

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**2-AMİNOİMİDAZOLİN'İN RATLARIN (WİSTAR) BAZI KAN PARAMETRELERİNE
(A, E, C VİTAMİNLERİ VE MDA) ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Erkan YÜKSEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez,/...../2006 tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği/ Oyçokluğu İle
Başarı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Fikret KARATAŞ

Üye :

Üye :

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../2006 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

2-AMİNOİMİDAZOLİN'İN RATLARIN (WİSTAR) BAZI KAN PARAMETRELERİNE (A, E, C VİTAMİNLERİ VE MDA) ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Erkan YÜKSEK

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
2006, Sayfa: 37

Bu çalışmada, deri altına N-(5-fenil[1,3,4]-tiyadiazol-2-il)-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2il) amin (2-Aminoimidazolin) enjekte edilen ratların kan serumu, karaciğer ve böbrek dokularındaki A, E, C vitaminleri ve lipit peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. Toplam 23 ratın, 12 tanesine 25 mg kg⁻¹ dozda (250 µL %75 ethanol de çözülmüş) 2-Aminoimidazolin ve 11 tanesine de kontrol grubu olmak üzere 250 µL %75 ethanol enjekte edildi. Uygulamalar güneşli olmak üzere 22 gün devam edildi. Uygulama süresi sonunda ratlar eterle bayıltılarak kan, karaciğer ve böbrekleri alındı.

2-Aminoimidazolin enjekte edilen ratların serum C vitamini düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük (p<0.005) olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde serum A ve E vitamini değerleri ile karaciğer ve böbrek A, E ve C vitaminlerinin düzeylerinde kontrol grubuna göre düşük (p<0.05) olduğu belirlendi.

2-Aminoimidazolin enjekte edilen ratların serum ve karaciğer MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek (p<0.005), böbrek MDA düzeylerinin de yüksek (p<0.05) olduğu gözlemlendi.

Tüm bu sonuçlardan 2-aminoimidazolin'in stres oluşturarak serbest radikal oluşumunu arttırdığı, antioksidan vitamin düzeylerini azalttığı söylenebilir. Bu nedenle 2-Aminoimidazolin türevleri ihtiva eden ilaçların kullanımı halinde antioksidan vitaminler ile birlikte alınmasının yararlı olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler : N-(5-fenil[1,3,4]-tiyadiazol-2-il)-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2il) amin, A, E, C vitaminleri ve MDA

ABSTRACT

Master Thesis

AN INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF 2-AMINOIMIDAZOLINE ON THE LEVELS OF ANTIOXIDANT VITAMINS (A, E AND C) AND MDA OF RATS

In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the amounts of malondialdehyde (MDA) which is the indicator of the lipid peroxides and A, E, C vitamins of blood serum, liver and kidney tissues of rats under the skin of which we N-(5-phenyl[1,3,4]-thiadiazol-2-yl)-N-(4,5-dihydro-1H-imidazole-2-yl) amine (2-aminoimidazoline). 2-Aminoimidazoline was injected to the 12 rats of total in the amount of 25 mg kg⁻¹ (dissolved in 250 µL of %75 ethanol) and for control group only 250 µL of %75 ethanol was injected to the other 11 rats during 22 days (every other day). Afterward, all rats were failed by using ether and blood serum, liver and kidney tissues of them were taken.

It was found that the level of C vitamin of rats under the skin of which we inject thydiazolimidazoline was lower than those in control group (p<0.005). The same results were observed for A, E vitamins in serum and A, E and C vitamins in liver and kidney tissues (p<0.05).

It was observed that MDA levels of liver and serum of rats which 2-aminoimidazoline was injected were higher than control groups (p<0.005). Moreover, this level was found to be higher in the rats under the skin of which we inject 2-aminoimidazoline than control groups for kidney tissues (p<0.05).

All of these observations show that production of free radicals were increased by 2-aminoimidazoline producing stress in rats and because of the same reason the level of antioxidant was decreased.

In conclusion, it can be said that it is beneficial to use antioxidant vitamins with the drugs containing any type of 2-aminoimidazoline.

Key Words: N-(5- phenyl[1,3,4]-thydiazol-2-yl)-N-(4,5-dihydro-1H-imidazole-2-yl) amine, Vitamins A, E, C and MDA

TEŐEKKÖR

Bu tezin planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarımın gidişatında bana destek ve ilgisini esirgemeyen bilgi, tecrübe ve hoşgörüsünden yararlandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Fikret KARATAŞ 'a sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım. Ayrıca, deney hayvanlarının yetiştirilmesinde ve de kesimlerinde yardımlarını aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan KARADAŐ ve Yrd. Doç. Dr. Bülent ELİTOK'a, Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye ayrıca kimyasal maddeyi sentezleyen Yrd. Doç. Dr. Süleyman SERVİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Erkan YÖKSEK

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖZET..... | II |
| ABSTRACT..... | III |
| TEŞEKKÜR..... | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| TABLolar LİSTESİ | VII |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | VIII |
| KISALTMALARIN LİSTESİ | X |
| | |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| | |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. A Vitamini (Retinol)..... | 4 |
| 2.2. E Vitamini (α -Tokoferol)..... | 5 |
| 2.3. C Vitamini (Askorbik Asit) | 6 |
| 2.4. Malondialdehit (MDA) | 7 |
| 2.5. Serbest Radikaller ve Toksik Etkileri | 13 |
| 2.6. Antioksidanlar ve Metabolizma için Önemleri..... | 16 |
| | |
| 3. MATERYAL ve METOD..... | 17 |
| 3.1. Hayvan Materyali..... | 17 |
| 3.2. Grupların Oluşturulması..... | 17 |
| 3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması..... | 18 |
| 3.4. Doku Örneklerinin (Karaciğer ve Böbrek) Hazırlanması..... | 18 |
| 3.5. Metot..... | 18 |
| 3.5.1. A ve E Vitamini Tayini | 18 |
| 3.5.2. C Vitamini Tayini..... | 20 |
| 3.5.3. MDA Tayini | 21 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 4. BULGULAR | 23 |
| 5. TARTIŞMA | 26 |
| KAYNAKLAR..... | 28 |
| ÖZGEÇMİŞ | 37 |

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların serum antioksidan vitaminleri(A, E ve C) ve MDA miktarları.....23

Tablo 2. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların karaciğer dokusu antioksidan vitaminleri(A, E ve C) ve MDA miktarları.....24

Tablo 3. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların böbrek dokusu antioksidan vitaminleri(A, E ve C) ve MDA miktarları 25

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. A vitamini (retinol) yapısı..... | 4 |
| Şekil 2. E vitamini (α -Tokoferol) yapısı..... | 5 |
| Şekil 3. C vitamini (Askorbik Asit) yapısı..... | 6 |
| Şekil 4. Malondialdehit (MDA) yapısı..... | 7 |
| Şekil 5. Radikal oluşumu | 9 |
| Şekil 6. Lipit peroksidasyonu..... | 10 |
| Şekil 7. N-(5-fenil [1,3,4]-tiyadiazol-2-il)-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2il) amin (2-aminoimidazolin)..... | 17 |
| Şekil 8. Vitamin A'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi | 19 |
| Şekil 9. Vitamin E'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi..... | 20 |
| Şekil 10. Vitamin C'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi..... | 21 |
| Şekil 11. MDA'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi | 22 |
| Şekil 12. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin injekte edilen ratların serum antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği..... | 23 |
| Şekil 13. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin injekte edilen ratların karaciğer dokusu antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği..... | 24 |

Şekil 14. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin injekte edilen ratların böbrek dokusu antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği.....**25**

KISALTMALARIN LİSTESİ

| | |
|--------|--|
| BITN | : Benzimidazol-tetranafalin |
| CYP | : Sitokrom P 450 |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| EDTA | : Etilendiamintetra asetik asit |
| EROD | : Etoksiresorufun O-deetalaz |
| GSH | : Redükte Glutatyon |
| GSH-Px | : Glutatyon Peroksidaz |
| GSSG | : Okside Glutatyon |
| HPLC | : High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) |
| MDA | : Malondialdehit |
| NADPH | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte) |
| PROD | : Pentoksiresorufun O-depentelaz |
| PDE | : Fosfodiesteraz |
| SOD | : Süperoksit dismutaz |

1. GİRİŞ

Benzimidazol ve imidazolün halka sistemleri tıp kimyasında etkili farmakolojik etkiye sahiptir. 2-Sübstitüe-1*H*-benzomidazoller ve 2-sübstitüe-1*H*-imidazollerin yanı sıra 2-Aril amino imidazolin türevleri de son yıllarda tıp kimyasında geniş uygulama alanları bulmuşlardır [1,2]. Aminoimidazolin türevleri tıpta sıklıkla kullanılır. Bu türevler hipertansiyon hastalığında kullanılan ilaçlara katkı maddesi olarak ilave edilir [3]. İmidazol grubu içeren kimyasallardan biri olan *izoniazid* tüberküloz teşhisinde kullanılan bir yapıdır. Mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır ama bu alanda çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. *Isoniazid* tüberkilos bakterisinde karşı vücutta dayanıklılık oluşturur ve de bakterinin aktivitesini engeller [4].

Antimiyobakteriyel ilaçların birçoğunun aktif bileşenlerinin yapısında imidazol türevleri bulunmaktadır. Miyobakterilerin çalışma mekanizmaları, biyokimyasal olarak organizmadaki rolleri ve sağlık üzerine etkileri son yıllarda birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Miyobakteriler birçok ülkede sağlık açısından risk teşkil etmektedir. Bu bakterilerin etkilerini yok etmek amacıyla kullanılan *izoniazid* (INH), tüberküloz hastalığının tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. *İsoniazid*' in vücuttaki çalışma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [4].

2-Arilamino-2-imidazollerin türevleri kardiyovasküler sistemde yüksek tansiyonu düşürücü etkisi olup, tedavi ve ameliyatlarda ağrı kesici ve yatıştırıcı olarak kullanılırlar. Antiüretik madde olarak kullanıldıkları tespit edilmiş ve ayrıca ishal engelleyici özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir. Intraocular (glokom) denilen göz basıncını düşürücü etkileri vardır. α 2-Adrenareseptör against (ağrı kesici)'dir. Sinir yatıştırıcı olarak etkisi olup, indanozolin çok kullanışlı bir vasoconstriktive (kan damarlarını daraltıcı) maddesidir [5].

Halkanın 2. pozisyonunda fenil substitesi taşıyan benzimidazol türevlerinin ağrı kesici [6], iltihap kurutucu [7], antimikrobiyal [8], spasmolitik [9], antiviral [10], anthelmintik [11], aktivitelere sahip oldukları belirtilmektedir. 1-(β -dimetilaminoetil) benzimidazol türevlerinin morfin benzeri analjezik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır [12].

Tiyadiazol bileşiklerinin de aynı şekilde ağrı kesici, iltihap kurutucu [13], antimikrobiyal [14], spasmolitik [15] ve antiviral [16] aktivitelere sahip oldukları belirtilmektedir.

Retinoid tip benzimidazol bileşigi (benzimidazol-tetranaftalin-BITN) sentezlenmiş ve sitokrom P 450 (CYP) bağımlı etoksiresorufun O-deetalaz (EROD) ve pentoksiresorufun O-depentelaz (PROD) enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri ratlarda araştırılmıştır. Yüksek antikarsiyonejik ve antioksidan potansiyele sahip olduğu görülmüştür [17].

İmidazol türevlerinden olan seratonin sinir transferinde görev alan kimyasallardan birisidir. Bu yapı kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde etkin rol oynar. Ayrıca hafıza, uyku, beslenme olaylarının düzenlenmesinde etkilidir. Depresyon ve migren hastaları için de kullanılan ilaçlarda aktif bileşen olarak imidazol türevleri kullanılır [18].

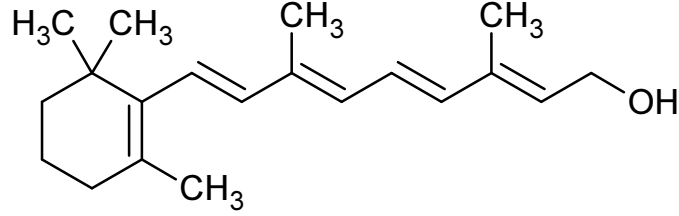
2-(Anilinomethyl)imidazolinler alfa (α_{1A}) türü reseptörler olarak bilinmektedirler. Bu yapılar cardiovascular ve urogenital sistemlerde yapısal olarak önemli görevlere sahiptirler. 2-(Anilinomethyl)imidazol yapısında 3 farklı α_1 vardır. Aslında bu yapılar alfa grubunun alt gruplarını oluşturmaktadırlar. Bu yapılar, α_{1B} ve α_{1D} dir. Bu üç yapının farklı dokulardaki konsantrasyonları birbirinden farklıdır. Bu yüzden her bir alt birimin ligandları kullanılarak tedavi edici geniş profiller elde edilebilir. Örneğin selektif α_{1A} (antagonist tamsulosin) iyi huylu prostat hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [19]. Trombosit pıhtılaşma inhibitörleri ve erimiş veya tek başına imidazol halkasına sahip bileşikler üzerindeki çalışmalar sonucu; aktiviteleri arasındaki ilişki toksitler, lipofilik partiküler önemi üzerinde tartışılmıştır [20]. 5-metil-4-(3-piridil)-2-(sübstitelenmiş benzimidazol-5-il) imidazol türevlerinin antitrombosit ve damar genişletici etkisi üzerinde çalışma yapılmıştır. Bunların tromboksan A2 sentetaz ve fosfodiesteraz (PDE), siklooksigenaz gibi trombosit pıhtılaşma dizisinde olan enzimleri inhibe ettiği görülmüştür [21]. N-mono N-N disübstütiye ditiyokarbomat türevleri bakteri ve mantarlara karşı antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahiptirler. Metil N-ariltiyokarbomatlar ve dimetil N-aryl dithiocarbonimid bileşikleri ilginç bir kimyaya sahip olup, literatürde çok bilinen 2-arilamino-2-imidazolin türevleri *clonidin* ve *maxonidin* sentezine imkan tanımaktadır [14].

Nippostrongylus brasiliensis'lere karşı metil-(5-((4-(2 piridinil)-1-piperazinil) karbonil-1H-benzimidazol-2-11) karbomat (CD:RI bileşigi 81/470) ve tiyabendazol'un solucan düşürücü etkisi rat bağırsağında incelenmiştir. İki ilaç da parazit glutatyonunda (GSH) düşüş ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinde depresyon göstermiş ve parazit situ'da barınmadığı tespit edilmiştir [22].

Bis(2-aminoimidazolin) kimyasalı uyku hastalığı olarak ta bilinen *Human African Trypanosomiasis*, HAT in tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalık akut veya kronik olabilir. Sadece 4 ilaç bu hastalığın iyileştirilmesi maksadıyla kullanılmaktadır (DFMO, suramin, pentamidine, and melarsoprol). Bu ilaçların yanısıra spesifik durumlarda kullanılmak üzere çeşitli ilaç türleri mevcuttur (Berenil, nitrofuran nifurtimox). Ayrıca imidazol yapılarında bu hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlarda aktif bileşen olarak kullanıldığı daha önce yapılan araştırmalar tarafından ispatlanmıştır. N,N'-bis(4-amidinofenil)piperazin bu amaçla kullanılan imidazol türevlerinden birisidir [23].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. A Vitamini (Retinol)



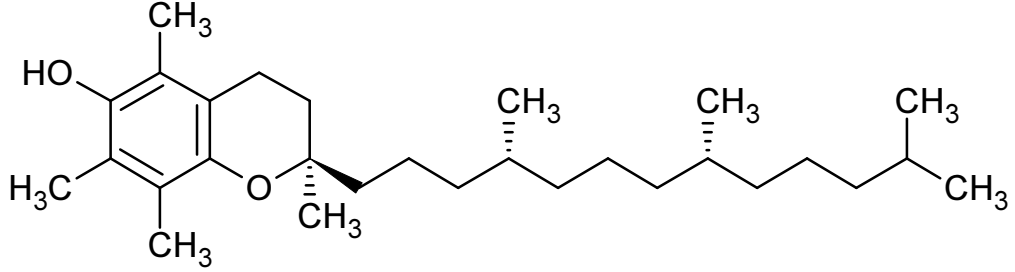
Şekil 1. A vitamini (retinol) yapısı.

Suda çözünmeyen, yağda ve organik çözücülerde çözünen bir maddedir. A vitamini bir primer alkol grubuna ve çok sayıda doymamış bağa sahiptir. Bir büyüme vitamini olan A vitaminin alkol (retinol), aldehit (retinal) ve asit (retinoik asit) formları da mevcuttur. Memelilerde sadece retinol A vitamini etkisi göstermezken karotenoidler (α , β ve γ - karotenler) A vitamini etkisi gösterir [24].

Ayrıca α -karoten ve γ -karotenin birleşmesiyle bir molekül A vitamini oluşur. A vitamini karaciğerden yağ asidi esteri halinde depolanır [25]. Gıda ile alınan β -karotenler, karoten dioksijenaz enzimi ile oksidatif parçalanmaya uğrarlar. Bu parçalanmada moleküler oksijenden yararlanılır ve safra tuzlarının varlığında hızlanan olay sonucunda iki molekül retinal açığa çıkar. İntestinal mukozada retinal NADPH yardımıyla spesifik bir retinal redüktaz enzimi tarafından retinole indirgenir. Retinolün büyük kısmı doymuş yağ asitleri ile ester oluşturularak kan dolaşımına lenf kanalı ile verilir. Düşük oksijen kısmi basınçlarında β -karotenler, antioksidan özellik göstermektedirler [26].

A vitamini görme, büyüme, üreme ve epitel hücrelerin sağlamlığı fonksiyonlarına sahiptir. İnsanın günlük A vitamini ihtiyacı 1mg civarındadır. Karaciğer, böbrek, yağ, yumurta sarısı A vitamini için zengin kaynaklardır. Sarı ve koyu yeşil sebzeler ve meyveler A vitamini öncülü olan karotenler bakımından zengindirler. A vitamininin eksikliğinde eklemelerde iltihaplanmalar ve beraberinde göz kornealarında iltihaplar, hastanın görme netliğinin azalması, göz altı derilerinde büzülmeler, hastanın gece ile gündüz görmelerinde uyumsuzluk gözlenmektedir. A vitamini iyi bir antioksidan etkisinden dolayı görme siniri uyarımını artırır, gözlerdeki netliği azaltacak beyaz lekeler yok olur [27]. A ve C vitamini singlet oksijen temizleyicisi özelliği nedeniyle diğer oksijen radikallerine karşı da koruyucu etkiler yapar [28].

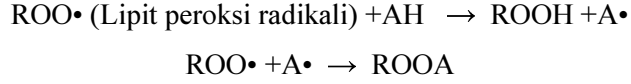
2.2. E Vitamini (α -Tokoferol)



Şekil 2. E vitamini (α -Tokoferol) yapısı.

E vitamini tokoferol yapısında olup, yağda çözünen bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoidlerin substitue edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokoferollerdir. D- α -tokoferol geniş dağılım gösteren ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan formudur [29]. Bitkisel yağlar E vitamini bakımından zengindir. Karaciğer ve yumurta orta derecede E vitamini içerir. α -tokoferol için önerilen günlük gereksinim erkeklerde 10 mg, kadınlarda 8 mg'dır. E vitamini gereksinimi, çoklu doymamış yağ asiti alımı arttığı zaman artar. E vitamini ince bağırsaklarda absorplanır [27]. E vitamini eksikliği erken doğan bebeklere özgüdür. Yetişkinlerde genellikle kusurlu lipit emilimi ve taşınmasıyla birlikte. İnsanlarda E vitamini eksikliği belirtileri eritrositlerin peroksitlere karşı duyarlılığı ve anormal hücre membranlarının oluşmasıdır. Enzim ve bileşiklerin çoğu oksidatif stresin etkilerine karşı hücreleri korurlarken E vitamini antioksidan savunmanın tümünde önemli bir yere sahiptir. E vitamini serbest radikallerin oksidasyonuna karşı hücre membranının yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada ilk savunma hattını oluşturur [30].

Sellüler ve organel zarlar arasına girerek serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipit peroksidasyonuna karşı korur. E vitamini, peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonlarıyla doyurup, peroksit radikallerinin aktivitesini azaltarak otooksidasyonun başlatıcısı olan bu reaksiyonları inhibe eder. GSH-Px'e benzer etki göstererek hücrede zar oksidasyonunu önleyerek dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlar. E vitamini (AH), etkisini zar fosfolipitlerinde bulunan araşidonik aside bağlanarak gösterir ve kendi başlattığı reaksiyon ile bir radikale (A \cdot) dönüşerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu keser.

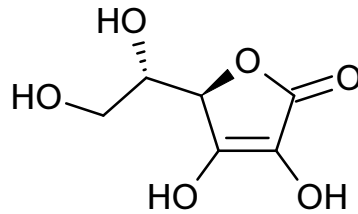


Her bir E vitamini iki oksidasyon zincirini durdurur. Çünkü vitamin E radikali zincirin devamı için az reaktiftir [31]. E vitamininin antioksidan fonksiyonu çoğu diyetel bileşenlerin durumu ile yakından ilgilidir. E vitamini verilmemiş hayvanlar, E vitamini verilmiş hayvanlara göre çevrenin etkilerine karşı genellikle daha duyarlıdır. E vitamini eksikliği olan deneklerde metabolik olan hidroperoksitler, aldehidler ve diğer oksidasyon ürünlerinin artığı, E vitamini verilen deneklerde lipit peroksidasyonu sebep olan serbest radikallerin azaldığı gözlenmiştir [32].

E vitamini eksikliği genelde prematür bebeklerde görülür. Yetişkinlerde genellikle kusurlu lipit emilimi ve taşınmasıyla birlikte. E vitamininin kalp hastalığı gelişmesine karşı koruyucu etki gösterdiği söylenmektedir. Vitamin E, vitamin C ve β-karoten, katarakt başlangıcını geciktirmede birlikte işlev görürler. Yağda çözünen vitaminlerin en az toksik olanıdır [33].

E vitamini eksikliğinde oluşan bir takım bozuklukların düzeltilmesinde selenyumun etkisi vardır. Dolayısıyla Se antioksidatif mekanizmada oldukça önemli bir görev üstlenmiştir [34]. Ayrıca Se, α-tokoferol'ün bozunmasının önlenmesinde, absorpsiyonunda ve biyolojik aktivitenin artmasında etkilidir [35]. Antioksidanların çoğu, radikallerin etkisini önlemek amacıyla hastalıkların tedavisinde kullanılır [36].

2.3. C Vitamini (Askorbik Asit)

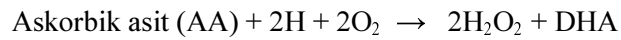


Şekil 3. C vitamini (Askorbik Asit) yapısı.

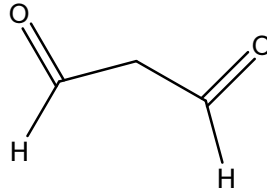
Vitamin C, kapalı formülü $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ olan bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidrosilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Suda çözünebilir

vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil taze sebze, patates, domates, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. C vitamini bağırsaklarda kolayca emilir ve kana karışır. Askorbik asit yeterince alınmadığı zaman skorbüt hastalığı, kansızlık ve uyuşuklukla başlar ilerledikçe kanamalar olur, bağ dokuları zayıflar ve kemikler kırılabilir olur. C vitamini besinlerle fazla alınması, koroner kalp hastalığı ve bazı kanserler gibi kronik hastalıkların görülme sıklığını azaltır. C vitamini fazlası idrar ve terle dışarı atılır. Böylece alınan fazla miktar depo edilmez [25].

C vitamini (Askorbik asit) güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların temizlenmesinde rol oynar [37]. C vitaminin etkili bir singlet oksijen temizleyicisi olduğu da belirtilmektedir [28]. İnsanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yiyen yarasaların, L-glukonolakton oksidaz enzimini içermedikleri için sentezleyemedikleri gerekli bir diyet vitamini dir. Askorbik asit güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur [31].



2.4. Malondialdehit (MDA)



Şekil 4. Malondialdehit (MDA) yapısı.

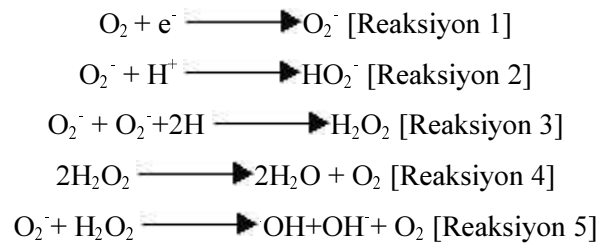
Günümüzde birçok hastalığın ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir [38]. Serbest radikaller membranların reseptörlerine kovalent bağlanması çoklu doymamış yağ asidi/protein oranını değiştirir ve lipit peroksidasyonunu başlatır. Lipit peroksidasyonuna bağlı olarak organellerde fonksiyon bozukluğu oluşur [39]. Bu şekilde oluşan lipit peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi malondialdehit (MDA) olan reaktif karbon

bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle, MDA miktarının ölçümü dokulardaki lipit peroksidasyonunun derecesini yansıtmaktadır [40].

Lipit peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipit, glikolipit, trigliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elamanları ile etkileşirler [41]. Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, fazla miktarlarda doymamış yağ asiti ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu poliansature yağ asitlerine saldırır ve lipit peroksitlerin teşekkülüne yol açan lipit radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipit peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonunun indirekt bir işaretidir. Biyolojik membranların en önemli unsurları lipit ve proteinlerdir. Lipit peroksidasyonu, lipitler kadar membran proteinlerini de hasara uğratabilir [42].

Oksijen molekülü lipitlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipitlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipit peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipit peroksidasyonunun zar yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerinin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [43].

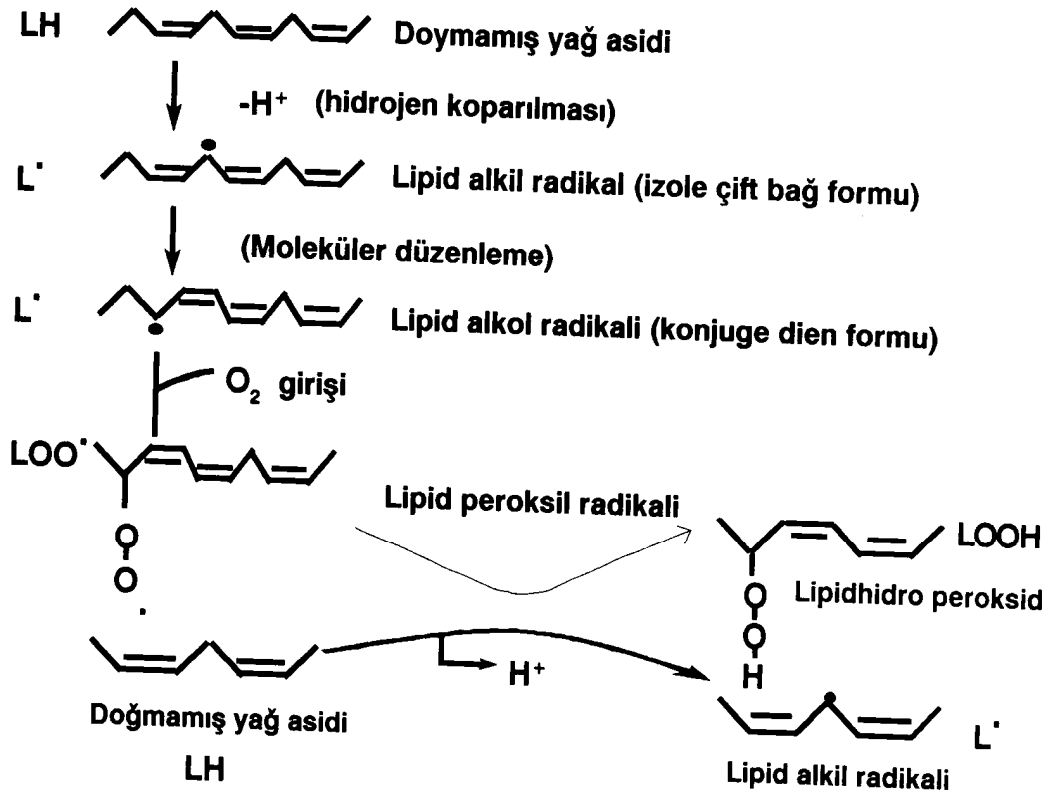
Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Oksijenin indirgenmesini izleyen dönemde süperoksid (O_2^-), hidroperoksil (HO_2^-), hidrojen peroksid (H_2O_2) hidroksil radikali (OH) nin dahil olduğu birçok reaktif oksijen türü oluşmaya başlar [Reaksiyon 1,2,3,4,5].



Üç numaralı reaksiyon süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Reaksiyon sonunda oluşan H_2O_2 , memeli hücrelerinde katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx)

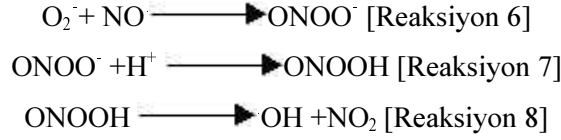
tarafından glutasyon redüksiyonu ile su moleküler oksijene detoksifiye edilir [Reaksiyon 4]. Okside glutasyon da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutasyon redüktaz (GR) ile redükte glutatyona dönüştürülür.

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



Şekil 5. Radikal oluşumu.

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

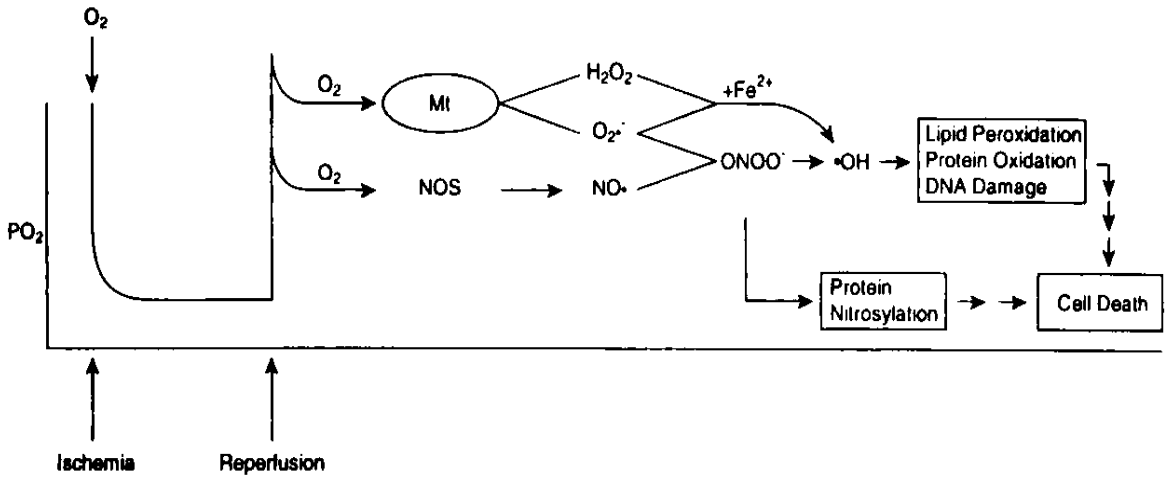


Fizyolojik pH da ONOO^- derhal $\cdot\text{OH}$ nitrojen dioksidi ($\text{NO}_2\cdot$) parçalanır [Reaksiyon 7,8]. Çok güçlü bir prooksidan olan ONOO^- , SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Sonuçta hücrel proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması hücrel disfonksiyon ölüme yol açabilir. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipit peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur. Lipit peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 6) ;

Başlangıç basamağı (initiation)

İlerleme basamağı (propagation)

Sonlanma basamağı (termination)



Şekil 6. Lipit peroksidasyonu.

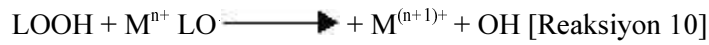
Başlangıç basamağı: Hız kısıtlayıcı olup yeterli reaktivitedeki oksijen kaynaklı bir radikalın bir metilen (-CH₂-) grubundaki divinil (allilik) hidrojen atomunu koparması ile gerçekleşmektedir. Yağ asidinde çift bağ varlığı C-H bağı zayıflatarak H⁺ atomunun kopartılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipitlerinin doymamış yağ asitleri yan zincirleri, peroksidasyona özellikle duyarlıdır. İlk hidrojen atomunu kopartacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (OH), alkoksil (RO), peroksil (ROO) hidroperoksil (HO₂) radikalleri olup,

süperoksit anyon hidrojen peroksit bu reaksiyonu başlatamamaktadır. Hidrojen atomu tek bir elektron içerdiği için, başlangıç reaksiyonu sonunda geride karbon üzerinde eşlenmemiş bir elektron kalmaktadır (-CH \cdot). Daha önce başlangıç reaksiyonu kavramı daha ileri basamakları kapsamaktaysa da, son görüşler bu aşamanın sadece hidrojen atomunun koparılması reaksiyonu olduğunu kabul etmektedir.

İlerleme basamağı: Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile izole çift bağ formundan, konjuge dien formuna geçer. Oluşan lipit alkil radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksit radikalini oluşturur (Şekil 6). Lipit peroksit radikali ise, bir başka yağ asidinden hidrojen atomunu kopararak lipit hidroperoksidi yeni bir lipit alkil radikalini oluşturarak yeni bir zincir reaksiyonu başlatabilmektedir. Lipit hidroperoksitleri, fizyolojik koşullarda nispeten kararlı moleküller olmakla birlikte, geçiş metalleri veya metal komplekslerinin katalizörlüğünde parçalanabilmektedirler. Beyin, ferrik demir (Fe $^{+3}$) açısından zengin bir organdır. Bu demirin büyük bir kısmı hemoglobin, myoglobin, aktif bölgesinde demir içeren enzimlerde veya ferritin gibi depo proteinleri ile, transferrin gibi transport proteinlerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bu şekli ile demir katalizör görevini yapamaz. Serbest demirin en önemli kaynağı ferritindir. NADH O $_2$, ferritindeki ferrik demirin indirgenmesini ferröz demir (Fe $^{+2}$) olarak salınmasını kolaylaştırmaktadır [Reaksiyon 9].



İndirgenmiş metal iyonları (Fe $^{+2}$, Cu $^{+}$) lipit hidroperoksidi ile reaksiyona girerek alkoksil radikalini (LO \cdot), okside metal iyonları ise (Fe $^{+3}$, Cu $^{+2}$) daha yavaş bir reaksiyonla alkoksil peroksit (LOO \cdot) radikallerini oluşturmaktadır [Reaksiyon 10].



Her iki radikal de başka yağ asitlerinden hidrojen atomu kopartarak lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sürdürürler.

Sonlanma basamağı: Lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları, iki lipit peroksit radikali etkileşinceye kadar sürmekte siklik peroksit (LOOL) oluşumu ile sonlanmaktadır [Reaksiyon 11].



Lipit peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid gibi alkaneller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkenallerdir. Malondialdehid sınıfından olan tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler, iskemi reperfüzyon olayında lipit peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindedir.

Lipit peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen metal katalizörler (Fe^{+2} , Cu^{+}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Lipit radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipit peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır.

*Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerde (Örn: $Na^{+}-K^{+}ATPaz$) aktivite azalması.

*Lizozomal mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipit peroksidasyonu ile organel içeriğinin (mitokondrial matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınması. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınmaları ile hücre içi proteolizin hızlanması doku hasarının şiddetlenmesi.

*Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan K^{+} Mg^{+2} konsantrasyonlarının değişmesi buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonu.

*Lipit peroksidasyonunun yıkılım ürünü olan malondialdehidin, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturması tiyol grupları ile etkileşim. Bu şekilde oluşturduğu protein fragmentasyonu polimerizasyonunun yanı sıra MDA'nın mutajenik etkisi de gösterilmiştir. Lipit Karboksilasyonu Reperfüzyonda ortaya çıkan serbest radikallerin etkisi ile oluşan lipit radikali, dokuda artmış bulunan karbondioksit ile reaksiyona girerek lipit karboksil radikalini oluşturmaktadır. Karboksil radikali, lipit peroksidasyonu kadar yaygın olmasa da membran hasarına katkıda bulunmaktadır [Reaksiyon 12, 13, 14].



Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de doğadaki lipit peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [45].

2.5. Serbest Radikaller ve Toksik Etkileri

Serbest radikal, orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan herhangi bir bileşiktir. Bu radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif ve toksik bileşiklerdir. Serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını eşleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışmaktadırlar [28,29,46].

Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler oksidan veya "prooksidan" olarak tanımlanır. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamına "prooksidan veya oksidan madde" olarak tanımlanmıştır [47,48].

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir [49-51].

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller, radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksosite ortaya çıkmaz. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyarımla fagositik

hücrelerin aktivasyonu, biosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır. Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkar. Özellikle eklem ve beyin omurilik sıvılarında antioksidan savunmanın yetersiz olması nedeniyle, bu bölgelerde serbest radikallere bağlı yıkımın daha fazla olduğu gözlenmektedir [52]. Hücreler kendilerini serbest radikallerin oluşturacağı hasarlardan korumak için enzimler, antioksidanlar ve serbest radikal yok edicileri gibi detoksifikasyon sistemlerine bağlıdırlar. Serbest radikal üretimi, striatumda muhtemelen en çok bulunan nöron tipi olan GABAerjik nöronlarda hasar yapabilir [9,10]. Organizmada sürekli serbest radikal üretimi devam ettiğinden bu serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı da birçok savunma sistemi işlemektedir [53].

Oksijenli solunum yapan canlılarda, serbest oksijen radikallerinin oluşması kaçınılmazdır. Bu oksijen kaynaklı radikaller; süperoksit radikali, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikalleridir. Bu radikaller özellikle hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbonhidrat, lipit ve DNA gibi molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Bilhassa hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri bunlar için çok iyi bir hedefdir. Reaktif madde miktarındaki artışların hücresel homeostazisi olumsuz etkilemesini vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve “antioksidan” olarak isimlendirilen bazı faktörler önleyebilir.

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipit peroksidasyonu hızlandırır. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır [54]. Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipit, glikolipit, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipit peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Lipit peroksitler, indirgenmiş glutatyon (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim olan GS-peroksidaz tarafından lipit alkollere çevrilerek inaktive edilirse de, gerek süperoksit gruplarıyla fazla

miktarda lipit peroksidlerin şekillendirilmesi ve gerek selenyum eksikliği ve gerekse ortamdaki GSH'nın tükenmesine neden olabilen dietilmaleat, dioksin gibi maddelerin bulunması, lipit hidroperoksidlerinden serbest lipit grupların oluşmasına yol açar. Serbest lipit grupları da, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipit hidroperoksidlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarı meydana getirirler. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler hemostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı meydana getirirler [55, 56].

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinogeniktir [57, 58].

Oksidatif stres; kalıtsal bozukluklar, hasarlar, ağır fiziksel aktiviteler, çevredeki fiziksel ve kimyasal (ozon, sigara dumanı ve güneş ışığı) etkilere maruz kalma ile dengesiz beslenme gibi çeşitli şartların artmasıyla meydana gelir. Strese yol açan bu faktörler ise serbest oksijen radikallerini (SOR) büyük ölçüde arttırmaktadır [59]. Son zamanlarda biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin birçok hastalıkla ilişkili olduğunun tesbit edilmesi özellikle antioksidanlara karşı olan ilgiyi arttırmıştır [36].

Sonuç olarak; organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanım sayesinde, fizyolojik aktivitenin doğal sonucu olarak serbest radikal nitelikli biyokimyasal ürünleri "oksidan-antioksidan denge" olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmayı başarır. Tehlikeli olan durum, radikallerin varlığından daha çok oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin oksidanlar lehine bozulmasıdır [47, 59, 60].

2.6. Antioksidanlar ve Metabolizma için Önemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlara kısaca “antioksidanlar” denilmiştir. Antioksidanlar bu amaçla reaktif maddeleri ve reaksiyonlarını bir dengede tutabilmek üzere sürekli aktivite gösterirler [61]. Organizmada süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenirken, antioksidan olarak bilinen bileşikler de oksijen radikallerinin yok edilmesini sağlarlar. Bu kimyasal bileşikler arasında A, E, C vitaminleri ve selenyum önemli bir rol oynamaktadır [62].

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin C, E, A, betakaroten, metallothionein, poliaminler, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q-10, ürat, ubiquinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, GSH, glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrik oksit sintaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz bu gruba girer. Diyetle alınan alfa-tokoferol lipit peroksidasyona karşı korur ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir [63]. Bunlara karşın Krajcovicova ve arkadaşları [64], Vitamin C ve E'nin artmış lipit peroksidasyon ve serbest radikallere karşı savunmada yetersiz kaldığını belirtmişlerdir. İnsanlarda serebrovasküler hastalıklarda kullanım alanı bulan idebenonun, serbest radikal yokedicisi gibi etki gösterdiği ve lipit peroksidasyona karşı mitokondrial membranı koruduğu belirlenmiştir. Yine anestezi dozlarında kullanılan propofolun, hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu sınırlandırabildiği veya durdurabildiği gösterilmiştir [65].

Amaç: Aminoimidazolinler birçok ilacın bileşiminde bulunmaktadır. Bu nedenle, sentezlenmiş ve karakterize edilmiş orijinal N-(5-fenil [1,3,4]-tiyadiazol-2-il)-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) amin'in ratların antioksidan vitaminleri (A, E ve C) ve lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA)'in düzeylerine etkilerini belirlemek ve bu parametreler arasındaki ilişkileri araştırmak amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

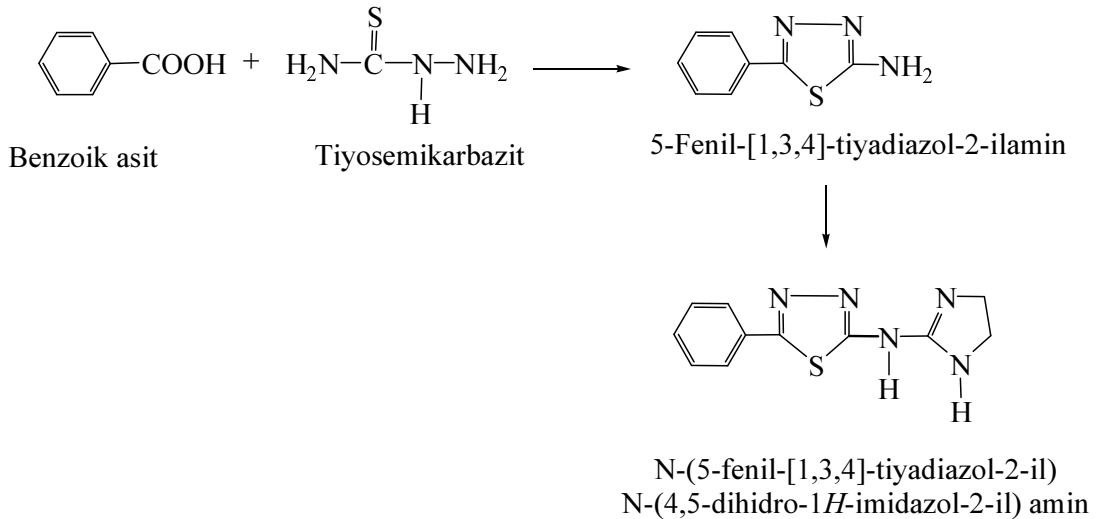
3.1. Hayvan Materyali

Araştırmalarımızda 12-14 haftalık ortalama 250 gr ağırlığında erişkin Wistar cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deneylerimizde kullandığımız hayvanlara 12 saat ışık, 12 saat karanlık olarak ışık düzenlemesi yapılan bir ortam hazırlandı. Yine ortamın ısısı oda şartlarında sabit tutuldu (24-26 °C).

Elazığ Yem Fabrikasından hayvanların yemi (ad libitum), Elazığ şehir şebekesinden de suları sağlandı. Uygulamalar aynı saatte yapıldı. Uygulamalarda kullanılan ratlar doğumdan itibaren sürekli kontrol edilerek hastalık şüphesi olabilecek ratlar gruplara alınmadı. Deneyler boyunca rat ölümü gözlenmedi.

3.2. Grupların Oluşturulması

Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin olmak üzere 23 adet rat kullanıldı. 2-aminoimidazolin %75'lik etil alkolde çözüldü. 25 mg kg⁻¹ dozda 250 µL olarak ratlara aynı saatte olmak üzere güneşirı deri altına enjekte edildi. Kontrol grubuna da aynı şekilde 250 µL %75 ethanol deri altına güneşirı enjekte edildi. Bu çalışmada formülü görülen sentezlenmiş ve karakterize edilmiş olan orjinal 2-aminoimidazolin [1] kullanıldı.



Şekil 7. N-(5-fenil[1,3,4]-tiyadiazol-2-il)-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2il) amin (2-aminoimidazolin) sentezi.

3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Uygulamalardan sonra hayvanlar eter ile anestezi yapılarak göğüs kafesleri açıldı. Kalplerinden yeterli miktarda (4-8 mL) kan alındı. Polietilen tüplere alınan kan örnekleri santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç üç gün içerisinde analizlendi. Serum polietilen tüplerde, karaciğer ve böbrek örnekleri ise alüminyum folyo ile sarılarak analizleninceye kadar -20 °C'da muhafaza edildi.

3.4. Doku Örneklerinin (Karaciğer ve Böbrek) Hazırlanması

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

3.5. Metot

3.5.1. A ve E Vitamini Tayini

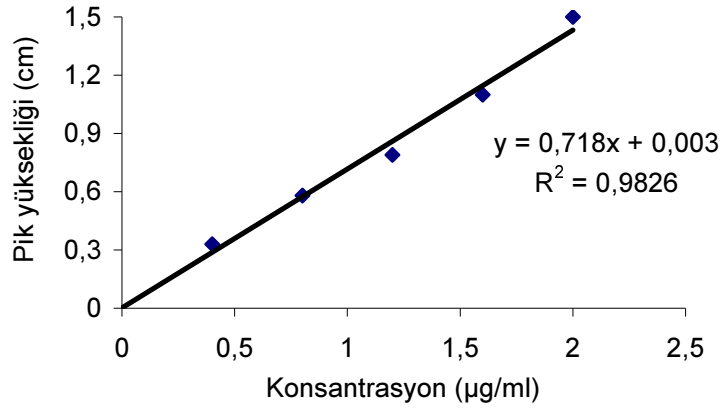
Derin dondurucudan alınan serum, karaciğer ve böbrek örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra, serum örneğinden 0.3 ml, karaciğer ve böbrek dokuları ise homojenizatörde iyice homojen hale getirildikten sonra her birinden 0.2 gram tartılarak her bir plastik tüpe alındı. Her bir tüp üzerine 2 ml etanol ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Süzülerek ayrılan süzüntü üzerine 0.3 ml n-hegzan ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Daha sonra 4000 devir/dk'da 3 dakika santrifüjlenerek üstteki hegzan fazı ayrıldı. Her bir örnek için hegzanla ekstraksiyon işlemi iki defa tekrarlandı. Böylece, serum içindeki A ve E vitamininin tamamı hegzan fazına alındı. Ayrılan hegzan fazı azot gazı altında kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler tekrar 0.15 ml % 100 metanolde çözülerek analize hazır hale getirildi. Bu metanol çözeltisinden 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de Techsphere ODS-2 (5 µm partikül and 80 °A por büyüklüğü) kolon (250x4.6 ID)'unda hareketli faz olarak metanol: asetonitril: kloroform (47: 42: 11) karışımı kullanıldı. Vitamin A (retinol) 326, vitamin E (α-tokoferol) ise 296 nm'lik dalga boylarında tayin edildi [66-68]. Geri kazanım değerleri E vitamini için % 98,0 ve A vitamini için % 97.5 olarak hesaplandı.

A ve E vitamin miktarlarını belirlemek için her birinin ayrı ayrı değişik konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanarak bu çözeltilerin pik yükseklikleri belirlendi. Daha sonra belirlenen bu pik yüksekliklerine karşı derişim (konsantrasyon) grafiğe alınarak çalışma

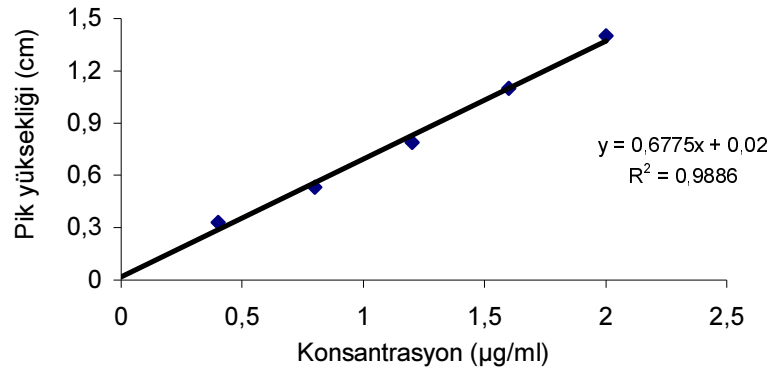
grafığı çizildi (Şekil 8 ve Şekil 9). Her çalışmada yeni bir çalışma grafığı çizilerek o çalışmanın vitamin verileri o günkü çalışma grafığının doğru denkleminde hesaplandı. Doğru denkleminde y yerine örneğin pik yüksekliği yazılarak x bulundu ve eğer seyreltme yapılmışsa seyreltme faktörü ile çarpıldı.

Geri Kazanım: Geri kazanım için serum örneği üzerine konsantrasyonu bilinecek şekilde belirlenecek parametrelerin standartları ilave edildi. Her bir numune için anlatılan ön işlemler tekrarlandı. Standart çözeltisi ile birlikte standart ilaveli serum örnekleri ve standart ilave edilmemiş serum örnekleri aynı şartlarda analizlendi. Standart ilaveli örneklerin pik yüksekliklerinden standartlara ait pik yükseklikleri çıkarıldı ve standart ilave edilmemiş serumun pik yüksekliğine bölünerek geri kazanımlar aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Standart ilaveli serumun pik yüksekliği} - \text{Standartın pik yüksekliği}}{\text{Normal serumun pik yüksekliği}} \times 100$$



Şekil 8. Vitamin A'nın çalışma grafığı ve doğru denklemi.



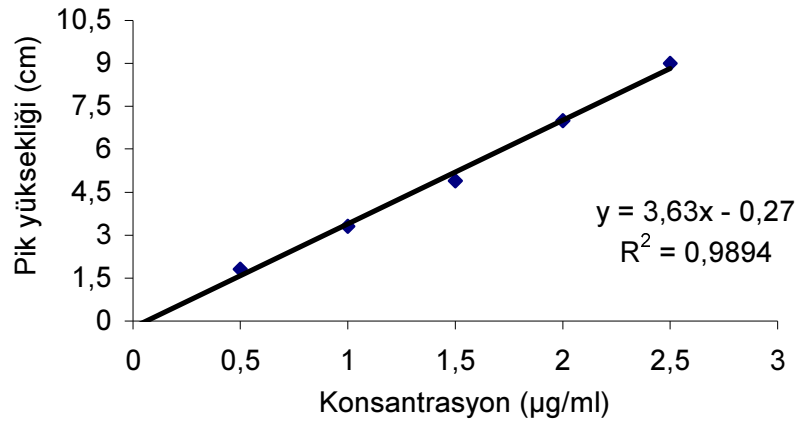
Şekil 9. Vitamin E'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.

3.5.2. C Vitamini Tayini

Oda sıcaklığına kadar ısınmış örneklerden serumdan 0.3 ml, homojenize hale getirilmiş karaciğer ve böbrek örneklerinden ise 0,25 gram tartılarak plastik tüplere alındı.

Serum örnekleri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.3 ml, karaciğer ve böbrekler örneklerinin her biri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.5 ml ilave edilerek 2 dk vortekslendi ve proteinler çöktürüldü. Sonra tüm örnekler ultrasonik su banyosunda 50 °C'de 5 dk bekletilerek iyice parçalanma gerçekleştirildi. Daha sonra serum örneklerinin toplam hacmi saf su ile 2 ml'ye, karaciğer ve böbrek örneklerinin hacmi ise saf su ile 5 ml'ye tamamlanarak, 4500 rpm 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen çözeltiden çökelek ve süzütünün ayrılması sağlandı [69]. Daha sonra üstteki süzüntüden 20 µL alınarak HPLC'de Supelcosil LC-18-DB kolonunda (3 µm partikül büyüklüğü 250 x 3.9 ID) mobil faz : 3.7 mM KH₂PO₄ (pH: 4, H₃PO₄ ile) tamponu 1ml dk⁻¹ akış hızında, 245 nm dalgaboyu kullanılarak C vitamini tayin edildi [70]. C vitamini için geri kazanım % 98.6 olarak hesaplandı.

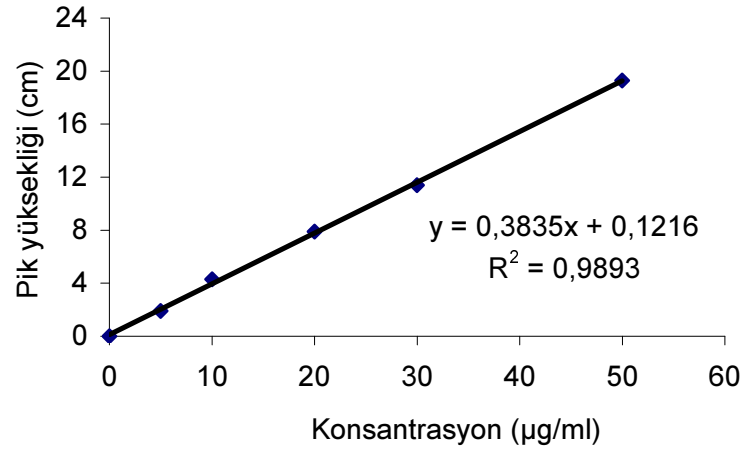
Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan stok C vitamini çözeltilerinin pik yükseklikleri ölçülerek çalışma grafiği çizildi (Şekil 10). Çalışma grafiğinin doğru denklemi yardımıyla C vitamini miktarları belirlendi. Serum örnekleri 5 kat seyreltiği için seyrelme katsayısı 5 kabul edildi. Şekil 10'da görüleceği üzere konsantrasyon-pik yüksekliği çalışma grafiğinde elde edilen doğrusallık kabul edilebilir limitler içerisindedir.



Şekil 10. Vitamin C'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi.

3.5.3. MDA Tayini

Oda sıcaklığına kadar ısınmış örneklerden serumdan 0.30 ml, homojenize hale getirilmiş karaciğer ve böbrek örneklerinden ise 0.25 g tartımlar plastik tüplere alındı. Serum örnekleri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.3 ml, karaciğer ve böbrekler örneklerinin her biri üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.5 ml ilave edilerek 2 dakika boyunca vortekslendi ve proteinler çöktürüldü. Sonra tüm örnekler ultrasonik su banyosunda 50 °C'de 5 dk bekletilerek iyice parçalanma gerçekleştirildi. Daha sonra serum örneklerinin toplam hacmi saf su ile 2 ml'ye, karaciğer ve böbrek örneklerinin hacmi ise saf su ile 5 ml'ye tamamlanarak, 4500 rpm 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen çözeltiden çökelek ve süzüntünün ayrılması sağlandı. Daha sonra üstteki süzüntüden 20 µL alınarak HPLC'de Supelcosil LC-18-DB kolonunda (3 µm partikül büyüklüğü ve 250 x 3.9 ID) mobil fazı 30 mmol KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%65-%35, H₃PO₄ ile pH=4) olan ve akış hızı 1.3 ml/ dk'ya ayarlanarak 254 nm HPLC'ye enjekte edildi [71]. MDA standardı olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropanın (TEP) çözeltisi kullanıldı ve MDA için geri kazanım % 98.2 olarak belirlendi.



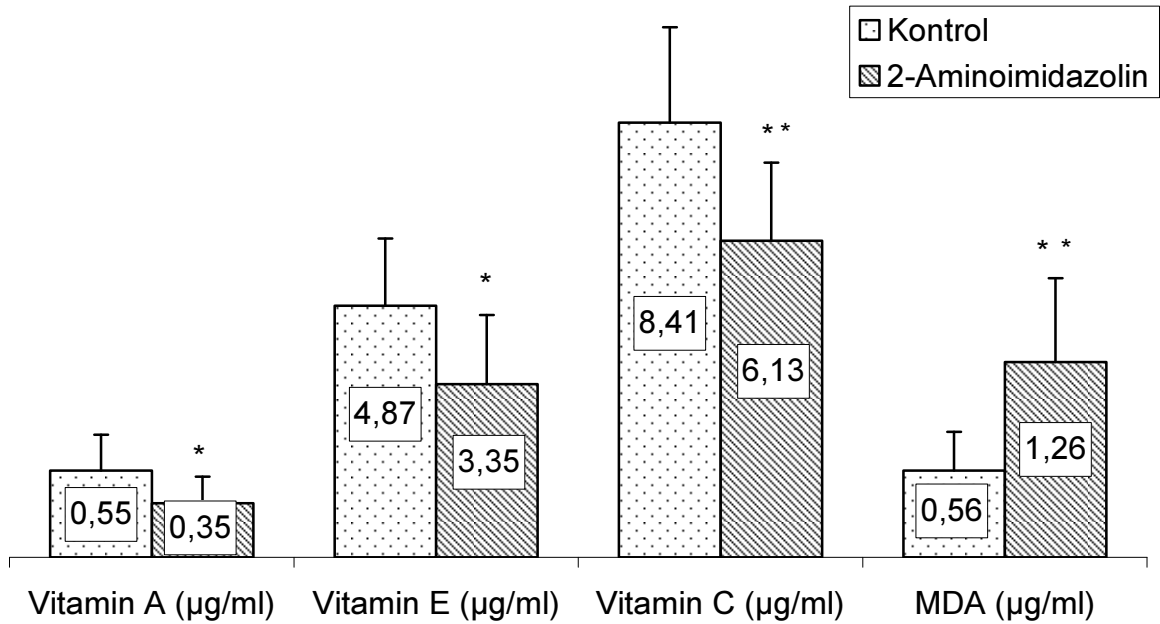
Şekil 11. MDA'nın çalışma grafiği ve doğru denklemi.

4. BULGULAR

Tablo 1 ve Şekil 12’de görüleceği gibi, 2-aminoimidazolin enjekte edilmiş ratların serum antioksidan vitaminlerden A ve E vitaminlerinin miktarları kontrol grubuna göre düşük ($p < 0.05$) bulunurken, C vitamini kontrol grubuna göre düşük ($p < 0.005$) bulundu. 2-aminoimidazolin grubunun MDA seviyelerinin ise kontrol grubuna göre arttığı ($p < 0.005$) gözlemlendi.

Tablo 1. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların serum antioksidan vitaminleri (A, E ve C) ve MDA miktarları. Sonuçlar \pm SD ile verilmektedir.

| | Kontroller (11) | 2-aminoimidazolin (n:12) | p değerleri |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------|
| A vitamini ($\mu\text{g/ml}$) | 0.55 ± 0.23 | 0.35 ± 0.17 | < 0.05 |
| E vitamini ($\mu\text{g/ml}$) | 4.87 ± 1.30 | 3.35 ± 1.34 | < 0.05 |
| C vitamini ($\mu\text{g/ml}$) | 8.41 ± 1.85 | 6.13 ± 1.51 | < 0.005 |
| MDA ($\mu\text{g/ml}$) | 0.56 ± 0.25 | 1.26 ± 0.54 | < 0.005 |

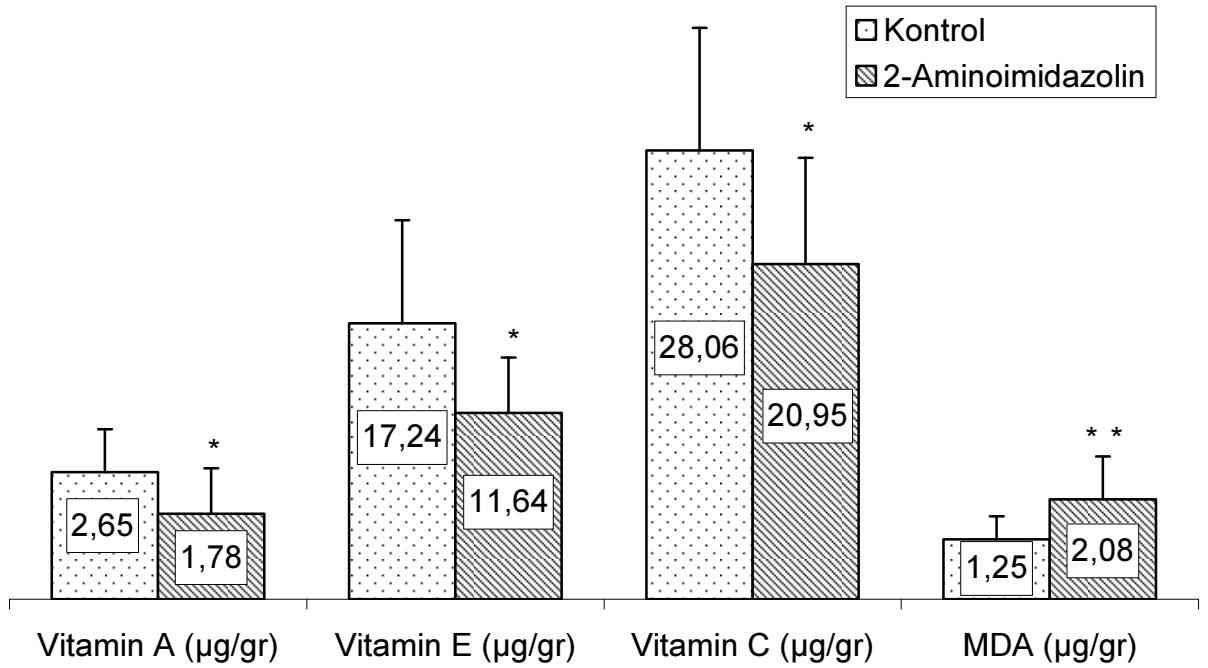


Şekil 12. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların serum antioksidan vitaminleri (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği.

Tablo 2 ve Şekil 13'te görüldüğü üzere, 2-aminoimidazolin enjekte edilmiş ratların karaciğer antioksidan vitaminlerin (A, E ve C) miktarları kontrol gruplarına göre düşük ($p < 0.05$) olduğu belirlendi. MDA miktarlarının ise kontrol grubuna göre arttığı ($p < 0.005$) gözlemlendi.

Tablo 2. 2-Aminoimidazolin enjekte edilmiş ratlar ve kontrol gruplarının karaciğer dokusu antioksidan vitaminlerin (A, E ve C) ile MDA miktarları. Sonuçlar \pm SD ile verilmektedir.

| | Kontroller (n:11) | 2-aminoimidazolin (n:12) | p değerleri |
|--|-------------------|--------------------------|-------------|
| A vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 3.02 ± 1.02 | 2.19 ± 0.77 | < 0.05 |
| E vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 21.93 ± 6.79 | 14.23 ± 5.48 | < 0.05 |
| C vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 34.06 ± 7.33 | 27.73 ± 6.67 | < 0.05 |
| MDA ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 1.05 ± 0.42 | 1.98 ± 0.74 | < 0.005 |

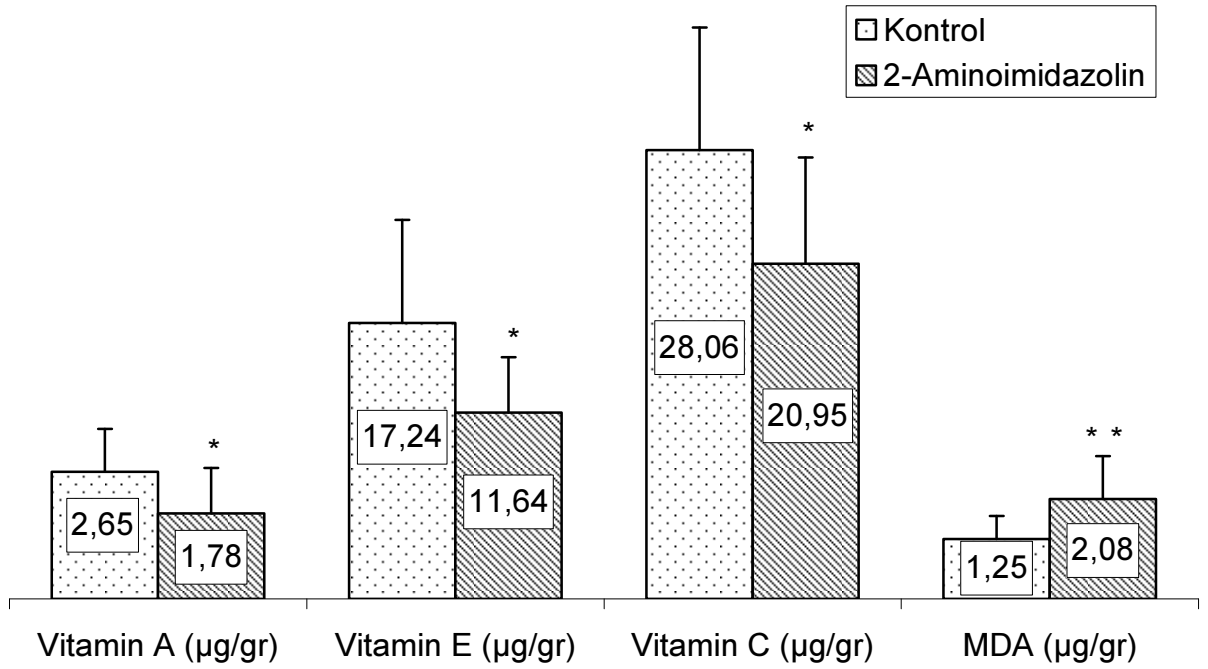


Şekil 13. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların karaciğer dokusu antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği.

Tablo 3 ve Şekil 14’de görüldüğü üzere, 2-aminoimidazolin enjekte edilmiş ratların böbrek antioksidan vitaminlerin (A, E ve C) miktarları kontrol gruplarına göre düşük ($p<0.05$) olduğu belirlendi. MDA miktarlarının ise kontrol grubuna göre arttığı ($p<0.05$) görüldü.

Tablo 3. 2-Aminoimidazolin enjekte edilen ve kontrol grubu ratların böbrek dokusu antioksidan vitaminlerin (A, E ve C) ile MDA miktarları. Sonuçlar \pm SD ile verilmektedir.

| | Kontroller (n:11) | 2-aminoimidazolin (n:12) | p değerleri |
|--|-------------------|--------------------------|-------------|
| A vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 2.65 ± 0.89 | 1.78 ± 0.95 | < 0.05 |
| E vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 17.24 ± 6.90 | 11.64 ± 3.47 | < 0.05 |
| C vitamini ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 28.06 ± 7.65 | 20.95 ± 6.65 | < 0.05 |
| MDA ($\mu\text{g}/\text{gr}$) | 1.25 ± 0.48 | 2.08 ± 0.86 | < 0.05 |



Şekil 14. Kontrol grubu ve 2-aminoimidazolin enjekte edilen ratların böbrek dokusu antioksidan vitaminler (A, E ve C) ve MDA düzeylerinin grafiği.

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrenel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrenel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [72]. Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde oksijenin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimiyle karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmemektedir. Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonunun az ya da çok parçalanması ile sonuçlanan hücre lipitlerinin peroksidasyonudur [41].

Lipit peroksidasyon yapıları hücre membranlarının dejenerasyonuna neden olan serbest radikallere sahiptirler. Bu serbest radikaller hücre yapısında bulunan yağ, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi önemli hücre yapılarını etkilerler. Lipit peroksidaz yapıları çok hızlı bir biçimde hücrede bozulup reaktif karbon bileşiklerini oluştururlar. Oluşan önemli karbon yapılarından biri olan MDA, lipit peroksidasyon sisteminde indikatör olarak rol alır [73, 74].

Antioksidan maddelerden β -karoten ve retinol antioksidan aktivitesini serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ve ortamdaki radikalleri toplayarak gerçekteştirmektedir [75]. Vitamin C'nin singlet oksijen, süperoksit, hidroksil, hidroperoksil, lipit peroksil ve alkoksil radikallerini ortamdan temizleyerek antioksidan etkisini gösterebileceği bildirilmektedir [76]. Vitamin E ise antioksidan aktiviteyi lipit peroksidasyonunun erken aşamasında serbest radikal türlerini yok ederek ya da oluşumlarını engelleyerek ve serbest radikalleri kararlı hale getirip peroksidasyon zincirini kırarak göstermektedir [77].

Bulgularımızda 2-aminobenzimidazolin enjekte edilen ratların serum, karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Bu durum oksidatif stresin olduğunun göstergesidir. α -Tokoferol (vitamin E) ortamda bulunan serbest radikalleri tutarak lipit peroksidasyon reaksiyonunu durdurur. Bu sistemde α -tokoferol yapısı α -tokoferoksil radikaline dönüşür. C vitamini α -tokoferoksilden hareketle tekrar α -tokoferol'ü oluşturur [78]. Önemli antioksidanlardan biri olan E vitamini selenoproteinler tarafından taşınır ve ortamda bulunan serbest radikalleri temizler. 2-aminobenzimidazolin enjekte edilen ratların serum karaciğer ve böbrek A, E ve C vitamini miktarlarında kontrol grubuna göre azalma belirlendi. C vitamini nitrit ve nitrattan nitrozamin yapısının oluşumunu engeller [79]. Ayrıca C vitamini hücrenin büyümesini ve bölünmesini inhibe eder. Bu işlemi hidrojen peroksit oluşumuna katkı

sağlayarak yapar [80]. Bulgulardan 2-aminobenzimidazolinin oksidatif stres oluşturarak serbest radikal üretimini artırdığı ve bu radikal artışına da bağlı olarak lipidlerin peroksidasyona uğrayarak son ürünlerden biri olan MDA miktarını artırdığı görülmektedir. Bilindiği gibi serbest radikalleri antioksidan vitaminler etkisiz hale getirmektedir. Ratların karaciğer, böbrek ve kan serumdaki MDA miktarındaki artış, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde antioksidan vitaminlerin harcanmış olmalarıyla açıklanabilir.

Böbrekler başlıca sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi, vücut ihtiyacından fazla olan inorganik maddelerin ve metabolik son ürünlerin uzaklaştırılması, vücudun ihtiyacı olan maddelerin vücutta tutulması, toksik maddelerin atılması gibi pek çok göreve sahiptir. Yapılan çalışmada, böbrekler de dahil olmak üzere serum ve karaciğerde antioksidan vitaminlerde gözlenen istenmeyen değişimler, olası serbest radikal ataklarından kaynaklanabilir. Bu da, serbest radikallerin antioksidan savunma mekanizmalarının koruyucu etkilerini aşacak şekilde fazla oluştuklarını göstermektedir. Çünkü, serbest radikallerin metabolizma üzerindeki zararlı etkileri bu mekanizmanın aşılması sonucunda şekillenmektedir.

Malondialdehit ve vitaminlerde gözlenen değişimler, hücrelerde oksidatif stres ile ilgili yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir. Oksidatif hasara bağlı olarak şekillenen lipid peroksidasyonu sonucunda peroksidasyon ürünlerinde artma, glutatyon miktarlarında azalmaların olacağı literatürde bildirilmektedir [81]. Araştırmamızda elde edilen bulgular 2-aminobenzimidazolinin de oksidatif strese neden olduğuna işaret etmektedir çünkü serum, karaciğer ve böbrekte MDA düzeyinde artış gözlenmiştir. Bu durum literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

Çeşitli hastalıkların tedavisi süresince kullanılan ilaçlardan kaynaklanabilecek olan oksidatif stres tehditine karşı bu ilaçlara ek olarak hem koruyucu hem de tedavi amaçlı olarak antioksidan uygulamalarının da göz önünde bulundurulmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır. Yapılan bu çalışmada kullanılan 2-aminobenzimidazolinin de bazı ilaçların yapısında bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle 2-aminobenzimidazolin veya türevlerini ihtiva eden ilaçların kullanımında antioksidan vitaminlerle birlikte alınmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Servi, S., 2002, The Efficient Synthesis of 2-Arylamino-2-imidazolines, 2-Heteroaryl-Substituted Benzimidazoles, and Their Morpholine-4-ylmethyl Derivatives , S. Afr. J. Chem. , 55, 119-123.
2. Lopez-Rodriguez M.L., Benhamu B., Morcillo M.J., et al. 1999, Benzimidazole derivatives. 2. Synthesis and structure-activity relationships of new azabicyclic benzimidazole-4-carboxylic acid derivatives with affinity for serotonergic 5-HT₃ receptors , J. Med. Chem., 42, 24, 5020-5028.
3. Mundla, R.S., 2000, A novel method for the efficient synthesis of 2-arylamino-2-imidazolines, Tetrahedron Letters, 41, 6563-6566.
4. Syzman'ska E. and Kiec'-Kononowicz K., 2002, Antimycobacterial activity of 5-arylidene aromatic derivatives of hydantoin, Farmaco, 57, 355-362,
5. Bishop, M.J. Barvian, K.A. Berman, J. Bigham, E.C. Garrison, D.T. Gobel, M.J. Hodson, S.J. Irving, P.E. Liacos, J.A. Navas, F. III, Saussy, D.L. Speake, Jr. and J.D., 2002, Bioorganic & Chemistry Letters, 471.
6. Paglietti, G., Pirisi, M., A., Loriga, M., Grella, G., E., Sparatore, F., Satta, M., Manga, P., 1998, "Preparation and pharmacological activity of 2-(4'R')phenyl-5R-benzimidazoles and 2-(4'-pyridinyl)-5R benzimidazoles. Analgesic activity and effects on acquisition of a conditioned avoidance response" Farmaco Ed.Sci., 43, 3, 215-226.
7. Dunwell, D.,W., Evans, D., Smith, C., E., Williamson, W., R., N., 1975, Synthesis and anti-inflammatory activity of some 2-substituted- α -methyl-5-benzimidazoleacetic acids, J. Med. Chem., 18, 7, 692-694.
8. Kusano, A., S., Matsui, S. , N., Muiramatsu, Kawada, S., 1978, Substituteol benzimidazole fungicides , Japan Kokai Appl., 78, 29, 934-1078.

9. I.V.Komssarov, I.T., Flippov, T.M.Prokop'eva ,V.Dalli,L.M.Litvineko, Yu.S. Simenenko, 1982, 'Effect of structural factors on the spasmolytic activity of some imidazole and benzimidazole derivatives'', *Khim. Farm. Zh.*, 16, 5, 570-573.
10. Haskell, T., H., Peterson, F., E., Watson, D., Plessas, N., R., Culbertson, T., 1970, Nevraminidose inhibition and viral chemotherapy, *J. Med. Chem.*, 13, 4, 697-704.
11. Abuzar, S., Sharma, S., 1982, Synthesis of substituted benzimidazoles as potential anthelmintics, *Arch. Pharm*, 315, 10, 866-871.
12. Mousseron, M., Kamenka, J., M., Stenger, A., 1968, Active structures in the 2-aminoethyl benzimidazoles series, *J. Med. Chem.*, 11, 889-894.
13. Schenone, S., Brullo, C., Bruno, O., et al., 2006, New 1,3,4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities, *Bioorg Med. Chem.*, 14, 6, 1698-1705.
14. Servi, S., Genc, M., Gür, S., Koca, M., 2005, The synthesis and antimicrobial activity of some new methyl *N*-arylthiocarbamates, dimethyl *N*-aryldithiocarbonimidates and 2-arylamino-2-imidazolines, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 687–693.
15. Shakya, A.K., Mishra, P., et al., 1998, Synthesis and biological evaluation of novel 2-[substituted acetyl]-amino-5-alkyl]-amino-5-alkyl-1,3,4-thiadiazoles, *Arch. Pharm. Res.*, 21, 6, 753-758.
16. Kritsanida, M., Mouroutsou, A., Marakos, P., et al., 2002, Synthesis and antiviral activity evaluation of some new 6-substituted 3-(1-adamantyl)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles, *Farmaco*. 57, 3, 253-257.
17. Ateş, Z., Suzen, S., Büyükbingöl, E., Can-Eke, B., Iscan, M., 1998, Effects of a benzimidazole compound on mono oxygenase activities, *Y. Toxicol. Science*, 23, 1, 53-68.
18. Parikh, V., Welch, W.M., Schmidt, A.W., 2003, Discovery of a Series of (4,5 Dihydroimidazol-2-yl)-biphenylamine 5-HT7 Agonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 269–271

19. Navas F., Bishop M.J., Garrison D.T, Hodson, S.J., Speake, J.D., Bigham, E.C., Drewry, D.H., Saussy, D.L., Liacos, J.H., Irving, P.E., and Gobel, M.J., 2002, 2 (Anilinomethyl)imidazolines as 1A Adrenergic Receptor Agonists: 20-Heteroaryl and 20-Oxime Ether Series, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12, 575–579.
20. Sergueeva, N., Evstigueeva, R., Riviere, M., Lattes, A., 1991, İmidazole derivatives, platelet aggregation inhibitors, *Boll. Chim. Form.*, 133, 3, 151-155.
21. Tanaka, A., Ito, K., Nishino, S., Motoyama, Y., Takasugi, H., 1991, 2Studies on anti-platelet agents.II.Synthesis and platelet inhibitory activity of 5-methyl-4-(3-pyridyl)-2-(substituted benzimidazol-5-yl) imidazoles, *Yao Xue Xue Bao.*, 26, 10, 741-746.
22. Srivastava, Y.K., Batra, S., Gupta, S., Katiyar, Y.C., Srivastava, V.M., 1991, Effects of anthelmintics on the antioxidant system of *Nippostrongylus brasiliensis*, *Farmakol.Toksikol.* 54, 6, 42-44.
23. Dardonville, C., Brun, R., 2004, Bisguanidine, bis(2-aminoimidazoline), and polyamine derivatives as potent and selective chemotherapeutic agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Synthesis and in vitro evaluation, *J. Med. Chem.*, 47, 2296-2307.
24. Keha. E., Küfrevioğlu. Ö.İ., 1997, *Biyokimya Şafak Yayınevi.* 151-157. Erzurum.
25. Tüzün. C., 1997, *Biyokimya. 3. Baskı. Palme Yayıncılık.* 151-187. Ankara.
26. Mayes. P.A., 2000, Structure and function of lipid soluble vitamins. *Harper's Biochemistry.* Appleton and Lange, Stamford-Connecticut, 642-652.
27. Özer, N., 1996, *Temel Biyokimya. Editörler (Onat. T., Emerk. K.) Saray Medikal Yayıncılık. İzmir.* 785-820.
28. Kılınç. K., 1985, Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları. Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi*, 10, 60-89.
29. Akkuş. İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimoza yayınları.* Konya.

- 30.** Zintzen, H., 1978, A Summary of The Vitamin E/Selenium Problem in Ruminants, News and Reviews. Roche. 1-18.
- 31.** Erenel, G., Erbaş, D., ve Akıcıoğlu, A., 1992, Serbest Radikaller ve Antioksidant Sistemler, Gazi Tıp Dergisi. 3, 243-250.
- 32.** Chow, C.K., 1991, Vitamin E and oxidative stres, Free Radic. Biol. Med., 11, 2, 215-232.
- 33.** Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997, Biyokimya. Lippincotts Illustrated Reviews Serisinden, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti. 320-342, Çapa-İstanbul.
- 34.** Underwood, E.J., 1997, Trace elements in human and animal nutrition, Acedemic Press, NewYork, 302-346.
- 35.** Oldfield, J.E., 1987, The two faces of selenium, J. Nutrition, 117, 2002-2008.
- 36.** Diplock, A.T., 1991, Antioxidant nutrients and disease prevention: An Overview, Am. J. Chim Nutr., 53, 1895-1935.
- 37.** Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., Blanco, I., Millan, I., Rojas-Hidalgo, E., 1998, Carotenoids, Retinol and Tocopherols in Patients with İnsulin-Dependent Diabetes Mellitus and Their İmmediate Relatives, Clin. Sci.(Colch)., 94, 2, 189-195.
- 38.** Halliwell, B., 1993, Free radicals and vascular disease: how much do we know?, BMJ, 307, 885.
- 39.** Akgül, E., İlhan, N., İlhan, N., Halifeoğlu, İ., Tip II diabetes mellitusda lipit peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri, Biyokimya Dergisi, 1999, 24, 3, 28-33.
- 40.** Draper, H.H., and Hadly, M., 1990, Malondialdehyde determination as index of lipit peroxidation. Methods in Enzymology, 186, 421-431.
- 41.** Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Rad. Biol. and Med., 31, 11, 1287-1317.

42. Halliwell, B., Gutteridge, W.M.C., 1999, Free radicals in biology and medicine, Oxford Medicine Press, 246-351.
43. Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U., 2000, Serbest radikaller, Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi, 1, 52-58.
44. İşlekel H., İşlekel S., Güner G., Biochemical Mechanism And Tissue Injury Of Cerebral Ischemia And Reperfusion, <http://www.Med.Ege.Edu.Tr/Norolbil/2000/Nbd09200.html> .
45. Köse, K., Doğan, P., 1992, Lipit peroksidasyonu, Erciyes Üniv. Tıp Dergisi, Ek 1. 340-350.
46. Gutteridge, J.M.C., and Halliwell, B., 1988, The Deoxsiriboz Assay : An Assay Both for Free Radical and For Site- Specific Hydroxyl Radical Production, Biochem., 253, 932.
47. Karlsson, J., Ronneberg, R., Semb, B., 1997, Vitamins Q and E, extracorporal circulation and hemolysis. Mol. Cell. Biochem., 173, 1-2, 33-41.
48. Mecoci, P., Beal, M.F., Polidori, M.C., Cherubini, A., Chiosne, F., 1997, Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged human brain, Mol. Chem. Neuropathol. 31, 1, 53-64.
49. Janssen, Y.M.W., Houten B.V., Borm P.J.A., Mossman B.T., 1993, Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. Lab. Invest., 69, 261-274.
50. Özdem S.S., Sadan G., 1994, Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg., 11: 63-71.
51. Sinclair A.J., Barnett A.H., Junec J., 1990, Free radicals and antioxidant systems in health and disease. British J. Hosp. Med., 43, 334-344.
52. Slater T.F., 1987, Free radicals in tissue injury. Br. J. Cancer., 55, 5-10.
53. Ozturk M., Guzelhan Y., Sayar K., Tuzun U., 2001, Ozturk M., Guzelhan Y., Sayar K., Tuzun U., 2001, Investigation of the plasma malondialdehyde and glutathione levels in children with pervasive developmental disorder. Bulletin of Clinical Psychopharmacology. 11, 3.

- 54.** Mercan U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU Vet Fak Derg., 15 (1-2), 91-96.
- 55.** Facchinetti F., Dawson V.L., Dawson T.M., 1998, Free radicals as mediators of neuronal injury. Cell. Mol. Neurobiol., 18, 667-682.
- 56.** Güven A., Erginsoy S., Kaya N., 2003, Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg., 9, 131-136.
- 57.** Kalender S., Kalender Y., Ögütçü A., Uzunhisarcıklı M., Durak D., Açıkgöz F., 2002, Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. Toxicology, 202, 227-235.
- 58.** Porter N.A., 1984, Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol., 105, 273-283.
- 59.** Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., Tarakçıoğlu, M., 1997, Investigation of MDA formation and antioxidant enzyme activity in stored bloom. Haematologia 28, 4, 233.
- 60.** Aalt, B., Haenen, R.M., Doelman, J.A., 1991, Oxidants and antioxidants : State of the Art. The American Journal of Medicine, 91, 3, 3-13.
- 61.** Byung, P.Y., 1994, Cellular defenses against damage from reactive species. Physiological Reviews, 74, 1, 139-172.
- 62.** Jain, S.K., Levine, S.N., 1995, Elevated lipid peroxidation and vitamin e-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. Free radical biol. Med., 18, 2, 337-341.

- 63.** Swierczynski J., Kochan Z., Mayer D., 1997, Dietary α -tocopherol prevents ehydropiandrosterone induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. *Toxicol. Lett.*, 92, 129-136.
- 64.** Krajcovicova-Kudlackova M., Paukova V., Bacekova M., Dusinska M., 2004, Lipid peroxidation in relation to vitamin C and vitamin E levels. *Cent. Eur. J. Public Health.*, 12, 46-48.
- 65.** Bao Y.P., Williamson G., Tew D., Plumb G.W., Lambert N., Jones J.G., Menon D.K., 1998, Antioxidant effects of propofol in human hepatic microsomes: concentration effects and clinical relevance. *British J. Anaesth.*, 8, 584-589.
- 66.** Çetinkaya, N., and Özcan. H., 1991, Investigation of Seasonal variations in Cow Serum Retinol and β -Carotene by High Performance Liquid Chromatographic Method. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A, 4, 1003-1008.
- 67.** Catignani, G., L., 1983, Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum or Plasma by Liquid Chromatography, *Clin. Chem.*, 29, 708-712.
- 68.** Miller, K., W., Lorr, N., A., Yang, C., S., 1984, Simultaneous Determination of Plasma Retinol α -tocopherol, lycopene, α -carotene and β -Carotene by High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochem.*, 138, 340-345.
- 69.** Cerhata, D., Bauerova, A., Ginter, E., 1994, Determination of Ascorbic Acid in Blood Serum Using High-Performance Liquid Chromatography and its Correlation with Spectrophotometric, *Ceska-Slov-Farm.*, 43, 4, 166-168.

70. Tavazzi, B., Lazzarino, G., Di-Pierro, D., Giardina, B., 1992, Malondialdehyde Production and Ascorbate Decrease are Associated to The Eperfusion of The Isolated Postischemic Rat Heart, *Free-Radic-Biol-Med.*, 13, 1, 75-78.
71. Karatas, F., Karatepe, M., and Baysar, A., 2002, Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, 311, 76-79.
72. Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., Oxidative stress and antioxidants in epilepsy, *Clinica Chimica Acta*, 2001, 303, 19-24.
73. Jacob, R.A., and Burri, B.J., 1996, Oxidative Damage and Defense, *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 985- 990.
74. Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P., 1997, Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress: Reference Interval and Effects of Life-Style Factors, *Clin. Chem.*, 43, 1209-1214.
75. Aalt B., Haenen R.M., Doelman J.A., 1991, Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med.*, 91, 3-13.
76. Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J. Nutr.*, 127, 2060-2064.
77. Thomas M.J., 1995, The Role of Free Radicals and Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Res.*, 27, 122-138.

- 78.** Ognjanovic, B.J., Pavlovic, S.Z., Maletic, S.D., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Radojicic, R.M., Saicic, Z.S., Petrovic, V.M., 2003, Protective Influence of Vitamin E on Antioxidant Defense System in the Blood of Rats Treated with Cadmium, *Physiol. Res.*, 52, 563– 570.
- 79.** Lu, S.H., Ohshima, H., Fu, H.M., Tian, Y., Li, F.M., Blettner, M., Wahrendorf, J., Bartsch, H., 1986, Urinary Excretion of N-Nitrosamino Acids and Nitrate by Inhabitants of High- and Low-Risk Areas for Esophageal Cancer in Northern China: Endogenous Formation of Nitrosoproline and its Inhibition by Vitamin C, *Cancer Res.*, 46, 1485-1491.
- 80.** Maramag, C., Menon, M., Balaji, K.C., Reddy, P.G., Laxmanan, S., 1997, Effect of Vitamin C on Prostate Cancer Cells in vitro: Effect on Cell Number, Viability, and DNA Synthesis, *Prostate*, 32, 188-195.
- 81.** Byung, P.Y., 1994, Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiol. Rev.*, 74, 139-172.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Elazığ ili, Sivrice ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Sivrice’ de tamamladım. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladım.

Erkan YÜKSEK