrelerde pleomorfizm ve hücre çekirdeklerinde şiddetli hiperkromazi ve karyomegali gözlemlendi (Şekil 4.17). Çekirdek sitoplazma oranı birbirine yakındı. Çok sayıda atipik özellik gösteren mitotik hücreler gözlemlendi. Neoplastik bezlerde uzama, şekilsizlik ve dallanmalar mevcuttu. Yaptığımız in vivo deneysel çalışmalar doğrultusunda M-8 (4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazole-3-tiyon), M-9 (4-Fenil-5-(2-tiyenil)- 2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon), M-10 (4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazole-3-tiyon) ve cisplatin ile bileşiklerinin uygulandıkları hayvan gruplarının kolonlarında tümör oluşumunu azalttığı görülmüştür (hafif displazi, şiddetli displazi, kötü huylu tümöral lezyon, makroskopik kitle sayısı incelmelerine göre). Dolayısıyla bu tez kapsamında denediğimiz triazol bileşiklerin antitümöral etkilerinin olabileceği söylenebilir. Ancak bu konuda daha kapsamlı, daha uzun süreli ve farklı kanser hücre hatları kullanılarak daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gereklidir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde çalışmamızı destekleyecek nitelikte 1,2,4-triazol halkası içeren bileşiklerin bazı kanser hücrelerinde sitotoksik olduklarını gösteren ve hücrelerin proliferasyon özelliklerini etkilediklerini ortaya koyan çeşitli histopatolojik bilimsel çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada, 1,2,4-triazol ve türevlerinin MCF-7'i meme kanseri hatlarına geniş spektrumlu antikanser etki gösterildiği rapor edilmiştir (Genç vd. 2016). Yapılan başka bir çalışmada ise, özgün olarak sentezlenen 1-(4-metoksi-fenil)- 5-(3,4,5-trimetoksifenil)-1H-1,2,4-triazol-3-karboksamit bileşiklerinin dikkate değer bir anti-enflamatuar aktivitesi gösterdiği ve histopatolojik inceleme sonucunda indometasin ile karşılaştırıldığında düşük gastrik ülserasyon insidansı sergilediği bildirilmiştir (Abdel vd. 2014).

Diğer bir çalışmada ise, 1,2,4-triazol ve 1,3,4-tiadiazol parçasını içeren bazı yeni bileşikler insan kolorektal kanser hücre hattı (HT-29), meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231), rahim kanseri hücreleri ve insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik etki açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan triazol ve türevlerinin bazılarının HT-29 hücresine karşı, bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi yüksek sitotoksikite sergilediği tespit edilmiştir (Mavrova et al. 2014).

6. SONUÇ

Günümüzde artan endüstrileşme, teknolojik ürünlerin artışı, gıda sektöründe çeşitlenme ve kullanımı, hazırlanması kolay gıdaların ortaya çıkışı, kozmetik giyim sanayii ürünlerinde çeşitliliğin artışı gibi hayatımızı yüksek oranda kolaylaştıran yeniliklerin yaşantımıza girmesi yanında, insanoğlunun pek çok yeni hastalıkla da mücadele etmesi söz konusu olmuştur. Hastalıkların tedavisi ve engellenmesi için her geçen gün değişik yöntem, teknik ve uygulamalar geliştirilmektedir. Bu arada kullanılan yöntem ve uygulamaların etkili, ucuz ve kullanımının kolay, yan etkilerinin az olması gibi kriterlerle etkinlikleri ölçülmektedir.

Diğer taraftan hastalıkları iyileştirici nitelikli yeni ilaçların bulunması, geliştirilmesi ya da yeniden sentezlenmesi de bilim insanlarının üzerinde fazlaca durdukları konuların başında gelmektedir. Elbetteki bulunan ilaç nitelikli doğal ya da sentetik maddelerin, kişileri iyileştirirken yan etkilerinin mümkün olduğu kadar olmaması, ya da hastalıklı hücreyi iştirirken sağlam hücrelere zarar vermemesi, kullanımının kolay olması, ucuza mal edilebilmesi, erişiminin kolay olması gibi niteliklere sahip olması da önem verilen hedeflerdendir.

Çalışmamız kapsamında, özgün olarak yeni sentezlenen bileşiklerinin *in vitro* antioksidan aktivitelerinin olup olmadığı ve karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bir maddenin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinin daha sağlıklı ve etkili olabilmesi için bir veya birkaç farklı yöntem kullanılmaktadır. Çalışmamızda 2 farklı antioksidan yöntem tekniği kullanılarak hem yöntemleri birbirleriyle kıyaslama mümkün olmuştur hemde bileşiklerin daha açık olarak antioksidan kapasitelerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır.

Bazı antioksidanların, hücrelerdeki DNA hasarını ve ROT'ini azaltmak yoluyla tümör hücre proliferasyonunu çoğaltması sonucunda tümör büyümesine neden olduklarına inanılmaktadır. Bundan dolayı antioksidan kullanımlarının, erken dönemdeki hastalık gelişmesi konusunda veya kanserlerde risk altında olan kişilerde güvenilir olmadığı

neticesine varılmıştır (Sayın vd. 2014). Bu sebeple oksidatif stres meydana getiren hücrelerde antioksidanların etkilerinin incelendiği teferruatlı çalışmalara daha çok yer verilmelidir (Kısmalı ve Sel 2012). Bu noktada tam olarak, tez çalışmamızda farklı özgün triazol bileşiklerinin antitümöral özellikleri bakımından ve de antioksidan özellikleri bakımından birlikte geniş kapsamlı olarak analiz edilmeye çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada *in vitro* antioksidan aktivite sonuçlarına bakıldığında da bütün bileşikler farklı oranlarda aktif bulunmuştur. Diğer taraftan deney hayvanlarında antitümör ve histopatolojik çalışmalarımızda, kullanılan maddelerin verilen doz ve uygulanan sürede etkili bir aktivite sergilediği görülmektedir.

Nitekim farklı biyoaktif farmakolojik özelliklerini deneysel çalışmalarla ortaya koymaya çalıştığımız bu araştırmanın mevcut literatür çalışmalarına katkı sağlayacağına ve daha sonra yapılacak bilimsel çalışmalarda, model moleküllerin seçimi ve dizaynında yararlı olabilecek nitelikte sonuçlara sahip olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abdel-Aziz M, Beshr EA, Abdel-Rahman IM, Ozadali K, Tan OU, Aly OM (2014) (4-Methoxyphenyl)-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole carboxamides synthesis molecular modeling, evaluation of their antiinflammatory activity and ulcerogenicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 22(77): 155-165

Akkuş İ (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1. Baskı

Akyıldırım O (2011) Bazı potansiyel biyolojik aktif heterosiklik bileşiklerin sentezi, yapılarının aydınlatılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 97-99

Alkan M, Yüksek H, Kol ÖG, Çalapoglu M (2008) Synthesis, acidity and antioxidant properties of some novel 3,4-disubstituted-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives. *Molecules* 13: 107-121

Almajan GL, Barbuceanu SF, Almajan ER, Draghici C, Saramet G (2009) Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some triazol Mannich bases carrying diphenylsulfone moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(7): 3083-3089

Almajan GL, Barbuceanu SF, Bancescu G, Saramet, I, Saramet G, Draghici C (2010) Synthesis and antimicrobial evaluation of some fused heterocyclic [1,2,4]triazolo [3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45(12): 6139-6146

Amir M, Shikha K (2004) Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of some new 2-[(2,6-dichloroanilino) phenyl]acetic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(6): 535-545

Amir M, Kumar H, Javed SA (2008) Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: Synthesis and pharmacological activities of 1,2,4-triazolo- [3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43(10): 2056–2066

Aruoma OI (1996) Characterisation of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 675-705

Aswathanarayanappa C, Bheemappa E, Bodke YD, Krishnegowda PS, Venkata SP, Ningegowda R (2013) Synthesis and evaluation of antioxidant properties of novel 1,2,4-triazol-based Schiff base heterocycles. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci* 346: 922-930

Ayhan-Kilcigil G, Kuş C, Çoban T, Can-Eke B, Ozbey S, Iscan M, (2005) Synthesis, antioxidant and radical scavenging activities of novel benzimidazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 20: 503-514

Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouangouere R, Tane P, Spiteller M, Eloff JN (2013) Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of the Ethanol Extract, Fractions and Eight Compounds Isolated from *Eriosema robustum* (Faba-ceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 289

Anderson RA (2007) Prescribing antioxidants. *Rakel Integrative Medicine Saunders* 2nd. p.1083-1094

Bakunov SA, Bakunova SM, Tanja W, Maedot G, Karl AW, Reto B, Richard RT (2010) Synthesis and Antiprotozoal Activity of Cationic 1,4-Diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. *Journal Medicinal Chemistry* 53(1): 254–272

Barbuceanu SF, Ilies DC, Saramet G, Uivarosi V, Draghici C, Radulescu V (2014) Synthesis and antioxidant activity evaluation of new compounds from hydrazinecarbothioamide and 1,2,4-triazol class containing diarylsulfone and 2,4-Difluorophenyl moieties. *International Journal of Molecular Sciences* 15(6):10908-10925

Bantwal SH, Manjathuru M, Mari SK, Boja P, Padiyath MA, Nalilu SK (2005) Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some substituted 1,2,3- triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 40(11):1173–1178

Bai JK, Zhao W, Li HM, ve Tang YJ (2012) Novel biotransformation process of podophyllotoxin to 4 β -sulfur-substituted podophyllum derivatives with anti-tumor activity by penicillium purpurogenum. *Current Medicinal Chemistry* 19(6): 927–936

Bhat KS, Poojary B, Prasad, DJ, Naik P, Holla BS (2009) Synthesis and antitumoral activity studies of some new fused 1,2,4-triazole derivatives carrying 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(12): 5066-5070

Catignani GL, Bieri JG (1983) Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plasma by Liquid Chromatography. *Clinical Chemistry* 29(4): 708-712

Çetinkaya N, Özcan H (1991) Investigation of seasonal variations in cow serum retinol and beta-carotene by high performance liquid chromatographic method. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 100: 1003-1008

Christophe M, Sylvain G, Christian L, Maria RP, Frederic F, Cyril I, Michel B (2011) Synthesis and biological activity of triazole derivatives as inhibitors of InhA and anti tuberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(11): 5524–5531

Chavez DE, Parrish DA (2009) New heterocycles from tetrazines and oxadiazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 46: 88–90

Cottineau B, Toto P, Marot C, Aline P, ve Chenault J (2002) Synthesis and hypoglycemic evaluation of substituted pyrazole-4-carboxylic acids. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 12(16): 2105-2108

CLSI (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard- Ninth Edition CLSI document M07-A9 Clinical and Laboratory Standards Institute 950 West Valley Road Suite 2500 Wayne Pennsylvania 19087 USA

CLSI (2002) Reference Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd ed. NCCLS document M27- A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne Pennsylvania 19087- 1898 USA

Cloughesy TF, Filka E, Nelson G, Kabbinar F, Friedman H, Miller LL, Elfring GL (2002) Irinotecan treatment for recurrent malignant glioma using an every-3-week regimen. *American Journal of Clinical Oncology* 25(2): 204-208

Ciba M (2009) 6-benzoil-2-okso-(3h)-benzotiyazolin'in Mannich bazları ve Aktivite çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 39-50

Deohate PP (2013) Synthesis, structural study and biological activity of bridgehead nitrogen containing triazolo-thiadiazine derivatives. *Chemistry Science Transactions* 2(2): 556- 560

Demirbaş N, Karaoglu-Alpay S, Demirbas A, Sancak K (2004) Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4] thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4] triazole and 1- (4- phenyl-5- thioxo- [1,2,4]triazol- 3-yl)methyl-5 - oxo- {1,2,4} triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(9): 793-804

Demirbas N, Ugurluoglu R, Demirbas 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 Medicinal Chemistry* 10(12): 3717-3723

Demirbaş A (2004) A convenient synthesis of 3,6-disubstituted-1,4-dihydro-[1,2,4,5] tetrazines and preparation of new acetic acid derivatives containing 5-oxo-4 phenylamino-4,5-dihydro-[1,2,4]triazole. *Turkish Journal of Chemistry* 28(2004): 311-323

Dergel R (1992) Lipid Peroxysitation a Common Pathogenetic Mechanism. *Experimental and Toxicologic Pathology* 44(4): 169-181

Dimmock JR, Shyam K, Logan BM, Smith PJ, Cross BM (1984) Syntheses and evaluation of some mannich bases derived from acetophenones against P388 lymphocytic leukemia and toxicological assessment of 3-dimethyl-amino-2-dimethylaminomethyl-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanone dihydrochloride in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73(4): 471-477

Dimmock JR, Jonnalagadda SS, Phillips OA, Erciyas E, Shyam K, Semple HA (1992) Anticonvulsant properties of some Mannich bases of conjugated arylidene ketones. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81: 436-440

Dimmock JR, Kumar P (1997) Anticancer and cytotoxic properties of Mannich bases. *Current Medicinal Chemistry* 4: 1-22

Dimmock JR, Nyathi CB, Smith PJ (1978) Synthesis and evaluation of 1-(hydroxyphenyl)-1-nonen-3-ones and related compounds for antineoplastic and antimicrobial activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67: 1543-1546

Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y (2008) Nar Meyve Kabuğu Ekstresinin MCF-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Sitotoksik ve İnhibitör Etkileri. *Ankara Eczacılık Fakülte Derg* 37(3): 179 – 190

Diwedi R, Alexandar S, Chandrasekar MJN (2011) Rapid and efficient synthesis of microwave assisted some bis-1, 2, 4-triazole derivatives and their antioxidant and anti-inflammatory evaluation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2(1): 194-204

Donnelly JP ve De Pauw BE (2004) Voriconazole-a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. *Clin Microbial Infect* 1: 107-117

Düğü E, Ünver Y, Ünler D, Sancak K (2014) Synthesis and biological properties of novel triazol-thiol and thiadiazole derivatives of the 1,2,4-triazol-3(5)-one class. *Molecules* 19(2): 2199-2212

El Sadek MM, Abd E-Dayem NS, Hassan SY, Mostafa MA, Yacout GA (2014) Antioxidant and antitumor activities of new synthesized aromatic C-nucleoside derivatives. *Molecules* 19(4): 5163-5190

Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64(8): 711–713

Edwards ML, Ritter HW, Stemerick D, Stewart KT (1983) Mannich bases of 4-phenyl-3-buten-2-one a new class of antiherpes agent. *Journal Medicinal Chemistry* 26(3): 431-436

Ekchariyawat Peeraya, Arunee Thitithanyanont, Stitaya Sirisinha, Pongsak Utaisincharoen (2013) Involvement of GRIM-19 in apoptosis induced in H5N1 virus-infected human macrophages. *Innate immunity* 19(6): 655-662

Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64(8): 711–713

Floyd RA (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB Journal* 4(9): 2587-97

Ferrari BM, Capacchi S, Pelosi G, Reffo G, Tarasconi P, Albertini R, Pinelli S, Lungni P (1999) Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of Helicin Thisemicarbazone Monohydrate and a Copper (II) Complexes of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone *Inorganica Chimica Acta* 286: 134-141

Georgopapadakou NH (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology* 1(5): 547- 548

Genç ZK, Selçuk S, Sandal S, Çolak N, Keser S, Şekerci M, Karatepe M (2014) Spectroscopic, antiproliferative and antiradical properties of Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid based Schiff bases. *Medicinal Chemistry Research* 23(5): 2476-2485

Gheorghe R (2014) Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry* 7(89): 743-816

Gul M, Gul HI, Vepsäläinen J, Erciyas E, Hanninen O (2001) Effect of acetophenone derived Mannich bases on cellular glutathione level in Jurkat cells A possible mechanism of action. *Arzneimittelforschung* 51(2): 679-682

Gul M, Gul HI, Hanninen O (2002) Effects of Mannich bases on cellular glutathione and related enzymes of Jurkat cells in culture conditions. *Toxicol in Vitro* 16(2): 107-112

Gul HI, Calis U Vepsäläinen J (2004) Synthesis of some mono Mannich bases and corresponding azine derivatives and evaluation of their anticonvulsant activity. *Arzneimittel-forschung* 54(7): 359-364

Gul HI, Calis U Vepsäläinen J (2002) Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of some bis-Mannich bases and corresponding piperidinols. *Arzneimittel forschung* 52(12): 863-869

Gul HI, Calls U, Ozturk Z, Tutar E, Calikiran L (2007) Evaluation of anticonvulsant activities of bis(3-aryl-3-oxo-propyl) ethylamine hydrochlorides and 4-aryl-3-arylcarbonyl-1-ethyl-4-piperidinol hydrochlorides. *Arzneimittel forschung* 57: 133-136

Gul HI, Denizci AA, Erciyas E (2002) Antimicrobial evaluation of some Mannich bases of acetophenones and representative quaternary derivatives. *Arzneimittelforschung* 52: 773-777

Gul HI, Gul M, Erciyas (2002) Synthesis and stability studies of some Mannich bases of acetophenones and their cytotoxicity against jurkat cells. *Arzneimittel forschung* 52: 628-635

Gul HI, Gul M, Vepsalainen J, Erciyas E, Hanninen O (2003) Cytotoxicity of some azines of acetophenone derived mono-Mannich bases against Jurkat cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 268(2003): 631-637

Gul M, Mete E, Atalay M, Arik M, Gul HI (2009) Cytotoxicity of 1-aryl-3-buthylamino-1-propanone hydrochlorides against Jurkat and L6 cells. *Arzneimittel-forschung* 59(2): 364-369

Gürsoy Ö (2014) Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-Benzilidenamino-4,5-Dihidro-1h- 1,2,4-Triazol-5-On Bileşiklerinin Sentezi ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi. *Caucasian Journal Of Sicience* 1: 89-97

Hamon NW, Bassendowski DL, Wright DE, Dimmock JR, Noble LM (1978) Effect of antineoplastic and cytotoxic Mannich bases derived from conjugated styryl ketones on mitochondrial respiration in rat liver cells. *Journal Pharmaceutical Sciences* 67: 1539-1542

Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human disease - an overview. *Methods in Enzymology* 186: 1-85

Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 52 (8): 253-265

Hanif M, Saleem M, Hussain MT, Rama NH, Zaib S, Aslam MAM, Jones PG, Iqbal J (2012) Synthesis, urease inhibition, antioxidant and antibacterial studies of some 4-amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazol-3-thiones and their 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]1,3,4-thiadiazole derivatives *Journal Brazilian Chemical Society* 23: 854-860

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human disease - an overview. *Methods in Enzymology* 186: 1-85

Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC (2006) Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from Lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760(3): 340–346

Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F (1997) Vitamins C, E and A and Hemre oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biology Medicine* 23(6): 936-942

Holla BS, Veerendra B, Shivananda MK, Poojary B (2003) Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1,2,4-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38: 759–767

Holla BS, Poojary KN, Rao BS, Shivananda MK (2001) New bis amino mercapto triazole and bis- triazolo thiadiazole as possible anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37(6): 511-517

Husain A, Rashid M, Shaharyar M, Siddiqui AA, Mishra R (2013) Benzimidazole clubbed with triazolo-thiadiazoles and triazolo-thiadiazines: New anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 62: 785-798

İşbilir ŞS (2008) Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 4-19

Joshi S, Khosla N, Tiwari P (2004) In vitro study of some medicinally important Mannich bases derived from antitubercular agent. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 12(3): 571-576

Kelly FJ (1998) Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry* 10(1): 21-23

Karthikeyan MS, Prasad DJ, Poojary B, Bhat KS, Holla BS, Kumari NS (2006) Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (22):7482–7489

Kuş C, Kılıçgil GA, Özbey S, Kaynak FB, Kaya M, Çoban T, Eke BC (2008) Synthesis and antioxidant properties of novel N-methyl-1,3,4-thiadiazol- 2-amine and 4-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione derivatives of benzimidazole class. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(8): 4294–4303

Küçükgülzel ŞG, Çıkla-Süzgün P (2015) Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 830-870

Kotecka, BM, Barlin GB, Edstein M, Rieckmann KH (1997) New quinoline di-Mannich base compounds with greater antimalarial activity than chloroquine, amodiaquine, or pyronaridine. *Antimicrob Agents Chemother* 41(6): 1369-1374

Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı (2005) yılı Türkiye kanser istatistikleri Available from www.saglik.gov.tr

Karatepe M (2004) Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC-UV. *LC GC North America* 22(4): 362-365
 Kanofsky JR (1989) Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico Biological Interactions* 70: 1-28

Kharb R, Sharma PC, Yar MS (2011) Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26(1): 1-21

Khan I, Shajid A, Shahid H, Naseem HR, Muhammed TH, Abdul WR, Zaheer UH, Ajmal K, Iqbal MC (2010) Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 5200–5207

Khan I, Ibrar A, Zaib S, Ahmad S, Furtman N, Hameed S, Simpson J, Bajorath J, Iqbal J, (2014) Active compounds from a diverse library of triazolothiadiazole and triazolothiadiazine scaffolds: Synthesis, crystal structure determination, cytotoxicity, cholinesterase inhibitory activity, and binding mode analysis *Bioorganic Medicinal Chemistry* 22(21): 6163-6173

Kısmalı G, Sel T (2012) Paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin hepg2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 26(2): 79-85

Koparır M (2013) Synthesis and Biological Activities of Some New Mannich Bases of 5,5_-Butane-1,4-diylbis[4-ethyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones. *Chemical Science Transactions* 2(3): 701-710

Koparır M, Orek C, Parlak AE, Soylemez A, Koparır P, Karatepe M, Dastan SD (2013) Synthesis and biological activities of some novel aminomethyl derivatives of 4-substituted-5-(2-thienyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-thiones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 63: 340-346

Koparır M, Orek C (2013) Synthesis and biological activities of some novel aminomethyl derivatives of 5,5-butane-1,4-diyl-bis[4-allyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-thiones. *Chemical Science Transactions* 2(S1): 181-191

Kuş C, Ayhan-Kilcigil G, Ozbey S, Kaynak FB, Kaya M, Çoban T, Can-Eke B (2008) Synthesis and antioxidant properties of novel N-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amine and 4-

methyl-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-thione derivatives of benzimidazole class. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 16(8): 4294-4303

Kuş C, Ayhan-Kilcigil G, Can Eke B, Iscan M (2004) Synthesis and antioxidant properties of some novel benzimidazole derivatives on lipid peroxidation in the rat liver. *Archives of Pharmacal Research* 27: 156-163

Lea Talmann, Jochen Wiesner and Andreas Vilcinskas (2017) Strategies for the construction of insect P450 fusion enzymes. *De Gruyter* 72(9-10): 405-415

Lee KH, Furukawa H (1972) Antitumor agents. 3 Synthesis and cytotoxic activity of helenalin amine adducts and related derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 15(3): 609-611

Liu F, Ooi VF, Chang ST (1997) *Chang Life Science* 60(10): 763–771

Mathew V, Keshavayya J Vaidya VP (2006) Heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom: synthesis and pharmacological activities of some substituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicial Chemmistry* 41(9): 1048–1058

MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 2046-2056

Mannich C, Krosche W (1912) Ueber ein kondensations produkt aus formaldehyd, ammoniak und antipyrin. *Archiv der Pharmazie* 250: 647–667

Maccarrone M, Ullrich V (2004) Redox regulation in disease and ageing. *Cell Death and Differentiation* 11: 949–951

McClements DJ, Decker EA (2000) Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal Food Science* 65(8): 1270-1282

Mecoci P, Beal MF, Polidori MC, Cherubini A and Chiosne F (1997) Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain. *Moleculer and Chemical Neuropathology* 3(1): 53-64

Nordberg J, Arner Esj (2001) Reactive oxygen Species, Antioxidant and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicinal* 31(11): 1287-1317

Nagaraja GK, Reshma K, Manjunath B, Peethambar SK, Arulmoli T (2014) Antioxidant and Metal Chelating Activities of some Novel Imidazoquinoline Incorporated [1,2,4]-Triazolo Heterocycles. *Journal of Pharma Research* 3(3): 23-25

Nadeem H, Mohsin M, Afzaal H, Riaz S, Zahid A, Muhammad SA (2013) Synthesis and in vitro biological activities of 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3-thiols. *Advances in Microbiology* 3: 3366-3375

Niki E (1991) Vitamin C as an Antioxidant. *World Review of Nutrition and Dietetics* 64: 3- 30

Odabaşoğlu F, Çakır A, Süleyman H, Aslan A, Bayır Y, Halıcı M, Kazaz C (2006) Gastro protective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103(1): 59-65

Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Nutrition* 44: 307–316

Özdem SS and Sadan G (1994) Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg.* 11: 63-71

Özer N (1996) *Temel Biyokimya Editörler (Onat, T. Emerk, K.) Saray Medikal Yayıncılık İzmir* 785-820

Parlak AE, Çelik S, Karatepe M, Türkoğlu S, Alamur NO, Dastan SD, Ulas M, Sandal S, Tekin S, Koparir M (2016) Investigation of biological effects of some Mannich Bases containing Bis-1,2,4-Triazole. *Cellular and Molecular Biology* 62(7): 46-54

Pezzuto JM (1997) Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53(2): 121-133

Preben HO, Anders RS, Birgitte U, Peter K, Andrew NB, Ulrich, E ve Bo F H (2003) Synthesis and in Vitro Characterization of 1-(4-Aminofurazan-3-yl)-5-dialkylaminomethyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic Acid Derivatives. A New Class of Selective GSK-3 Inhibitors. *Journal Medicinal Chemistry* 46: 3333–3341

Puthiyapurayil P, Poojary B, Chikkanna C, Buridipad KS (2012) Synthesis spectral characterization and biological valuation of novel series of 6-arylsubstituted-3-[2- (4-substituted phenyl)propan-2-yl]-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines. *European Journal Medicinal Chemistry* 57: 407-416

Rakesh S, Anuja C (2014) Important methods of synthesis and biological significance of triazole derivatives. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 3(8): 874-906

Rahul PJ, Hemant NR, Amar AP, Vivek DB (2017) Synthesis and biological evaluation of a series of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives as possible antimicrobial agents. *Journal of Saudi Chemical Society* 21: 152–159

Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (1991) *Techniques in free radicals research*. Elsevier Amsterdam 22

Reitz DB, Penick MA, Norton MB, Reinhard EJ, Corpus VM, Palomo MA, McGraw E G ve McMalon EG (1994) 1H-1,2,4-Triazol AngiotensinII Receptor Antagonist C-Linket Analogs og SC-50560. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4(1): 105-110

Ruddon RW (2007) *Cancer Biology*. Oxford University Press New York 4: 223

Shaker RM (2006) The chemistry of mercapto- and thione- substituted 1,2,4-triazoles and their utility in heterocyclic synthesis. *Arkivoc* 9: 59-112

Shawmi AS, Parhangi C (1980) *J. Heterocyclic Chem* 17833

Sathish Kumar S, Kavitha HP (2013) Synthesis and biological applications of triazole derivatives-A review. *Mini Reviews in Organic Chemistry* 10: 40-65

Sahin D, Bayrak H, Demirbas A, Demirbas N ve Karaoglu SA (2012) Design and Synthesis of some Azole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Medicial Chemistry Ressearch* 12: 4485-4498

Sancak K, Ünver Y, Kazak C, Düğdü E ve Arslan B (2010) Synthesis and Characterizations of Some New 2,4-Dihydro-[1,2,4]-triazol-3-one Derivatives and X-Ray Crystal Structures of 4-(3-Phenylallideneamino)-5- thiophen-2-yl-methyl-2,4-dihydro-[1,2,4] triazol-3-one. *Turk Journal Chemistry* 34: 771-780

Sayın VI, Ibrahim XM, Larsson E, Nilsson AJ, Lindahl P, Bergo OM (2014) Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Science Translational Medicine* 6: 221-225

Seven A, Candan G (1996) Antioksidan savunma sistemleri Cerrahpaşa Tıp Dergisi 27(1): 41-50

Santhosh RP, Lokesh P, Perumal Y, Dharmarajan S, Nishant J, Balasubramanian S, Ramalinga M, Anjana DT, Shasi VK, Srinivas K (2012) Design, Synthesis, and Structure–Activity Correlations of Novel Dibenzo[b,d]furan, Dibenzo[b,d]thiophene, and N-Methylcarbazole Clubbed 1,2,3-Triazoles as Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 55(8): 3911–3922

Shewach DS, Kuchta RD (2009) Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chemical Reviews* 109(7): 2859-2861

Shiradkar MR, Kumar MK, Gangadasu HR, Suresh T, Kalyan CA, Panchal D, Ranjit K, Prashan B, Jyothi G, Vinod M, Mayuresh T (2007) Synthesis of new S-derivatives clubbed with triazolyl thiazoleas anti mycobacterium tuberculosis agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 15(12): 3997–4008

Sirassu N, Ranjith TK, Nukala SK, Shaik Y ve Nagavelli VN (2014) Synthesis and antibacterial activity of (1-aryl-1, 2, 3-triazol-4-yl) methyl esters of morpholine-3-carboxylic acid. *Medicinal Chemistry Research* 23: 5321–5327

Silverstein A, Silverstein V, Silverstein Nunn L (2006) *Cancer Conquering a Deadly Disease*. A division of Lerner Publishing Group Minnesota 11-12

Sumangala V, Poojary B, Chidananda N, Arulmoli T, Shenoy S (2012) Facile synthesis, cytotoxic and antimicrobial activity studies of a new group of 6-aryl-3- [4-(methylsulfonyl) benzyl]-7H- [1,2,4] triazolo [3,4-b] [1,3,4] thiadiazines. *European Journal Medicinal Chemistry* 54: 59-64

Suleyman H, Gul HI, Gul M, Alkan M, Gocer F (2007) Anti-inflammatory activity of bis (3-aryl-3-oxo-propyl) methylamine hydrochloride in rat. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 30: 63-67

Stratton SP, Liebler DC (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): 12911-12920

Sztanke K, Tuzimski T, Rzymowska J, Pasternak K, Kandefer Szersze&- nacute M (2008) Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1,2,4-triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43(2): 404–419

Turan-Zitouni G, Sıvacı M, Kılıc FS Erol K (2001) Synthesis of some triazolyl-antipyrine derivatives and investigation of analgesic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 36(7-8): 685-689

Tozkoparan B, Gökhan N, Aktay G, Yeşilada 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. *European Journal of Medicinal Chemistry* 35(7-8): 743-750

Thirupurasundari CJ, Padmini R Devaraj SN (2009) Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in

azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Chemico-Biological Interactions* 177(3): 190-195

TCP Dinis, LM Almeida (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315(1): 161–169

Tramontini M, Angiolini L (1990) Further Advances in The Chemistry of Mannich Bases. *Tetrahedron* 46: 1791-1837

Tüzün C (1997) *Biyokimya* Palme Yayıncılık, 3. Baskı

Upanhayaya RS, Sinha N, Jain S, Kishore N, Chandra R ve Arora SK (2004) Optically active antifungal azoles: synthesis and antifungal activity of (2R,3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-{2-[4-aryl - piperazine-1-yl]-ethyl} - tetrazol-2-yl/1-yl 9-1-[1,2,4]-triazol-1-yl)-butan-2-ol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 2225-2238

Ul-Haq, Khan ZA, Ali S, Choudhary MI (2010) Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45(11): 5200-5207

Ünver Y, Meydanal S, Sancak K, Ünlüer D, Ustabaş R, Düğdü E (2011) Synthesis, crystal structure, and antioxidant properties of novel 1,2,4-triazol-5-ones containing 3,4-dimethoxyphenyl and 3,4-dihydroxyphenyl moiety *Turk Journal Chemistry* 35: 265-277

Ünver Y, Düğdü E, Sancak K, Er M Ustabaş R (2010) Synthesis and Characterization of novel triazol compounds containing thiophen ring as potential antifungal agents and Structure of 2-(2-hydroxy-2-p-tolyethyl)-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one. *Turk Journal Chemistry* 34: 551-563

Vanden Bossche H (1985) Biocemical targets for antifungal azole-derivative: Hypothesis of the mode of action. *Current Topics Medical Mycology* 1: 313-351

Vanden BH, Bellens D, Cools W, Gorren J, Marichal P, Verhoeven H (1986) Cytochrome p-450: target for itraconazole. *Drug Development Research* 8: 287-298

Vanden BH, Willemsens G, W Cools, W Lauwers (1983) Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activation of N-substituted imidazoles and triazoles. *Biochemical Society Transactions* 11(6): 665-667

Vandeputte P, Ferrari S Coste AT (2012) Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections *Jornoul Microbiol* 3: 1 –26

Vani PM, Benoit C, Lac VL, Stefanie R, Sharpless KB, Chi HW ve Hartmuth CK (2004) In Situ Click Chemistry Enzyme-Generated Inhibitors of Angewandte Chemie. International Edition 44: 116–120

Varvaresou A, Tsantili-Kakoulidou A, Siatra-Papastaikoudi T, Tiligada E (2000) Synthesis and biological evaluation of indole containing derivatives of thiosemicarbazide and their cyclic 1,2,4-triazol and 1,3,4-thiadiazole analogs. *Arzneimittelforschung* 50(1): 48-54

Varma RS, Garg PK, Verma HN, Awasthi LP (1981) Potential biologically active agents, XXXII. Synthesis and antiviral activity of some 3-(arylthiosemicarbazono)-2-indolinones. *Arch Pharm* 314: 918-922

Ying L, Shun YZ, Hong Z, Cao BJ, Wang FD, Zhang Y, Shi YL, Yang J, Wu BA (2003) Artemisinin derivatives bearing Mannich base group: synthesis and antimalarial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11(20): 4363–4368

Yu Z, Zhang L, Wu D, Liu F (2005) Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(3): 441-446

Young âMN, Borge M, Pagniez F, Baut G and Pape P (2003) Synthesis and antifungal activity of new 1-halogenobenzyl-3- imidazolylmethylindole derivatives. *Europa Journal of Medicinal Chemistry* 38: 75-87

Walczak K, Gondela A, Suwinski J (2004) Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(10): 849-853

Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F (2014) Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 11: 280120

Xiang L, Chao Li, Sheng, T, Qiuye W, Honggang H, Qingjie Z, Yan Z. (2016) Synthesis, In Vitro Biological Evaluation, and Molecular Docking of New Triazoles as Potent Antifungal Agents. *Arch Pharm Chemistry Life Science* 349: 42 –49

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Malatya’da doğdu. İlk ve ortaokulu Malatya Mimar Sinan ilköğretiminde, liseyi Malatya Fatih Lisesi’nde tamamladı. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümünü kazandı. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümünü mezun oldu. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalında tezli yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Toksik Eser Metallerin Polimerik Reçineler Kullanılarak Önderiştirilmesi ve AAS ile Tayini konulu tez çalışmasını tamamlayarak Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programından mezun oldu. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Programına kayıt yaptırdı. 2014 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Programına yatay geçiş yaptırdı. Malatya/ Yazıhan Boztepe Sulama Şantiyesinde Ahmet Aydeniz İnşaat Turizm AŞ C sınıfı iş güvenliği uzmanı olarak tam zamanlı çalışmaktadır.