

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



BAZI BİSMİTHİOL CROWN ETERLERİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAMAZAN ÇALIŞKAN

BALIKESİR, MAYIS - 2017

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BAZI BİSMİTHİOL CROWN ETERLERİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAMAZAN ÇALIŞKAN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Onur TURHAN

Yrd. Doç. Dr. Ümran ALAN

BALIKESİR, MAYIS - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ramazan ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “**BAZI BİSMİTHİOL CROWN ETERLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17.05.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

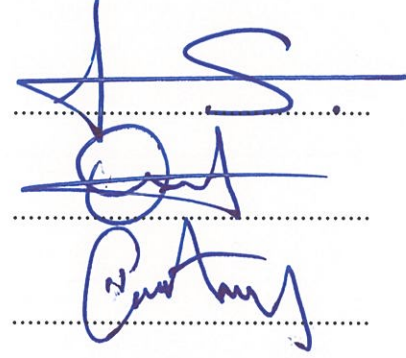
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Serap DOĞAN

Üye
Doç. Dr. Onur TURHAN

Üye
Yrd. Doç. Dr. Ümran ALAN



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması BAP tarafından 2015/188 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

BAZI BİSMİTHİOL CROWN ETERLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
RAMAZAN ÇALIŞKAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, MAYIS - 2017

Bismithiol crown eter içeren bileşiklerin antifungal, antikanser maddesi, antibakteriyel ve antiinflamatuvar ilaçlar, antidepresanlar ve karbonik anhidraz inhibitörleri gibi geniş uygulamaları bulunmaktadır. Bu çalışmada, bazı yeni bismithiol crown eter bileşikler (Z01, Z02, Z03 ve Z04) kullanılarak antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteler araştırılmıştır. Antioksidan kapasite 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bileşiklerin antibakteriyel aktivitelerini belirleyebilmek amacı ile Disk Difüzyon Yöntemi ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) uygulanmıştır. Moleküllerin sitotoksik etkilerinin tespiti için ise MTS Assay ve Tripan Mavisi testleri kullanılmıştır. Sitotoksik testleri için hücreler 72 saat boyunca bileşikler ile muamele edilmiştir. Her 24 saatte bir hücre yaşamlılığı MTS reaktifi eklendikten sonra mikropalakalı spektrofotometre ile ölçülmüştür. Ayrıca, tripan mavisi testi sonucunda yaşayan hücre yüzdeleri de elde edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonucuna göre, Z01 ve Z02 tiyadazol bileşikleri antioksidan aktivite göstermezken, Z03 ve Z04 sırası ile 73.92% ve 2.14% antioksidan aktivite göstermiştir. Antibakteriyel aktivite test sonuçları, *E. coli*'ye karşı tüm bileşiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarının 250-500 µg/mL aralığında olduğunu göstermiştir. *S. aureus* bakterisine karşı oldukça etkili olan Z01 ve Z02 bileşiklerinin 62.5 µg/mL MİK değerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Z03 ve Z04 bileşiklerinin MİK değerleri 125 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin 1:1000 konsantrasyonunda kullanılması halinde lenfosit hücreleri için toksik olmadığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Bismithiol Crown Eter, Antioksidan, Sitotoksisite Antibakteriyel

ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME BISMITHIOL CROWN ETHERS
MSC THESIS
RAMAZAN ÇALIŞKAN
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BİOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, MAY 2017

The compounds containing bismithiol crown ethers have diverse applications as antifungals, anticancer agents, antibacterial, antiinflammatory drugs, antidepressants and carbonic anhydrase inhibitors according to literature. In this study some novel bismithiol crown ether compounds(Z01, Z02, Z03 and Z04) were used to evaluate the antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities. Antioxidant capacity were determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reagent. In order to determine the antibacterial activities of the compounds Disc Diffusion and Minimal Inhibition Concentration (MIC) methods were applied. Moreover, cytotoxicity tests were performed using MTS Assay and the trypan blue test. For the cytotoxicity tests, cells were incubated with the compounds for 72 hours. At the end of the each 24 hour, cell vitality was assessed by measuring the absorbance (490 nm) of each well using a microplate reader for MTS assay. In addition, viability percents of the cells were determined after trypan blue test. According to our results, compounds coded as Z01 and Z02 didn't show antioxidant activity but Z03 and Z04 showed 73.92% and 2.14% antioxidant activities, respectively. Antibacterial activity tests showed that minimal inhibition concentrations against *E. coli* were between 250 and 500 µg/mL for all of the compounds. Z01 and Z02 compounds which were determined as very effective against *S. aureus* had 62.5 µg/mL MIC value. In addition, MIC values of Z03 and Z04 compounds were found as 125 µg/mL. For the concentrations of 1:1000, the cytotoxic effect was eliminated.

KEYWORDS: Bismithiol Crown Ethers, Antioxidant, Cytotoxicity, Antibacterial

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tarihsel Süreçte Crown Eterler.....	1
1.1.1 Tiyadiazoller ve Türevleri.....	2
1.2 Crown Eterlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	7
1.2.1 Antioksidan Aktiviteleri.....	7
1.2.2 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri.....	9
1.2.1 Sitotoksosite ve Hücre Kültürü.....	10
1.3 Crown Eterlerin Yaygın Kullanım Alanları.....	11
1.3.1 Biyoloji ve Tarım.....	13
1.3.2 Farmakoloji ve Tıp Alanı.....	14
1.3.3 Analitik ve Endüstriyel Uygulamalar.....	16
2. MATERYAL VE METOT.....	17
2.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	18
2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	19
2.2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.2.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	19
2.3 DPPH Radikal Assay Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	20
2.4 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri.....	20
2.4.1 Disk difüzyon.....	20
2.4.2 Mikro Broth Dülisyon Testi.....	21
2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	22
2.5.1 Kan Lenfosit Kültürü Hazırlanması.....	22
2.5.2 Hücre Kültürünün Organik Bileşikler İle Muamelesi.....	23
2.6 Sitotoksik Aktivite Tayini.....	23
2.6.1 MTS Assay.....	23
2.6.2 Tripan Mavis Testi.....	24
3. BULGULAR.....	25
3.1 Antioksidan Etki.....	25
3.2 Antibakteriyel Testler.....	25
3.2.1 Disk difüzyon Testi.....	25
3.2.2 Mikro Broth Dülisyon Testi.....	27
3.3 Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....	28
3.3.1 MTS Assay Sonuçları.....	28
3.3.2 Tripan Mavis Test Sonuçları.....	34
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
6. KAYNAKLAR.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Pedersen tarafından sentezlenen ilk crown eterler [5].....	2
Şekil 1.2: Tiyadiazol kullanılarak yapılan halkalaşma reaksiyonları.	2
Şekil 1.3: Bismithiol (I)'in tautomerizm gösterimleri.	3
Şekil 1.4: Bismithiol (I) çizgi modeli ve üç boyutlu (3D) gösterimi [9].	4
Şekil 1.5: Crown eter boyaların sentetik elde edilme reaksiyonu	12
Şekil 1.6: 1,3,4-tiyadiazol-2,5-ditiyol'ün askorbik aside spesifik seçiciliği.....	14
Şekil 1.7: Crown molekülünün DNA yapısındaki fosfat grubu ile etkileşmesi ...	15
Şekil 2.1: 96 Kuyucuklu well plate örneği	22
Şekil 3.1: Bismithiol crown eterlerin <i>Staphylococcus aureus</i> (A) ve <i>Escherichia coli</i> (B) bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri	26
Şekil 3.2: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu.....	29
Şekil 3.3: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu.....	29
Şekil 3.4: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu.....	30
Şekil 3.5: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu.....	30
Şekil 3.6: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu.....	30
Şekil 3.7: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu.....	31
Şekil 3.8: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu.....	31
Şekil 3.9: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu.....	32
Şekil 3.10: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu... 32	
Şekil 3.11: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu... 32	
Şekil 3.12: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu... 33	
Şekil 3.13: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu... 33	
Şekil 3.14 : Örneklerin tripan mavisi testi ile belirlenen % canlılık oranları.	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Sentezlenen Bismithiol crown eter türevleri olan Z01 ve Z02 ligandlarının top çubuk modeli ve halka boşlukları gösterimi.....	5
Tablo 1.2: Sentezlenen Bismithiol crown eter türevleri olan Z03 ve Z04 ligandlarının top çubuk modeli ve halka boşlukları gösterimi	6
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazlar	18
Tablo 2.2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	19
Tablo 3.1: Bismithiol Crown Eterlerin Antioksidan Kapasiteleri	25
Tablo 3.2: Bismithiol crown eterlerin <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Escherichia coli</i> bakterilerine karşı disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları	26
Tablo 3.3: Bismithiol Crown Eterlerin <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Escherichia coli</i> bakterilerine karşı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları	27
Tablo 3.4: Tripan mavisi testi sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	34

SEMBOL LİSTESİ

- DMSO** : Dimetil Sülfoksit
NaCl : Sodyum Klorür
NaOH : Sodyum Hidroksit
DPPH : 2,2-difenil-1-pikril hidrazil
M_A : Moleküler Ağırlık
FBS : Fetal Bovine Serum
MTS : (3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sul fofenil)
-2H-tetrazolyum)
MİK : Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
CFU : Koloni Oluşturan Ünite

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Eğitimim süresince harcamış olduğu yoğun mesai ve emekten dolayı başta tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Tez çalışmamda kullandığım maddelerin temininde ayrıca taç eterlerin özellikleri hakkında bilgi ve tecrübelerinden yaralandığım Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Baki ÇİÇEK'e çok teşekkür ederim.

Tezimi 2015/188 numaralı proje ile maddi olarak destekleyen Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na,

Çalışmalarım boyunca bana zaman ayıran ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Mehmet Emin DİKEN, Araş. Gör. Begümhan YILMAZ, Serhad ONAT ve Zekai ONBAŞIOĞLU'na,

Yetişmemde emeği geçen annem babam ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan ÇALIŞKAN

1. GİRİŞ

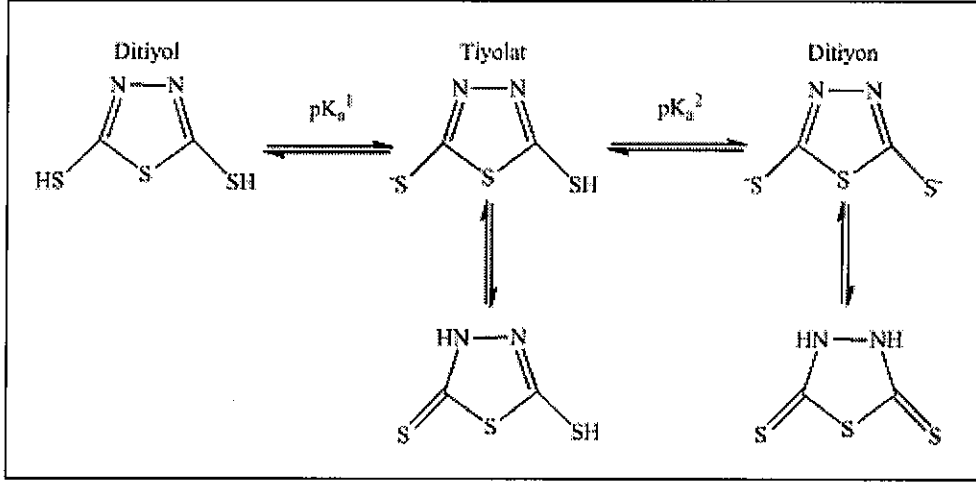
1.1 Tarihsel Süreçte Crown Eterler

Crown eterler organik çözücülerin yapısında bulunan inorganik tuzları çözmek için kullanılan, büyük halkasal yapılara sahip olan etkin bileşiklerdir. Bu tür moleküllerin üç boyutlu dizayn yapıları ve moleküler dinamikleri, katyonik tanımada ve özellikle katyon etkileşimlerin iç hareketlere tesir etmekte çok önemli bir görev üstlenmektedir. Bu ve bunun gibi sebeplerle bir host molekülünün bağlanma yüzeyindeki hareketine katyonun etkisi etkileşmeyi belirlemede ve ölçmede önemli bir araçtır.

Yaklaşık olarak 80 yıldır sentetik makro halkalı crown eter bileşikleri bilinmesine rağmen, özellikle 1960'lı yıllardan sonra bu alandaki çalışmaların oldukça arttığı gözlenmektedir [1]. C.J. Pedersen'in özellikle sentezlemiş olduğu halkalı eterlere kadar yapılan araştırmalarda çok az ve bazı doğal makro halkalı bileşiklerin incelenmesi şeklinde olmuştur. Ancak C.J. Pedersen bu bileşiklerin alkali ve toprak alkali metal katyonları ile kararlı kompleksler oluşturduklarını belirlemesi bu alanda araştırmaların hızlanmasını sağlamıştır [2].

Crown eterler, ilk defa 1967 yılında C. J. Pedersen tarafından sentezlenmiş ve yeni bir çalışma alanının keşfedilmesini sağlamıştır. Yaptığı çalışmalarla altmışa yakın yeni halkalı eterlerin sentezlerini başarmış ve bu eterlerin kimyasal özelliklerini inceleyerek, alkali ve toprak alkali metal katyonlarına karşı oluşturduğu karakteristik seçiciliklerini ortaya çıkarmıştır. Pedersen, yaptığı bu sentez çalışmaları ile 1987'de Nobel kimya ödülüne layık görülmüştür. Bu başarı ile crown eterlerin sentez çalışmaları gün geçtikçe artmış ve göstermiş oldukları karakteristik özellikleri ile sayısız makale yayımlanmıştır [3,4].

Tiyadiazolün önemli özelliklerinden biri de tiyol-tiyon tautomerizminin varlığıdır. Ditiyolün teorik olarak 3 tautomerik formları olan 1a, 1b ve 1c birçok siklizasyon reaksiyonlarında mevcut olarak öngörülebilir. [6].

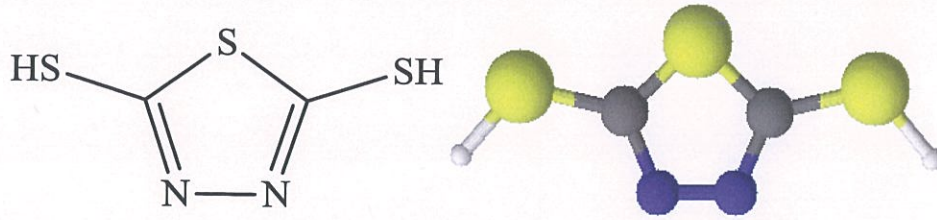


Şekil 1.3: Bismithiol (I)'in tautomerizm gösterimleri.

Son yıllarda Crown eter bileşiklerini üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Bu bağlamda özellikle yapılarının mükemmel biyolojik ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeniyle; heterosiklik alt birimleri içeren makro halkalı bileşiklerin sentezlenmesi oldukça aktif bir çalışma alanı olmuştur [7].

Vücudumuzdaki pek çok organik molekülün yapısı da halkalı yapı göstermektedir. Geçmişte 1,3,4-tiyadiazol ditiyol bileşiği genel manada geçiş metali katyonları için bir ligand olarak görev almıştır. Bunun nedeni, Bi(III) tuzunun çözünürlüğünün düşük olması, analitik kimyada Bi(III)'ün çözünürlüğü için ditiyol kısımları özel bir reaktif olarak gösterilmektedir [8].

Bu bağlamda, 1,3,4-tiyadiazol-2,5-ditiyol (Bismithiol) bileşiği, oldukça yüksek nükleofilik özellik göstermektedirler. Çünkü, tiyadiazol halkası, heterosiklik kükürt (S) atomu ve iki azot (N) atomlarından oluşan üç donör merkeze ve sterik olarak uygun iki eşdeğer tiyollere (SH) sahiptir .



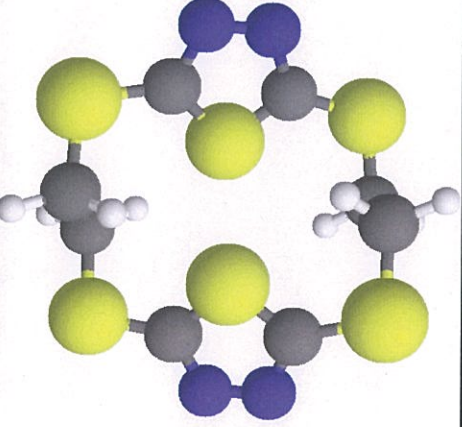
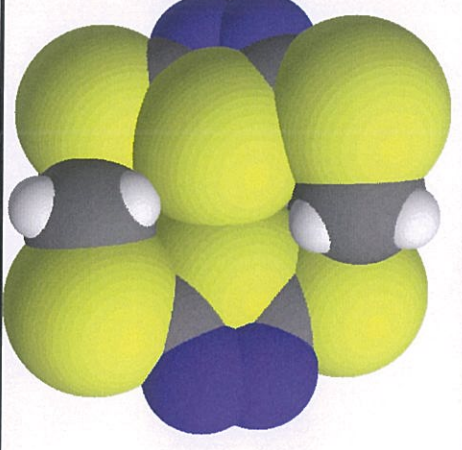
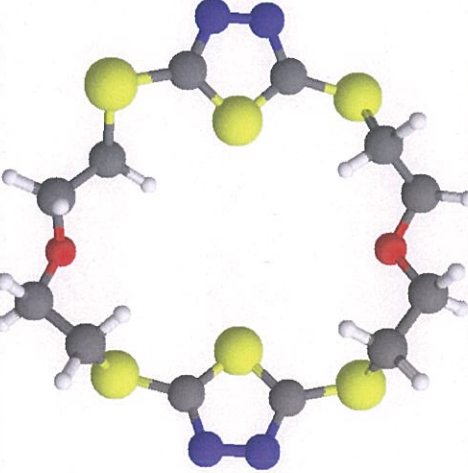
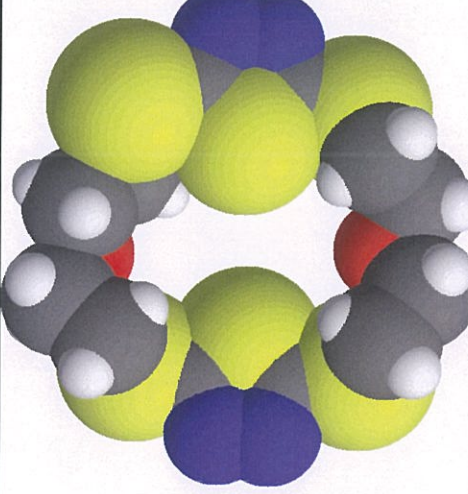
Şekil1.4: Bismithiol (I) çizgi modeli ve üç boyutlu (3D) gösterimi [9].

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentez edilmiş olan taç eter türevleri ise

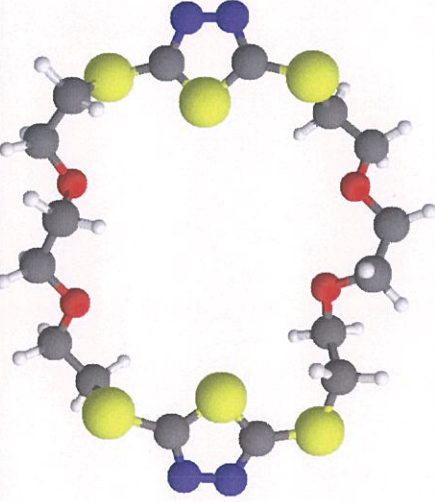
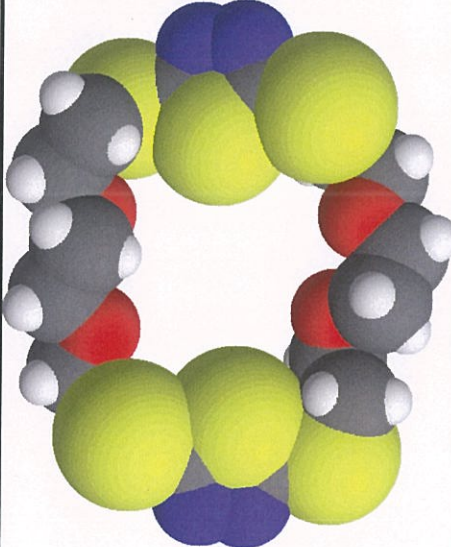
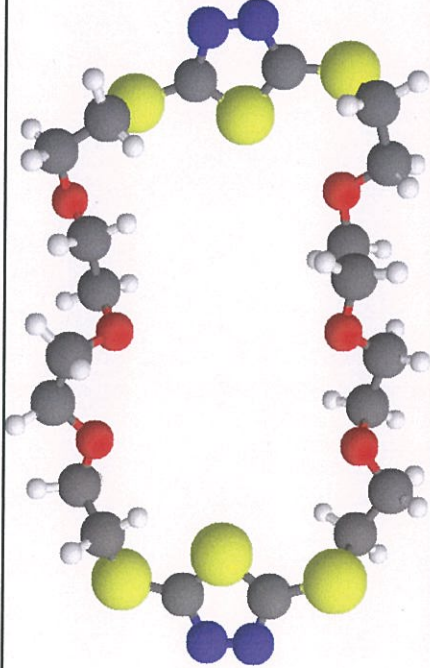
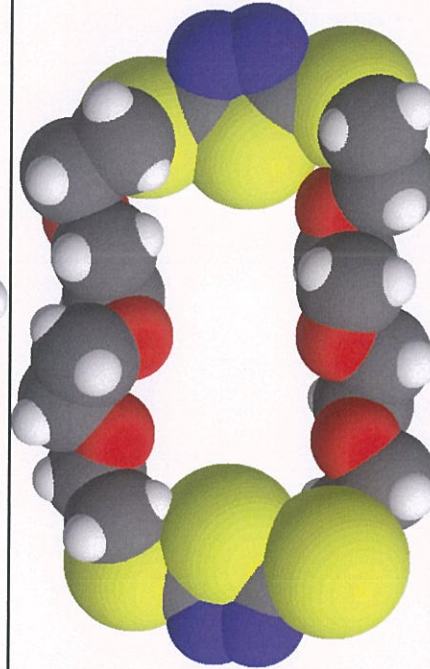
- ✓ Z01-“(1,4,10,13)-tetratiya [4.4](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan”,
- ✓ Z02-“(4,16)-diokso-(1,7,13,19)-tetratiya[7.7](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan”,
- ✓ Z03-“(4,7,19,22)-tetraokso-(1,10,16,25) tetratiya[10.10](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan”,
- ✓ Z04-“(4,7,10,22,25,28)-hekzaokso-(1,13,19,31)-tetratiya[13.13](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan”dır [10].

Yeni sentezlenmiş olan bu moleküllerin en önemli özellikleri de yapılarındaki –SH gruplarının halkalaşma reaksiyonu ile –SR(tiyoeter) gruplarına dönüştürülerek, toksik etkilerinin minimize edilmiş olmasıdır.

Tablo 1.1: Sentezlenen bismithiol crown eter türevleri olan Z01 ve Z02 ligandlarının top çubuk modeli ve halka boşlukları gösterimi.

Kod	Top çubuk modeli	Halka boşluğu
Z01		
Z02		

Tablo 1.2: Sentezlenen bismithiol crown eter türevleri olan Z03 ve Z04 ligandlarının top çubuk modeli ve halka boşluğu gösterimi.

Kod	Top çubuk modeli	Halka boşluğu
Z03		
Z04		

1.2 Crown Eterlerin Biyolojik Aktiviteleri

Laboratuvar ortamında sentezlenen moleküller, kullanım alanlarını belirlemek için bazı deney veya testlere tabi tutulurlar. Bu testler ile kullanım alanları ve o alanlarda uygulanacak dozajları belirlenmektedir. Bu testlerin başında biyolojik testler gelmektedir. Biyolojik testler hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılmaktadır. *In vitro* testlerde istenilen etkiler gözlemlendikten sonra *in vivo* testlere geçilmesi daha uygun görülmektedir [11].

1.2.1 Antioksidan Aktiviteleri

Organizmaların özellikle ileriki yaşlarda geniş ölçüde psikolojik ve fiziksel strese maruz kaldıkları dönemlerde serbest radikallerin üretimi artar ve buna bağlı olarak savunma mekanizmaları ciddi oranda etkilenir. Oluşan bu negatif süreçte moleküler hasar engellenemez bir sonuçtur [12]. Hücreler, dokular hatta vücut sıvıları geniş ölçüde çeşitli pro-oksidanlara maruz kalırlar [13]. Organizmanın tüm metabolizmaya oldukça zarar veren serbest radikallere maruz kalması çeşitli savunma mekanizmaları meydana gelmesini sağlar [12]. Geliştirilen bu mekanizmaların etkisiyle rutin biyokimyasal tepkimelerin oluşması sırasında ortaya çıkan radikaller degrade edilebilir. Ancak pro-oksidan/antioksidan dengesinin hasar görmesiyle antioksidan mekanizmalar sıfır seviyesine gelir. Prosesin devamında sitotoksik radikal etkinlik artar. Bunun sonucunda hücre ölümü gerçekleşir [14]. Metabolizmada oluşan bu strese Oksidatif Stres adı verilir. Meydana bu olay ateroskleroz, kanser, malarya ve romatoidartrit gibi rahatsızlıkların patofizyolojisine yol açar [15].

Oksidatif stres, temelde oksitlenmeden ortaya çıkmasının yanı sıra bazı kimyasal reaksiyonlardan sonra serbest radikallerin oluşmasıyla meydana gelir. Antioksidanlar serbest radikallerle tepkimeye girerler ve bu radikallerin hücredeki negatif etkilerini ortadan kaldırırlar. Bu özelliklerin ek olarak yağların oto oksidasyonunu yavaşlatırlar ve serbest radikalleri süpürerek nötralize ederler.

Atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere serbest radikaller denir [16].

Antioksidan moleküller mevcut olan birçok hastalık türüne neden olan genel reaktif oksijen türlerini inaktive ederler. Reaktif oksijen türleri, radyasyon, kullanılan ilaçlar, yağ oksidasyonu, immunolojik tepkimeler, UV ışınları, stres, sigara, uyuşturucu ve alkol gibi pek çok farklı şekilde oluşabilmektedir. Yaygın reaktif oksijen türleri arasında hidroperoksi (HO^*_2), peroksi (ROO^*), süperoksit (O^*_2), hidroksil (OH^*), alkoksi (RO^*) ile radikal olmayan singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipoklorik asit (HOCl), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit (ONOO^-) venitrik oksit (NO) sayılabilirler [17].

Reaktif oksijen radikalleri arasında en sitotoksik ve reaktif olan hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), hidroksit iyonunun nötral formudur. Hücre içerisinde çok fazla reaktivitesi olduğundan ortalama 10^{-9} saniye gibi kısa bir yarılanma süresinde oldukça ciddi tehlikelere sebebiyet veren bir radikale dönüşür [14,18].

Serbest radikallerle indüklenen oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarını şu şekilde sıralayabiliriz:

- ✓ Önleyici mekanizmalar
- ✓ Tamir mekanizmaları
- ✓ Fiziksel defanslar
- ✓ Antioksidan defansları

Enzimatik antioksidan defansları grubunda glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi enzimler mevcuttur. Bu gruptaki antioksidanlar reaktif oksijen radikallerini daha düşük toksik ürünlere dönüştürürler. Enzimatik olmayan antioksidanlar grubunda ise, α -tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), glutasyon (GSH), polifenolik bileşikler karotenoidler, poliaminler, taurin, koenzim Q-10, adenosin, resveratrol ve melatonin gibi antioksidanlar bulunmaktadır. Bu gruptaki antioksidanlar aktivitelerini radikalleri yakalayıp devamında nötralize ederek gerçekleştirirler [14,19,20].

Birçok biyolojik sistemde reaktivlik özelliği yüksek olan serbest radikaller ve onların oksijen türevleri mevcuttur. Bu serbest radikaller proteinleri, nükleik asitleri,

lipitleri ya da DNA'yı okside edebilmekte ve bunun devamında dejeneratif bozuklukların başlatılmasında etkili bir rol oynamaktadır. Antioksidanların en temel özelliklerinden birisi serbest radikalleri tutma kabiliyetleridir. Polifenol, fenolik asit veya flavonoidler gibi antioksidanlar sayesinde peroksit, lipid veya hidroperoksit peroksil gibi serbest radikallerin etkisini ortadan kaldırarak dejeneratif rahatsızlıklara sebebiyet veren oksidatif mekanizmayı degrede etmektedir [21].

Antioksidanların aktivite kapasitesi; antioksidan konsantrasyonu, lipid kompozisyonu sıcaklık, pH seviyesi, oksijen basıncı, ortamda bulunan başka antioksidanların varlığı gibi birçok farklı disipline bağlıdır [22].

Antioksidanlar oksidasyon mekanizmasını iki farklı etki ile sonlandırabilmektedir. Bu mekanizmalardan ilki serbest radikal süpürücü etkisidir. Bu sürecin diğer tanımı da bileşik "primer antioksidan" dır. İkinci mekanizma ise doğrudan radikal süpürme etkisini içermeyen bir sistem desteğiyle meydana gelir. Örneğin oksijenin süpürülmesi, metal iyonlarının bağlanması, hidroperoksitlerin radikal olmayan türlere dönüştürülmesi veya singlet oksijenin deaktivasyonu gibi sistemlere örnek olarak gösterilebilir. Bu durumdaki bileşik ise "sekonder antioksidan" olarak adlandırılır. Primer antioksidanlara örnek olarak vitamin E gibi fenolik bileşikler örnek verilebilir. Bu ve benzeri bileşikler organizmaların veya gıdaların serbest radikallerden etkilenme süreci boyunca tüketilirler. Sekonder antioksidanlar etki gösterebilmeleri için ise genelde ortamda başka bir bileşen mevcut olması gerekmektedir. Örneğin, ortamda metal iyonu varsa sadece sitrik asit gibi bloke edici maddeler etkinliklerini gösterebilmektedirler [17].

1.2.2 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

1930'lu yılların başlarından itibaren antimikrobiyal ajanların kullanımı deneysel çalışmalar içerisinde yerini almaya başlamıştır. Bu çalışmalarını takiben kullanılan her yeni antimikrobiyal bileşik antimikrobiyal direnç gelişimi konusu gündeme getirmektedir [23].

Yaklaşık son 25 yılda karada, havada ve suda yaşayan vahşi ya da evcil ortamda bulunan hayvanlardan elde edilen bakterilerde antimikrobiyal direncin oldukça duyarlı bir seviyede olduğu gözlenmiştir.

Antimikrobiyal terimini açıklayacak olursak; Bakteri, mantar veya protozoa gibi mikroorganizmaların gelişimini durduran ve devamında mikroorganizmaları öldürebilen maddelerdir. Antimikrobiyaller doğal ya da geleneksel olarak iki farklı alt sınıfa ayrılır [24].

Belirli bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı olan *in-vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla kullanılan testlere antimikrobiyal duyarlılık testleri denir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerine dahil edilecek antimikrobiyal ajanların belirlenmesi için kullanılacak olan metodoloji ve breakpoint tavsiyeler hakkında birçok makaleden bilgi toplamak mümkündür. Ancak araştırma sonucu elde edilen literatürde belirli bir antimikrobiyal ajan listesine, ortak bir metodolojiye veya breakpoint/cut-off değerine rastlanılmamaktadır. Bu sonuç bu güne kadar yapılan çalışmalarda protokol standardizasyon eksikliği olduğunu ortaya koymaktadır. Bundan dolayı farklı grupların yapmış oldukları çalışmaları kıyaslamak ya da sonuç çıkarmak mümkün olamamaktadır [25, 26].

In vitro antimikrobiyal hassasiyeti belirlemek amacıyla; disk difüzyon, agar dilüsyon, E-testi, broth makrodilüsyon ve broth mikrodilüsyon gibi metotlarla çalışılmaktadır. Bu metodlar arasından hangisi seçilirse seçilsin, kullanılan testin Clinical and Laboratory Standarts Institute CLSI 2008a ve 2008b, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN (24), (18,19) British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (3) ve Comite de l'Antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie CA-SFM (20)'da belirtilen uluslararası kabul görmüş bir protokole uygun şekilde hazırlanmış olması gerekmektedir [27].

1.2.1 Sitotoksisite ve Hücre Kültürü

Belirli bir doku ya da organdan çeşitli yöntemler kullanılarak izole edilen hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılması, üretilmesi ve bu üretilen hücrelerin devamlılığının sağlanması "hücre kültürü" olarak tanımlanır [28].

Hücre kültürü, hem hücrenin türüne ait süreçlerin tahmini ve tayini hem de özelleşmiş hücre fonksiyonları üzerindeki parametreler için toksite tarama amacıyla kullanılabilir [29].

Kullanılacak olan test maddelerinin canlı organizmalar üzerindeki biyolojik aktivitesinin saptanmasına yönelik olarak yapılan genel toksite testlerinde birçok farklı özelliğe sahip hücre hatları kullanılabilir. Örnek olarak HeLa hücre hattı, Hepatomma hücre hattı ve fibroblast hücre hatları verilebilir. Uygulama yapılan ortamlarda toksiklik seviyesini ölçmek için özelleşmiş boyama, sitozolik enzim salınımı, hücre büyümesi ve klonlama etkinliği gibi bir dizi parametre uygulanabilmektedir. Metabolizma bütünlüğünde organa spesifik toksik etkilerin tespitinde hücre işlevlerindeki değişiklikler ölçülerek bu alana özgü hücreler kullanılarak tespit çalışması yapılır.

Günümüzde yapılan birçok biyomedikal araştırmada *in vitro* sistemlerin gittikçe artan kullanımı göz ardı edilmemelidir. Bu alanda yapılan çalışmalar belirli standartlara oturtulmaya çalışılmaktadır [30]. Genellikle test edilen maddenin kültüre edilmiş hücreler için toksik olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılan *in vitro* sitotoksite testleri belirlenen inkübasyon periyodundan sonra yaşayan hücre sayısının belirlenmesi ile ölçülebilmektedir [31]. Özellikle hedef doku üzerindeki toksik etki mekanizmalarını açıklığa kavuşturmak için özelleşmiş hücre kültürleri kullanmak genel manada en uygun çalışma prensibini ve verimini oluşturmaktadır [32,33].

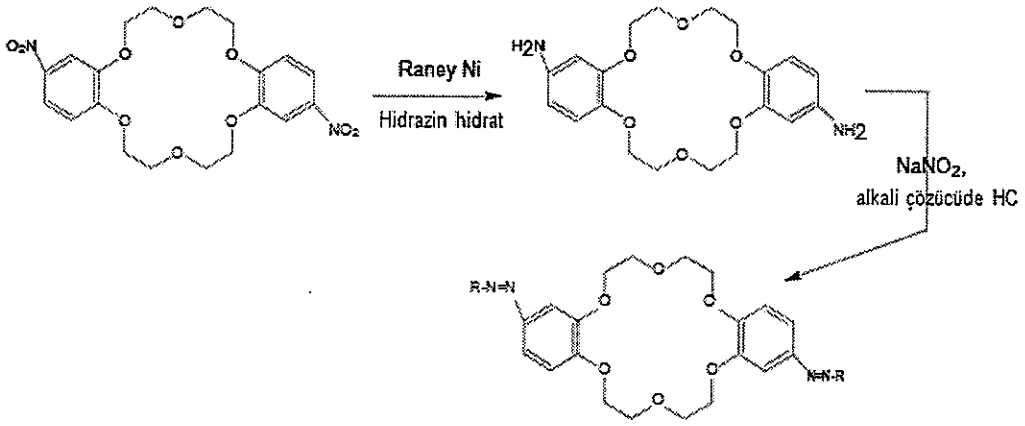
1.3 Crown Eterlerin Yaygın Kullanım Alanları

İlaç sanayi ve birçok biyo analitik alanlardaki uygulamalarda önemli görevler üstlenen 1,3,4-tiyadiazoller oldukça ilgi çekici bileşiklerdir. Oldukça yeni olan bu bileşikler hareket kabiliyet yeteneğine sahip değerli kompleksleşmelerinin artmasıyla önemli ölçüde biyolojik aktivitelerinin olduğu anlaşılmıştır [34].

Genel olarak süstitüsyon ve halka kapanması eşliğinde yeniden düzenlenerek oluşturulan 1,3,4-tiyadiazol türevlerinin halka sistemleri tıp ve tarım alanlarında oldukça ilgi çekmektedirler. Özellikle boyalar, fotografik materyaller, eser elementlerin tayin edilmesi ve optikçe aktif sıvı kristallerin hazırlanması

alanlarında aktif rol üstlenmişlerdir. Herbisitler, fungusitler, antihelmintics, insektisitler, bakterisitler, antihypertensives ve anticonvulsives gibi birçok türevleri olduğu bildirilmiştir. 1,3,4-tiyadiazol halka sistemleri 2 ve 5 konumları gibi birçok değişik yer değiştirici konumlara sahiptir. Laboratuvar şartlarında ditiyokarbazat türevlerinin kristalisasyonu prosesindeyan ürünler olarak izole edilmiştir. Yapılan çalışmaların devamında yeni simetrik 2,5-disübstitüe tiyadiazol halka sisteminin spektroskopik karakterisasyonu ve kristal yapısı rapor edilmiştir [35].

Bazı alanlarda turuncudan kahverengiye değişik renklere boyar madde olarak kullanılan Crown eterlerin Pandya ve Agrawal tarafından sentezlenmiş olan eterazo boyar maddesi Şekil 1.5'te görülmektedir [36].



Şekil 1.5: Crown eter boyaların sentetik elde edilme reaksiyonu.

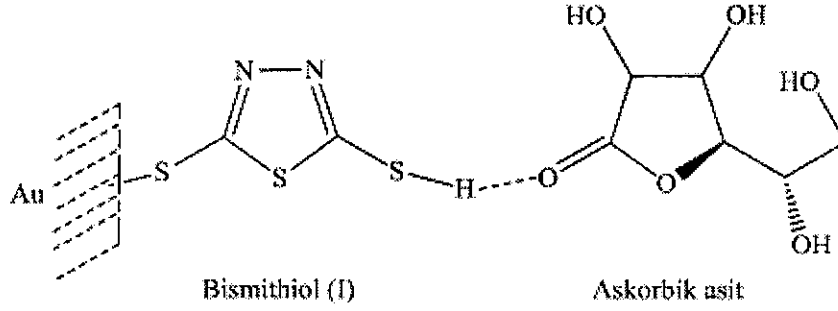
Crown eterlerin oldukça etkili olarak kullanıldığı farklı bir alan ise biyosensörlerdir. 2007 yılında yapılmış olan bir deneysel çalışmada 4'-aminobenzo-15-.crown-5 tanıyıcı molekül olarak polimer yapıya bağlanmış ve Li⁺, K⁺, Ba⁺², Ca⁺² ve Na⁺ kanyonlarına karşı sensör özelliği araştırılmıştır [37].

1.3.1 Biyoloji ve Tarım

Çeşitli metal iyonları ile taç eterlerin kompleks oluşturmasının fark edilmesinden beri konak-konuk kimyasında önemli bir alan oluşturmuşlardır. Bunun yanı sıra metal iyonlarının seçici komplekslerinin elde edilmesi için yeni iyonoforların geliştirilme çabası oldukça fazla ilgi çekmiştir. Metal iyonlarının etkili ayrılması ve geri kazanımı çalışmaları için yüksek ölçüde seçici iyonofor tasarımı oldukça fazla önem arz etmektedir. Bu çalışmalarda önemli ölçüde ilerleme sağlanmasıyla ekosistem için oldukça zararlı olan Cd^{2+} ve Hg^{2+} gibi metal iyonları ortamdaki ayrıştırılması ve sağlıklı bir şekilde geri dönüşümü sağlanmıştır.

Cıvanın canlı vücudunda belirli seviyenin üzerinde bulunması kalp, beyin, bağırsak ve mide üzerinde oldukça negatif etkilere sebebiyet vermektedir. Ayrıca; proteinler, enzimler bloke edilmesine, merkezi sinir sistemi disiplininin bozulmasına, kalıtsal aktarım bozukluğuna, mitoz ve endokrin sistemine ciddi zararlar verebilir. Sülfür grubu ve $Hg(II)$ içeren ligandlara karşı güçlü bir ilgi göstermektedir. Bu afinitenin belirlenebilmesi için Vasimalai ve çalışma arkadaşları yaş kimyasal metodu ile 2,5-dimerkapto-1,3,4-tiyadiazol, 2-merkaptto-5-amino-1,3,4-tiya diazol ve 2-merkaptto-5-metil-1,3,4-tiyadiazol ile Agnanopartiküllü yapılar sentezlenmişlerdir. Çalışmanın devamında ortama $Hg(II)$ nin eklenmesiyle 677 nm'de maksimum emisyon yoğunluğu belirlenmiştir. Emisyon yoğunluğunun artışına bağlı olarak, $Hg(II)$ 'nin derişimini hesaplanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen deneysel veriler ICP-AES metodu ile kıyaslanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [38].

Palraj Kalimuthu ve çalışma grubu idrarda ürik asidin aşırı miktarda bulunmasıyla ortaya çıkan Lesch Nyan gibi farklı hastalıkların tanı ve teşhisinde altın elektrotun yüzeyine dimerkapto tiyadiazolü immobilize ederek ürik asidin miktarı saptamışlardır. Çalışmada kullanılan bu yöntem ile immobilize edilmiş tiyadiazoldeki tiyol grubunun hidrojen atomu ile askorbik asidin oksijen atomu arasında hidrojen bağı oluşturarak, askorbik asidin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Bu sayede insan vücudu üzerine herhangi bir tanısal tedavi metodu uygulamadan ürik asidin miktarının belirlenebileceği pratik ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir [39].



Şekil 1.6: 1,3,4-tiyadiazol-2,5-ditiyol'ün askorbik aside spesifik seçiciliği.

Tiyocrown eterler yumuşak ve sert ağır metal iyon gruplarına karşı farklı afiniteler gösterebilirler. Örneğin Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Ag^{+} gibi yumuşak ağır metal iyonlarına karşı yüksek afinite gösterirken Na^{+} ve K^{+} gibi sert metal atomlarına karşı oldukça düşük ya da hiç afinite gösteremeyebilirler.

Faz transfer reaksiyonlarında reaksiyon hızını ve verimini ciddi bir oranda arttırabildikleri için taç eterler bu reaksiyonlarda katalizör olarak görev almaktadır. Ayrıca hücrelerde sodyum-potasyum seçiciliğini düzenlemede ve iyon seçici elektrot yapımında kullanılan önemli bileşiklerdir [40,41].

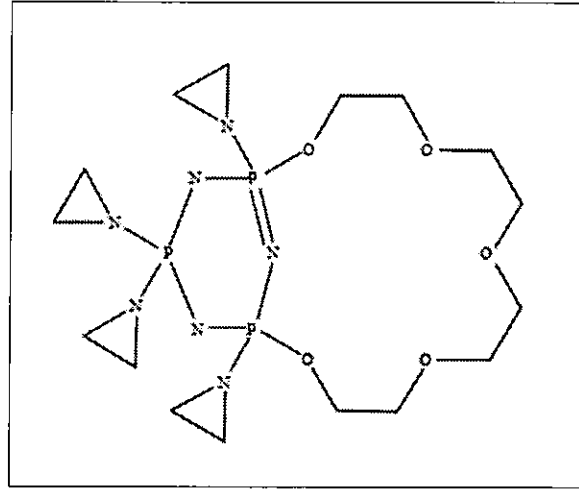
1.3.2 Farmakoloji ve Tıp Alanı

Aktif kullanımda olan birçok ilaçlara yönelik mevcut olan direnç dünya çapında hızla artmaktadır. Ciddi bir sorun olan bu direnç ile başa çıkmak için yeni bileşiklerin tasarımına olan ihtiyaç oldukça fazladır. Bu doğrultuda tiyadiazolların son birkaç yılda anti-tümör bileşikler olarak kullanımı konusu oldukça ilgi görmektedir. Son literatür verilerine göre tiyadiazol türevlerinin biyolojik önemi ve sentezinin öneminin arttığı gözlenmiştir. Sitotoksik etkileri ve antikonvulsant, antitüberküloz, antianaljezik alanlarda oldukça geniş bir yelpazede etkileri mevcuttur [42].

Tıbbi kimya alanında tiyadiazol türevleri benzersiz ve çok etkili bir alanı işgal etmektedir. Bunun yanı sıra tiyadiazol iskeleti içeren ve doğal olarak oluşan sentetik bileşikler ilginç farmakolojik özelliklere sahiptirler [43]. Farmakolojik alanda tiyadiazol halkası içeren antimikrobiyal [44], antiparazit ilaçlar yapımında [45], 1,2,3-tiyadiazol halkası sistemi içeren bileşikler; antitümör, antifungal, anti histaminik ve böcek öldürücü gibi birçok alanda tedavi amacıyla gereksinim duyulan maddeleri üretmek için başlangıç bileşikleri olarak kullanılmışlardır [42].

Epilepsi, glakom ve kalp yetmezliği hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve tıp alanında çok iyi bilinen asetazolamid bir 1,3,4-tiyadiazol türevidir [46].

Kanser tedavisinde mevcut çalışmalarda kullanılan Crown eterler proteinler ve DNA gibi birçok biyolojik molekül ile etkileşimleri test edilerek belirlenmiştir. DNA yapısındaki fosfat grubu ile etkili bir kompleks oluşturan crown eter molekülü Na^+ ve K^+ katyonu ile zenginleştirilmiştir. Bu sayede DNA'nın yapısına güçlü bir şekilde bağlanmaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: Crown molekülünün DNA yapısındaki fosfat grubu ile etkileşmesi.

Bu çalışmalar üzerine crown eterlerin DNA'yı ayırması alanındaki uygulamalar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaca örnek olarak bis (proparjilik) sülfon crown eterin sentezi gerçekleştirilmiştir ve devamında bir gün süresince tampon çözeltide bekletilmiştir. Yapılan bu deneysel çalışmanın sonucunda sentezlenen crown eterin DNA'yı ayırdığı saptanmıştır. Ortamda Na^+ ve K^+ kanyonları bulunduğunda ve 90-200 μM konsantrasyon bandında bileşiklerin bölünme reaksiyonunda daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmaların temel deneysel bilgiler olarak kabul edildiği bir çalışmada crown eterlerin 1-20 μM konsantrasyon aralığında 50 kanser hücre tipine karşı etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda kanser hücrelerindeki çoğalmanın ve büyümenin durduğu belirlenmiştir [47].

1.3.3 Analitik ve Endüstriyel Uygulamalar

Genel olarak endüstriyel çalışmalarda, biyoaktif bileşenler olarak metal bağlama ajanlarında, korozyon engelleyiciler ve aşınmaya karşı koruyucu maddeler gibi yağlayıcı katkı maddelerinde ve katot malzeme pil sistemlerinde Tiyadiazoller ve türevleri etkili bir şekilde kullanılmaktadırlar [48].

O, N, S ihtiva eden organik moleküller ve polar fonksiyonel gruplarda metal yüzeyler üzerine oluşturdukları güçlü adsorpsiyon sebebiyle yaygın olarak kullanılan inhibitörlerdir. Bakır yüzeyine 2,5-dimerkapto-1,3,4-tiyadiazolün immobilize edilmesiyle asidik çözelti içinde bakırın korozyonunu engellemektedir [49].

Taç eterler ile karbon elektrotların modifiye edilmesi sonucunda voltametrik metotlarla kurşun tayini yapılabildiği bilinmektedir. Bu metod sayesinde ticari numunelerde etkili bir şekilde uygulandığı bilinmektedir [50].

2. MATERYAL VE METOT

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmalarda kullandığımız Bismithiol Crown Eterler:

- ✓ (1,4,10,13)-tetratiya[4.4](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan (Z01)
- ✓ (4,16)-diokso-(1,7,13,19)-tetratiya[7.7](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan (Z02)
- ✓ (4,7,19,22)-tetraokso-(1,10,16,25)-tetratiya[10.10](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan (Z03)
- ✓ (4,7,10,22,25,28)-hekzaokso-(1,13,19,31)-tetratiya[13.13](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan (Z04)

Balıkesir Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Baki ÇİÇEK ve ekibi tarafından Kimya Laboratuvarında sentezlenmiştir.

2.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka
Etüv	Memmert
Mikroskop	Olympusckx 41
Hücre Sayma Lamı	Neubaver'schamber
Ultrasonik Banyo	Elma Sonic
Biyogüvenlik Kabini	Labconco
Spektrofotometre	Perkin Elmer Spektrum 100
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	Human Power I
Mikroplaka okuyucu Spektrofotometre	ThermoScientific
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuaire
Buzdolabı (-20 ⁰ C)	Altus
pH Metre	Hanna Instruments
Buzdolabı (+4 ⁰ C)	Regal

2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar.

DPPH Radikali (2,2-difenil-1-pikril hidrazil)	NaCl
Metanol	Penisilin/Streptomisin
Fetal Bovin Serum	Ficoll- Paque PLUS
Tyrpan Mavisi	Phytohemaglutinin
RPMI 160 Besiyeri	Etil Alkol
DMSO	

2.2.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) Reaktifinin Hazırlanması

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reaktifinden 0,0024 g tartılarak bir balon joje içerisine alındı. Bir miktar metanol ile çözüldükten sonra son hacim 100 mL olacak şekilde üzerine metanol ilave edilmiştir. DPPH reaktifi günlük taze olarak hazırlanmış ve deneysel çalışmalarda kullanılıncaya kadar ışıksız ortamda saklanmıştır [51].

Tripan mavisi

0.1 g Tripan mavisi'nden tartılmış ve bir miktar saf suda çözdürüldükten son hacim 25 mL'ye getirilerek deneylerde kullanılmak üzere karanlıkta saklanmıştır.

% 70'lik Etil Alkol:

Saf etil alkolden 700 mL alınarak balon joje içerisinde son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile doldurulmuştur.

2.3 DPPH Radikal Assay Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

Öncelikle 0,024 g 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) reaktifi tartılarak belirli bir miktar metanol içerisinde son hacim 100 mL olacak şekilde çözülür. DPPH reaktifi çözeltisi mutlaka günlük olarak taze bir şekilde hazırlanmalı ve yapılacak deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere karanlık bir ortamda muhafaza edilmelidir [52].

Hazırlanan çözeltilerden 250 µL alınarak üzerine 2,5 mL metanol ile 2,5 mL DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler karanlık ve oda sıcaklığına sahip bir ortamda 1 saat bekletilmiştir. Devamında UV spektrofotometre ile 517 nm'de gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite tayinini hesaplamasında aşağıdaki formülden faydalanılmıştır:

$$\text{Antioksidan aktivite (\%)} = [1 - (\text{örnek absorbansı} / \text{kontrol absorbansı})] \times 100$$

2.4 Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

2.4.1 Disk difüzyon

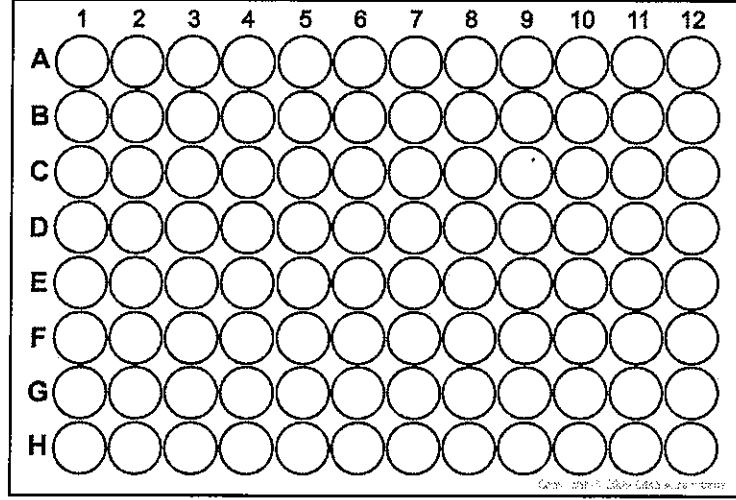
Disk difüzyon metodunda besi ortamı olarak Müller Hinton Agar kullanılmıştır. Gram negatif olan *E.coli*, ve gram pozitif olan *S.aureus* iki bakteri türü kullanılmıştır. 10⁵ CFU/ml olarak hazırlanan bakteri kültürleri besi ortamına

eklenmiş ve DMSO içerisinde doymuş çözeltileri hazırlanan Bismithiol Crown Eter bileşikleri emdirilen diskler yerleştirilmiştir. Ekim bittikten sonra besiyerleri 24 saat süresince inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar diametrik mikrometre ile ölçülmüştür [53].

2.4.2 Mikro Broth Dülisyon Testi

Test edilecek Bismithiol Crown Eterler DMSO içerisinde 1000 ppm olacak şekilde çözündürülür ve 2 kat azalacak şekilde Muller Hinton Broth kullanılarak seyreltmeleri (dülisyonları) 96 kuyucuklu well plate kullanılarak yapılır. Örneğin 1000 ppm'lik (1,4,10,13)-tetratiya [4.4](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan için; 10mg tartılıp üzerine 10 mL DMSO ilave edilerek çözündürülür. Bundan 200 µL alınıp Şekil 2.1'deki 1 numaralı kuyucuğa konur. Sonraki 2, 3, 4 ... 10 numaralı kuyucuklara 100'er µL saf su konulur. 1 numaralı kuyucuktaki 1000 ppm'lik çözeltilerden 100 µL alınıp 2 numaralı kuyucuğa eklenir ve böylece 2 numaralı kuyucuktaki çözelti konsantrasyonu 500 ppm olur. Daha sonra 2 numaralı kuyucuktan 100 µL örnek alınıp 3 numaralı kuyucuğa eklenir ve çözelti konsantrasyonu 250 ppm olur. Bu şekilde seri olarak 9 numaralı kuyucuğa kadar seyreltmeler yapılır (istenilen konsantrasyona kadar bu işleme devam edilir). 1 numaralı kuyucuk hariç tüm kuyucuklara Müller Hinton Broth içerisinde hazırlanan 10⁵ CFU/mL konsantrasyondaki genç bakteri kültüründen 100'er µL konur. 10 numaralı kuyucuk kontrol grubu olarak kabul edilir sadece bakteri kültürü içerir.

İşlemi tamamlanan well plateler 24 saat süreyle uygun sıcaklıkta inkübe edilir. Süre sonunda well plateler test edilir. Mikrobiyal gelişme bulanıklık ile karakterize edilebilir. 24 saatlik inkübasyon sonrası tüm kuyucuklara tetrazolyum viyole püskürtülür ve 30 dk kadar 37 °C'de inkübasyona bırakılır ve sonunda bakteri üremesi olan kuyucuklar kırmızı-pembe renkli olurlar. Bunların dışında 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm alınarak bakteri konsantrasyonu ölçülür. Mikrobiyal gelişimin olmadığı en düşük örnek konsantrasyonu MİK değeri olarak tespit edilir.



Şekil 2.1: 96 Kuyucuklu well plate örneği.

2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.5.1 Kan Lenfosit Kültürü Hazırlanması

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzemeler, 121 °C' de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edilmiştir. Hücre kültürü laboratuvarı ve biyogüvenlik kabini çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra dezenfektanlar ve UV lamba ile sterilize edilmiştir.

Kültür ortamını zenginleştirmek ve hücrelerin çoğalma oranını arttırmak amacıyla kullanılan, içeriğinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesini ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunan zengin bir protein çözeltilisi olan fetal bovine serumdan 50 mL alınarak 500 mL'lik RPMI 1640 besiyerine eklenmiştir. Ayrıca, mikrobiyolojik kontaminasyonu önleyen 2.5 mL Penisilin/Streptomisin çözeltilisi ve lenfosit hücrelerinin bölünmesini teşvik eden 5 mL phytohemaglutinin çözeltilisi (1 mg/mL) besiyerine eklenmiştir. Kimyasallar karıştırıldıktan sonra şişe çalkalanarak karıştırılmış ve karışım 15 mL'lik steril falcon tüplere bölünerek 5'er mL'lik kültür ortamları oluşturulmuştur. Bu kültür ortamları -20°C'de saklanmıştır.

Deneye başlamadan önce hazırlanan besiyerleri 37 °C'ye getirilmiştir. Hazırlanan kültür ortamlarına 0,5 mL anti koagülanlı tam kan ekilmiştir ve 37 °C'de % 5' lik CO₂ ortamında 4 gün inkübe edilmiştir.

2.5.2 Hücre Kültürünün Organik Bileşikler İle Muamelesi

Lenfositlerin strese girmeden belirli bir sayıya ulaşması için 24 saat boyunca hiçbir muamele yapılmamıştır. 48. saatte hücre kültür ortamlarına 0.5 mg/mL konsantrasyonunda DMSO'da çözülmüş organik bileşiklerden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 oranlarında seyreltme yapılarak hücre kültürüne eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan lenfosit çözeltilisine hiçbir organik bileşik eklenmemiştir. Kültürlere 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucunda sitotoksite testleri uygulanmıştır.

2.6 Sitotoksik Aktivite Tayini

2.6.1 MTS Assay

Bu test (MTS Assay) tetrazolium maddesinin hücre içinde renkli formazan ürününe indirgenmesini temel alır. Bu değişimin metabolik olarak aktif olan hücrelerdeki dehidrogenaz enzimleri tarafından üretilen NADPH veya NADH'lar sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir [54].

Herbir inkübasyon süresi sonunda kültürler 10 mL steril serum fizyolojik solüsyonu (% 0.9 NaCl) ile sulandırılmıştır . Daha sonra kuru tüplerde 2,5 mL Ficoll-Paque üzerine serum fizyolojik ile sulandırılmış olan kan örnekleri Ficoll-Paque ile karışmayacak şekilde çok yavaş eklenmiştir ve 15 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda orta fazda toplanmış olan lenfositler dikkatlice başka kuru tüplere alınmıştır. Lenfositler tekrar serum fizyolojik solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atıldıktan sonra dipte toplanan lenfositler thoma lamı ile sayılmış ve 3'er tekrarlı halde 96 wellplate'e her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklenmiştir (2 x

10⁶ hücre/mL). Üzerlerine 20 µL MTS reaktifi eklenerek 4 saat inkübasyondan sonra 490 nm' de ölçüm alınmıştır.

2.6.2 Tripan Mavisı Testi

Bu test için organik bileşikler ile inkübe edilmiş lenfosit kültürlerinden ve kontrol grubundan 10'ar µL alınarak bir eppendorf tüp içerisine eklenmiştir ve aynı miktarda % 0.4' lük tripan mavisı konarak iyice karışması sağlanmıştır. Bu test sonucunda membran yapısı bozulmuş ölü hücreler boyayı içine aldığı için mavi gözlenirken, canlı hücreler şeffaf gözlenmektedir [25]. Deney sonucunda % canlılık oranı hesaplanmıştır.

Hesaplama şu şekilde yapılmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = [1 - (\text{Yaşayan Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı})] \times 100$$

3. BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız Z01, Z02, Z03 ve Z04 olarak kodlanan bismithiol crown eter bileşiklerinden uygun konsantrasyonlarda DMSO kullanılarak hazırlanan çözeltilerin antioksidan etkileri, antibakteriyel özellikleri ve sitotoksik aktivite sonuçları gösterilmektedir.

3.1 Antioksidan Etki

Bismithiol Crown Eterlerin Antioksidan aktiviteleri sonuçları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

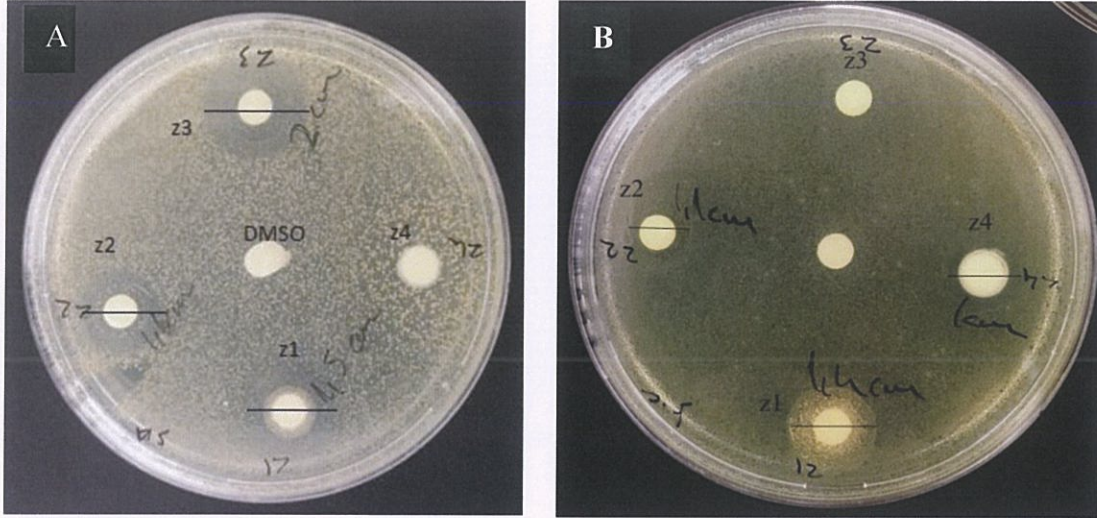
Tablo 3.1: Bismithiol crown eterlerin antioksidan kapasiteleri.

Örnekler	% Antioksidan Süpürücü Etkisi
Z01	0
Z02	0
Z03	2,14
Z04	73,92

3.2 Antibakteriyel Testler

3.2.1 Disk difüzyon Testi

E. coli ve *S. aureus* bakterileriyle yapılan antibakteriyel aktivite sonuçları diyametrik mikrometre ile ölçülmüştür. Bismithiol Crown Eterlerin sahip oldukları antibakteriyel özelliklerinin bulguları Şekil 3.1 ve Tablo 3.2 de gösterilmiştir



Şekil 3.1: Bismithiol crown eterlerin *Staphylococcus aureus* (A) ve *Escherichia coli* (B) bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri.

Tablo 3.2: Bismithiol crown eterlerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları.

Örnekler	Zon Çapı(cm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Z01	1.4	1.5
Z02	1.1	1.6
Z03	0	2
Z04	1	0

3.2.2 Mikro Broth Dülisyon Testi

Bismithiol Crown Eterlerin sahip oldukları Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları özelliklerinin bulguları Tablo 3.3 te gösterilmiştir

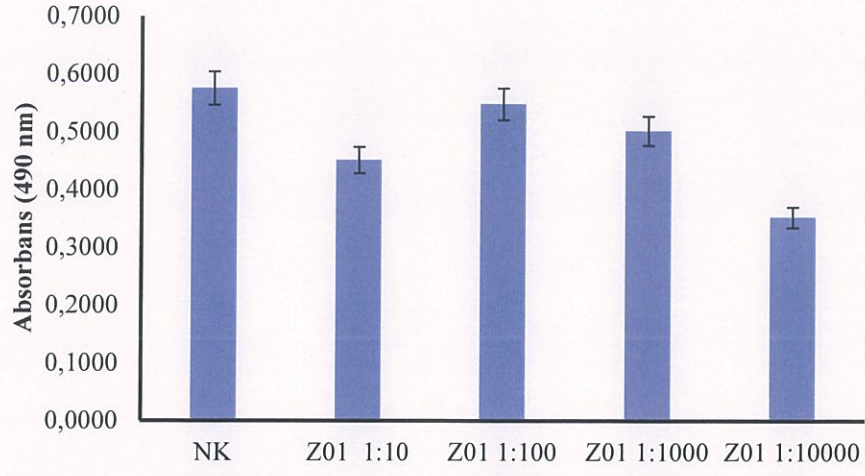
Tablo 3.3: Bismithiol Crown Eterlerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları.

Örnekler	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (ppm= μ g/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Z01	250	62.5
Z02	250	62.5
Z03	250	125
Z04	250	125

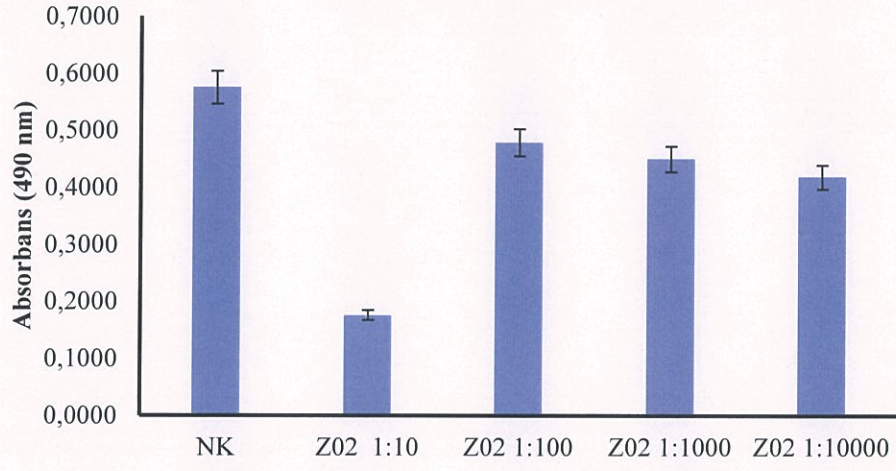
3.3 Sitotoksik Aktivite Sonuçları

3.3.1 MTS Assay Sonuçları

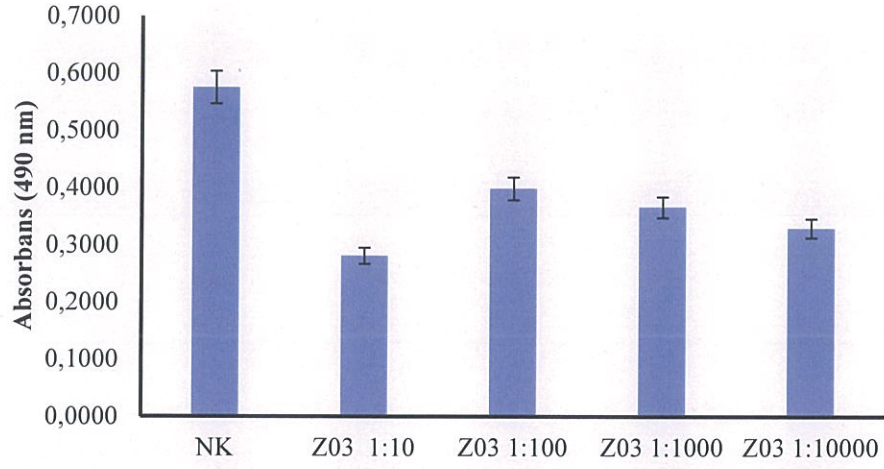
MTS Assay yönteminde amaç hücre kültüründe büyütülen hücrelerin Dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Yaşayan hücrelerde bu enzim aktivitesi gözlemlenirken l hücrelerde aktivite gözlenmemektedir. Analiz sonuçları Şekil 3.2 – 3.13'te sunulmuŐtur.



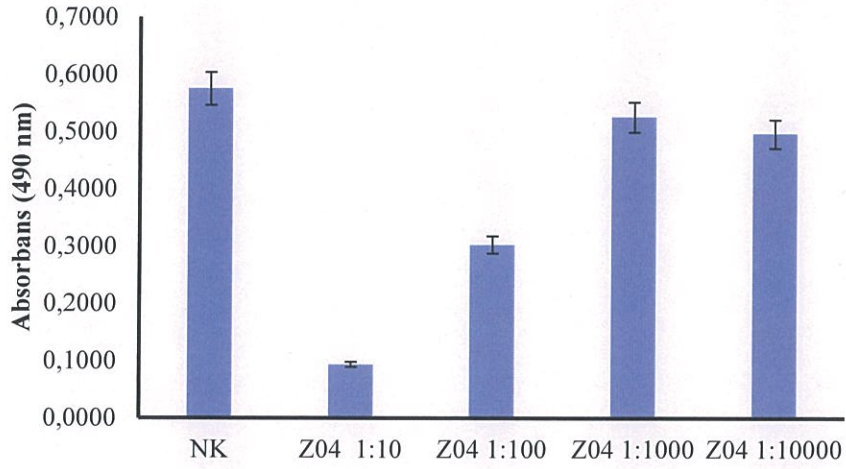
Şekil 3.2: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu.



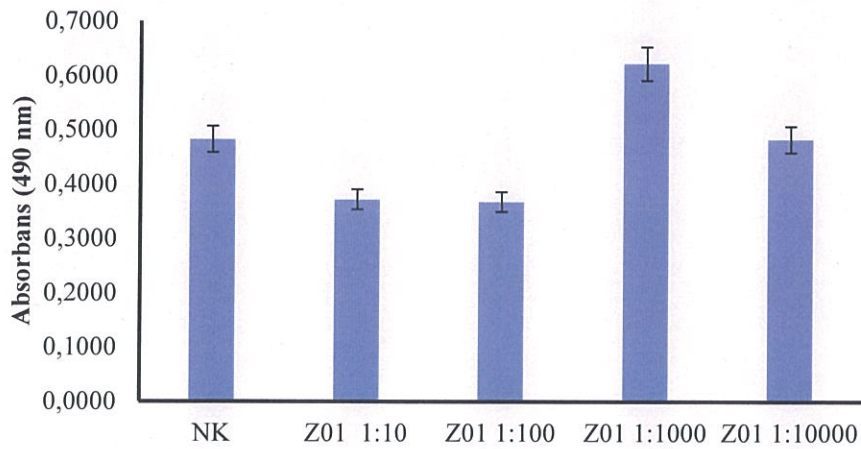
Şekil 3.3: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu.



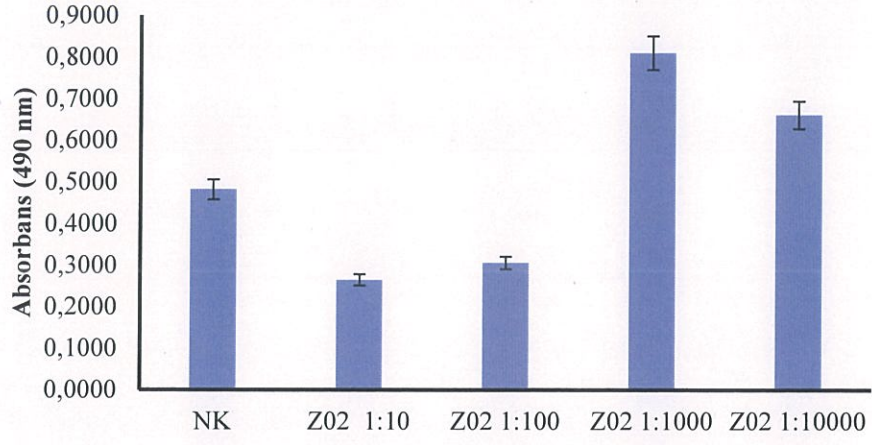
Şekil 3.4: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu.



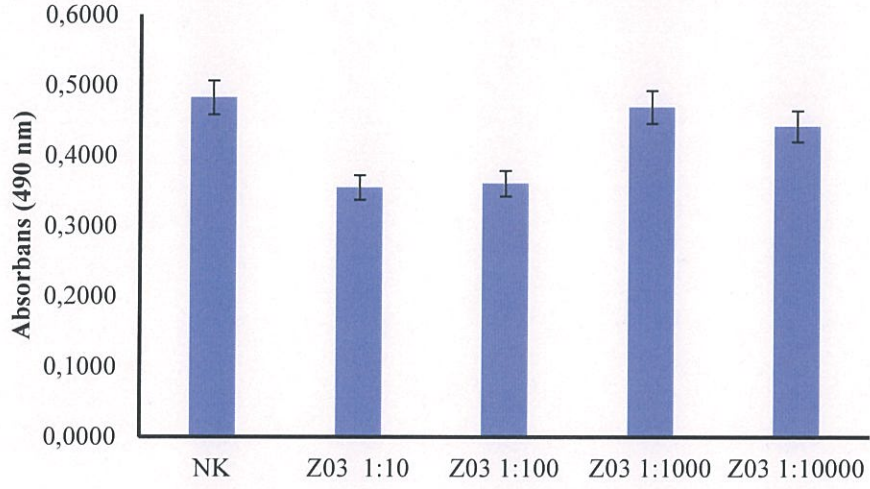
Şekil 3.5: 24 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu.



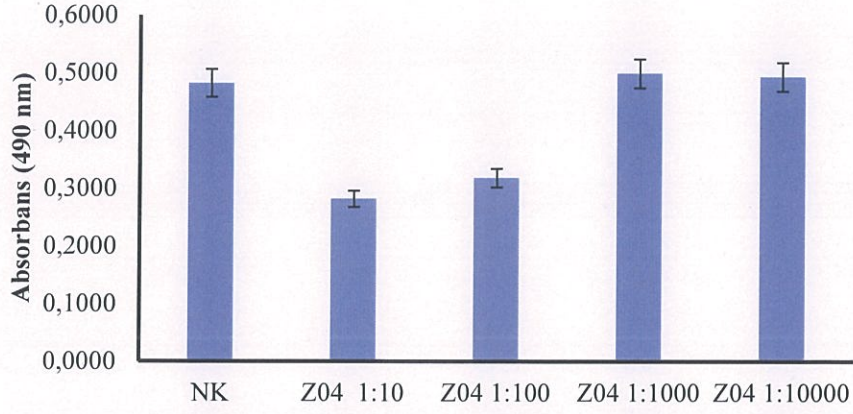
Şekil 3.6: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu.



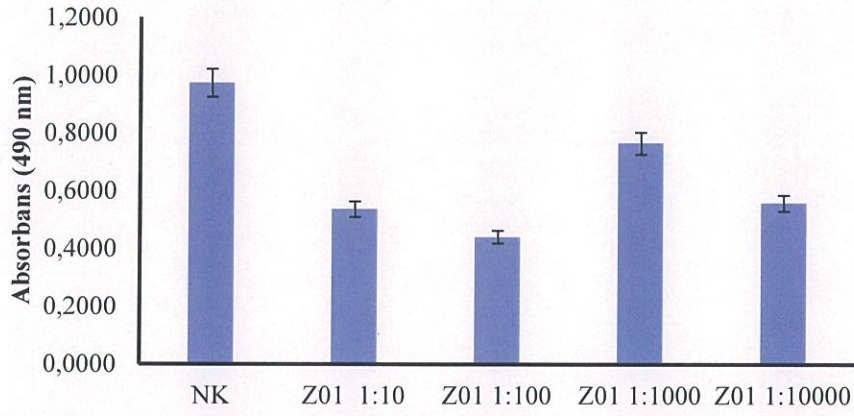
Şekil 3.7: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu.



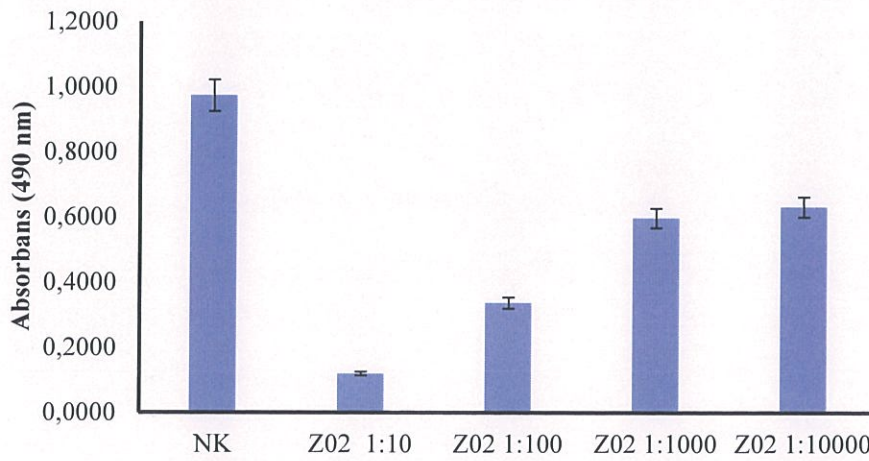
Şekil 3.8: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu.



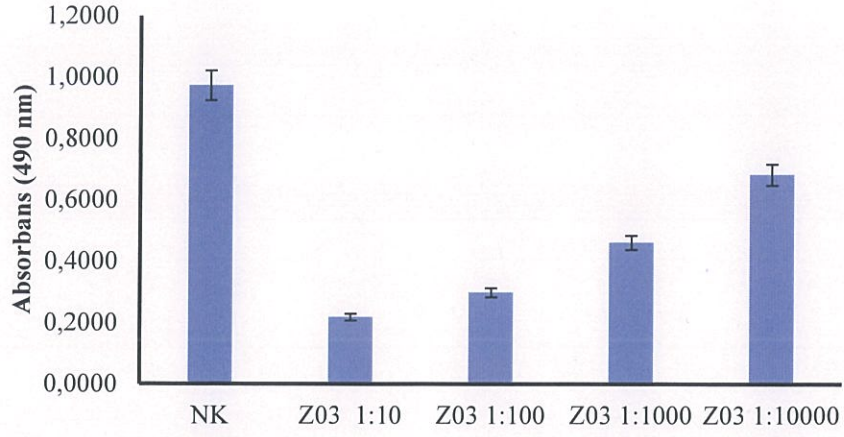
Şekil 3.9: 48 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu.



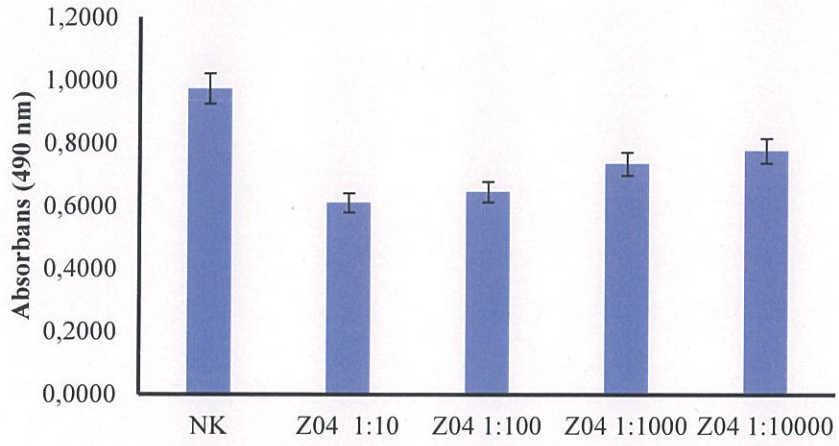
Şekil 3.10: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z01 örneği için MTS Assay sonucu.



Şekil 3.11: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z02 örneği için MTS Assay sonucu.



Şekil 3.12: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z03 örneği için MTS Assay sonucu.

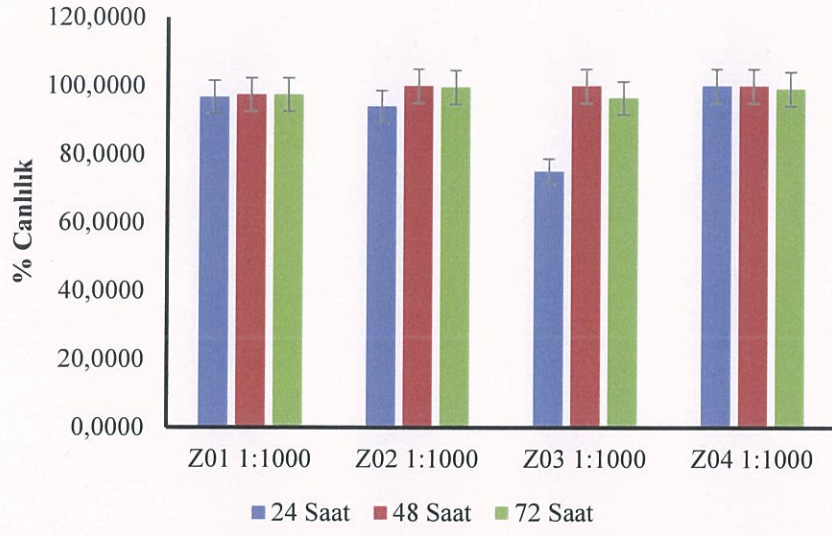


Şekil 3.13: 72 saatlik inkübasyon sonrası Z04 örneği için MTS Assay sonucu.

3.3.2 Tripan Mavisi Test Sonuçları

Tablo 3.4: Tripan mavisi testi sonucu elde edilen % canlılık oranları.

Örnek Adı	24 Saat Sonucu	48 Saat Sonucu	72 Saat Sonucu
Z01 1:10	% 93,50	% 100,00	% 95,00
Z01 1:100	% 99,50	% 100,00	% 96,50
Z01 1:1000	% 96,75	% 97,50	% 97,50
Z01 1:10000	% 96,50	% 100,00	% 99,61
Z02 1:10	% 97,50	% 100,00	% 86,36
Z02 1:100	% 85,35	% 100,00	% 99,55
Z02 1:1000	% 93,98	% 100,00	% 99,65
Z02 1:10000	% 89,00	% 100,00	% 99,35
Z03 1:10	% 47,00	% 100,00	% 86,95
Z03 1:100	% 47,50	% 97,50	% 98,60
Z03 1:1000	% 75,00	% 100,00	% 96,50
Z03 1:10000	% 100,00	% 100,00	% 97,50
Z04 1:10	% 100,00	% 100,00	% 100,00
Z04 1:100	% 94,50	% 100,00	% 99,42
Z04 1:1000	% 100,00	% 100,00	% 99,18
Z04 1:10000	% 85,70	% 100,00	% 95,70



Şekil 3.14 : Örneklerin tripan mavisi testi ile belirlenen % canlılık oranları.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, bazı Bismithiol Crown Eter'lerin Z01: (1,4,10,13)-tetratiya[4.4](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z02: (4,16)-diokso-(1,7,13,19)-tetratiya[7.7](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z03: (4,7,19,22)-tetraokso-(1,10,16,25)-tetratiya[10.10](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z04: (4,7,10,22,25,28)-hekzaokso-(1,13,19,31)-tetratiya[13.13](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan) antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri çalışılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu tip bileşiklerin başta tıbbi kimya olmak üzere sağlık alanında önemli bir alanı oluşturduğu görülmektedir. Doğal ve sentetik birçok vitamin ve ilacın iskeletini oluşturan bu moleküller farmakolojik özellik bakımından ilgi çekmektedirler.

Laboratuvar ortamında sentezlenen bu moleküllerden hazırlanan stok çözeltiler kullanılarak DPPH süpürücü etki ile bileşiklerin % antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bileşiklerin farklı antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Tablo 3.1 incelendiğinde, Bismithiol Crown Eter'lerden Z04 molekülü %73.92 oranında oldukça iyi bir antioksidan aktivite gösterirken, Z03 molekülü ise %2.14'lük bir değer ile düşük bir antioksidan etki göstermiştir. Z01 ve Z02 moleküllerinin ise, DPPH oksidanına karşı hiçbir antioksidan aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir.

Endüstriyel proseslerde besinlerin saklama süresini uzatmak için esas olarak sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Antioksidanlar insan beslenmesinde ve gıda teknolojisinde önemli rolü olan bileşiklerdir. Gıdalarla alınan antioksidan bileşikler, bünyedeki olumlu etkileri nedeniyle sağlıklı yaşamda ve insan ömrünün uzatılmasında etkin bir rol oynarlar. Bunun yanı sıra gıda katkısı olarak kullanılan antioksidanlar ise gıdada istenmeyen bazı değişiklikleri engelleyerek raf ömrü daha uzun olan ve daha sağlıklı gıdaların üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksiditoluen (BHT), propil gallat (PG) ve tert-bütillhidroksikuinon (TBHQ) gibi sentetik bileşikler ucuz, etkili ve stabil olmalarından dolayı antioksidan olarak yaygın olarak kullanılırlar. Ancak pekçok araştırmacı uzun süredir besin proseslemede kullanılan BHA, BHT, PG ve TBHQ gibi

bazı sentetik antioksidanların canlı organizmalarda karsinojenik etki gösterdiğine dikkat çekmektedirler. Ek olarak, sentetik antioksidanların sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı kullanımlarının azaltılmasına yönelik eğilim, doğal maddelerin antioksidan özelliklerinin araştırılmasına yönelik çalışmaların artmasına ve popülerite kazanmasına neden olmuştur. Yan etkilere rağmen hala kullanılmakta olan bu sentetik antioksidanların 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarındaki % antioksidan kapasiteleri %85 civarlarında bulunmuştur. [55]. Gıda endüstrisinde bir radikal yakalacı olarak kullanılan BHT'nin % antioksidan aktivite değeri ise 55.8'dir. Görüldüğü gibi çalışma materyali olan bileşiklerimizden Z04'ün antioksidan aktivitesi BHT'den yüksektir [56].

Benzer bir çalışmada ise, 1-Asetil-3,4-Disubstitue-4,5-Dihidro-1*h*-1,2,4-Triazol-5-On türevlerinin farklı konsantrasyonları (12.5, 25 ve 37.5 µg/ml) ile yapılan DPPH giderme aktiviteleri yaklaşık olarak %20-25 olarak hesaplanmıştır [57].

Antibakteriyel duyarlılık testlerinden olan disk difüzyon ve MIC testlerinin sonuçları değerlendirildiğinde, bileşiklerin gram pozitif ve gram negatif bakteri suşlarına karşı farklı derecede etki gösterdiği belirlenmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerin disklere emdirilmesi ile yapılan disk difüzyon test sonuçlarına bakıldığında; her iki bakteri suşlarına karşı etkili olan bu moleküllerin, gram pozitif *S. aureus*'a karşı daha etkili oldukları gözlemlenmiştir. Tablo 3.2 ve Şekil 3.1 göz önüne alındığında, Z03'ün *E. coli*'ye, Z04'ün ise *S. aureus*'a karşı zon oluşturmadıkları belirlenmiştir. Buna karşın, Şekil 3.1'den görüldüğü gibi Z01 ve Z02 bileşiklerinin her iki bakteri suşuna karşı oldukça etkili oldukları saptanmıştır. Z04 bileşiği, sadece *E. coli* bakterisine karşı zon oluştururken, Z03 ise *S. aureus*'a karşı zon oluşturmuştur. Tablo 3.2 ve Şekil 3.1 incelendiğinde, Z01, Z02 ve Z04 stok çözeltilerinin disk difüzyon testi ile *E. coli*'ye karşı sahip oldukları zonların çapı sırasıyla 1.4, 1.1 ve 1 cm iken, Z01, Z02 ve Z03 stok çözeltilerinin *S. aureus*'a karşı sahip oldukları zonların çapları sırasıyla 1.5, 1.6 ve 2 cm olarak hesaplanmıştır. Literatür ile karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan tiyadazol bileşiklerinin oldukça etkin bir antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Çalışmada kullanılan tiyadazol bileşiklerinin önemli oranda antibakteriyel aktiviteye sahip olması ilerde antimikrobiyal teropatik ajanlar olarak kullanılabilmesi ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Örneğin; M. Karadağ'ın yaptığı çalışmada; 1-Asetil-3,4-

Disubstitue-4,5-Dihidro-1*h*-1,2,4-Triazol-5-On türevlerinin gram pozitif ve gram negatif bazı bakteri türlerine karşı olan antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı sentezlenen bazı bileşikler düşük ölçüde antimikrobiyal etkinlik gösterirken bazılarının ise hiç aktivite göstermediği gözlemlenmiştir [57]. Aamer Saeed ve arkadaşları, sentezledikleri 2-imino-thiazolidin-4-ones türevlerinin antibakteriyel aktivitelerini ölçmek için disk difüzyon testinde *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas auerginosa*'ya karşı sırasıyla 24-35, 30-38, 21-34 ve 15-33 mm aralığındaki zonları tespit etmişlerdir. [58]. Başka bir çalışmada Sunny Jalhan ve arkadaşları, sentezledikleri tiyadiazol türevlerinin antibakteriyel etkilerini standart ampisilin antibiyotiği ile karşılaştırmak üzere bir araştırma yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda, tiyadiazol türevlerinin iyi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir [43]. Yaptığımız çalışmanın literatüre uygunluk gösterdiği, bunun yanı sıra disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmelerinin mümkün olmadığı minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) temel alınarak yapılan değerlendirme çalışmasında 100 µg/mL'den daha düşük konsantrasyonlarda mikrobiyal gelişim engellendiği için o çözeltinin antimikrobiyal aktivitesinin iyi bir düzeyde olduğu belirlenir. Bunun devamında 100-500 µg/mL arasında antimikrobiyal aktivitenin orta seviyede, 500-1000 µg/mL arasında antimikrobiyal aktivitenin zayıf ve son olarak 1000 µg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarda ise çözeltinin antimikrobiyal aktivitesinin hiçbir şekilde gözlenemediği tespit edilebilmektedir [59]. Tablo 3.3 incelendiğinde, Gram negatif *E. coli*'ye karşı tüm bileşiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarının 250-500 µg/mL aralığında oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bileşiklerin gram negatif bakterilere karşı orta seviyede bir aktivite gösterdiği söylenebilir. Gram pozitif *S. aureus* bakterisine karşı oldukça etkili olan Z01 ve Z02 bileşiklerinin 62.5µg/mL MİK değerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durumda bu iki bileşik 100 µg/mL'den daha düşük konsantrasyonda bakteri gelişimini durdurduğu için oldukça etkili bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları söylenebilir. Z03 ve Z04 bileşiklerinin MİK değerleri 125 µg/mL olarak bulunmuştur. Z03 ve Z04 bileşiklerinin, *S. aureus*'a karşı MİK değerleri 100-500 µg/mL aralığında

bulunmuştur. Bu değerler antibakteriyel aktivitenin orta seviyede olduğunu göstermiştir.

24 saatlik inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen MTS Assay sonucunda Z01, Z02 ve Z03 örneklerinin 1:100 konsantrasyonunda diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. 1:10 konsantrasyonunun negatif kontrolle kıyaslandığında hücre yaşamlılığını azalttığı görülmektedir. Z04 örneğinin ise 1:1000 konsantrasyonda diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan MTS Assay sonucunda ise Z01, Z02, Z03 ve Z04 örneklerinin 1:1000 oranında seyreltildiğinde diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. 72 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan MTS Assay sonucuna bakıldığında ise Z01 ve Z04 örneklerinin 1:1000 oranında seyreltildiğinde diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmekteyken, Z02 ve Z03 örneklerinin 1:10000 konsantrasyonda daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. Bu veriler ile tüm örneklerin 1:1000 konsantrasyonunda kullanılması halinde lenfosit hücreleri için toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Anelia ve arkadaşları 2009 yılında 1,2,4-triazol ve 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerini kullanarak olgun fareler üzerinde yaptıkları sitotoksitite deneyi sonucunda bu bileşiklerin timositlere karşı yüksek toksik etki gösterdiği ancak kan lenfositlerine ise karşı oldukça düşük toksik etki gösterdiği saptanmıştır [60].

MTS testi sonucu karar verilen 1:1000 konsantrasyonu için tüm örneklere uygulanan tripan mavisi testi sonucu Şekil 13'te verilmektedir. Z03 örneğinin 24. saatte % canlılık oranını azalttığı görülürken, bu negatif etkinin 48. ve 72. saatlerde kaybolduğu görülmüştür. Tüm örneklerin 48. ve 72. saatteki % canlılık oranlarının %90'dan fazla olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bazı Bismithiol Crown Eter'lerin (Z01: (1,4,10,13)-tetratiya[4.4](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z02: (4,16)-diokso-(1,7,13,19)-tetratiya[7.7](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z03: (4,7,19,22)-tetraokso-(1,10,16,25)-tetratiya[10.10](2,5)-1,3,4-tiyadiazolofan, Z04: (4,7,10,22,25,28)-hekzaokso-(1,13,19,31)-tetratiya [13.13] (2,5)-1,3,4- tiyadiazolofan) antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri çalışılmıştır.

Yapmış olduğumuz analizlere göre;

- 1 – Antioksidan aktivitesi en yüksek olan bileşik Z04 bileşiğidir (%73.92)
- 2 – Antibakteriyel test sonuçları dikkate alındığında, tüm bileşikler hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerine karşı etkili oldukları ve etki derecelerinin farklı oldukları tespit edilmiştir. Z01 ve Z02 bileşikleri her iki bakteri türüne karşı etkili olurken, Z04 bileşiği, *E. coli* bakterisine karşı, Z03 ise *S. aureus*'a karşı zon oluşturmuştur. Çalışmada kullanılan tiyadazol bileşiklerinin önemli oranda antibakteriyel aktiviteye sahip olması ilerde antimikrobiyal teropatik ajanlar olarak kullanılabilceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir.
- 3 – Sitotoksik aktivite sonucunda ise Z01, Z02, Z03 ve Z04 örneklerinin 1:1000 oranında seyreltildiğinde diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. 72 saatlik inkübasyon sonucunda yapılan MTS Assay sonucuna bakıldığında ise Z01 ve Z04 örneklerinin 1:1000 oranında seyreltildiğinde diğer konsantrasyonlara göre daha iyi absorbans verdiği görülmekteyken, Z02 ve Z03 örneklerinin 1:10000 konsantrasyonda daha iyi absorbans verdiği görülmektedir. Bu veriler ile tüm örneklerin 1:1000 konsantrasyonunda kullanılması halinde lenfosit hücreleri için toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Alp, H., Gok, H.Z., Kantekin, H. and Ocak, U., "Synthesis and metal ion binding properties of thiaaza crown macrocycles", *Journal of Hazardous Materials*, 159, 519–522, (2008).
- [2] Açıkkalp, E., "Taç eterlerin özellikleri", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir, (1986).
- [3] Pedersen, C.J., "Cyclic poly ethers and complexes with metal salts", *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 7017, (1967).
- [4] Yardımcı, D., "Formilbenzo 15-taç-5 türevlerinin ve komplekslerinin sentezi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2007).
- [5] Pedersen, C.J., "The discovery of crown ethers", E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware 19898, (1987).
- [6] Dani, R.K., Bharty, M.K., Kushawaha, S.K., Prakash, O., Singh, K.R. and Singh, N.K., "Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of (Z)-N'(1,3,4-thiadiazol-2-yl) acetimidate: Synthesis, spectral, solid state electrical conductivity, X-Ray diffraction and DFT study", *Polyhedron*, 65, 31–41, (2013).
- [7] Zhivotova, T.S., "Reaction of 1,3,4-thiadiazol-2,5-dithiol with N-acryloyl-substituted derivatives of several alkaloids", *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 6, (2009).
- [8] Wilton-Ely, D.E.T.J., Schier, A., Mitzel, W.N. and Schmidbaur, H., "Diversity in the structural chemistry of (phosphine)gold(I) 1,3,4-thiadiazole-2,5-dithiolates (Bismuthiolates I)", *Inorg. Chem.*, 40, 6266-6271, (2001).
- [9] Zhivotova, T.S., "Reaction of 1,3,4-thiadiazol-2,5-dithiol with N-acryloyl-substituted derivatives of several alkaloids", *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 6, (2009).

- [10] Cicek B., Onbasioğlu, Z., “Synthesis and characterization of 1,3,4-thiadiazole-2,5-dithio crown ethers”, *De Gruyter*; 22-6: 329–332 (2016).
- [11] Vasimalai, N, John, S.A., “Ultrasensitive and selective spectrofluorimetric determination of Hg(II) using a dimercapthiadiazole fluorophore”, *Journal of Luminescence*, 131, 2636–2641, (2011).
- [12] Cadenas, E., Basic mechanisms of antioxidant activity, *Biofactors*, 6, 391–397 (1997).
- [13] Sies, H., Stahl, W. , “Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1315-1321 (1995).
- [14] Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 617-618, 796-811, 837-844, (2005).
- [15] Aruoma, O.I., Extracts as antioxidant prophylactic agents, *Inform*, 8, 1236-1242 (1997).
- [16] Diplock, A.T., Safety of antioxidant vitamins and beta-carotene, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1510-1516 (1995)
- [17] Diken, M. E., “Bazı Şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [18] Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding, *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68 (2000).
- [19] Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1-40 (2006).
- [20] Mates, J.M., Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83-104 (2000).

- [21] Miller, H.E., Rigelhof, L.M., Prakash, A., Kanter, M.A. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruit and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*, 19:312-319, (2000).
- [22] Pokorny, J., Korczak, J. Preparation of Natural Antioxidants Antioxidants in Food: Practical Application. Cambridge England: Wood head Publishing Limited. pp. 311-41, (2001).
- [23] Levy SB,. Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet*, 10:83-88, (1982).
- [24] D, P.M,. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed., Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J., Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 593–627, (2001).
- [25] Fluit AC, Van Der Bruggen JT, Aarestrup FM, Verhoef J, Jansen WT, Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 12: 410–417, (2006).
- [26] McEwan SA, Aarestrup FM, Jordan D, Monitoring of antimicrobial resistance in animals: principles and practices In: Aarestrup FM, ed., Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, DC: ASM Press, 397-413, (2006).
- [27] Schwarz S, Siley P, Simjee S, Woodford N, Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W, Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother*, 65: 601- 604, (2010).
- [28] Helmrich A, Barnes D. Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*,; 57:3-17, (1998).
- [29] Ekwall, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,407, 64-77, (1983).
- [30] Ekwall, B., Silano, V. And Zucco, F., “Toxicity test with mammalian cell cultures”, Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects, Bordeau, P. Ed., 75–98, (1990).

- [31] Yılmaz, B., Doğan, S. ve Kasımoğulları, S. C., "Hemocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity of poly(methylmethacrylate)/nanohydroxyapatite nanocomposites synthesized by melt blending method". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. (2017)
- [32] Klaassen, E. D.,and Stacey, N.H. Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. In: Plaa, G.,and Hewitt, W.R. (Eds), *Toxicology of the Liver*, RavenPress, New York, pp. 147-79, (1982).
- [33] Auricchio, S., De Ritis, G., De Vincenzi, M., and Silano, V. Toxicity mechanisms of wheat and other cereals in celiac disease and related enteropathies. *J. Pediaer. GaseroenterolNutr.*,4, 923 30, (1985).
- [34] Onbaşıoğlu, Z., "Bismithiol Crown Eter Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2015).
- [35] Tayamon, S., Tiekink, T., Nikpour, F., Ravoof, T., et al., "Isolation, characterization and X-Ray structure determination of 2,5 bis(4-methylbenzylthio)-1,3,4-thiadiazole", *J. Chem. Crystallogr*, DOI 10.1007/s10870-013-0474-2, (2013).
- [36] Başak, A. and Dugas, H. Design and Synthesis of DNA intercalating crown ether molecules, *Tetrahedron Letters*. 27; pp.3-6, (1986).
- [37] Keskin, C. S. ve Özdemir, A. SAÜ. *Fen Bilimleri Dergisi*, 11. Cilt, 1. Sayı, s. 47-53, (2007).
- [38] Vasimalai, N., Sheeba, G. and John, S.A., "Ultrasensitive fluorescence-quenched chemosensor for Hg(II) in aqueous solution based on mercaptothiadiazole capped silver nanoparticles", *Journal of Hazardous Materials*, 213–214, 193–199, (2012).

- [39] Kalimuthu, P., Suresh, D. and John, S.A., "Uric acid determination in the presence of ascorbic acid using self-assembled submonolayer of dimercaptothiadiazole-modified gold electrodes", *Analytical Biochemistry*, 357, 188–193, (2006).
- [40] Guida, W.C. and Mathre, D. J. Phase-Transfer Alkylation of Heterocycles in the Presence of 18-Taç-6 and Potassiumtert-Butoxide. *J. Org. Chem.*, 45; 3172-3176, (1980).
- [41] Katayama, Y., Nita, K., Veda , M., Nakarama , H. and Takagi, M. Synthesis of Chromagenic Taç Ethersand Liquid Extraction of Alkali Metal Ions.,*Analytica Chimica . Acta*, 173; 193-209, (1985).
- [42] Zghab, I., Trimeche, B., Touboul, D. and Jannet, H. B., "A regio selective 1,3-dipolar cyclo addition for the synthesis of novel spiro-chromenethiadiazole derivatives", *Comptes Rendus Chimie*, doi.org/10.1016/j.crci.2013.08.004, (2013).
- [43] Jalhan, S., Jindal, A., Gupta, A. and Hemraj, "Synthesis, biological activities and chemistry of thiadiazole derivatives and schiff bases", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3), 199-208, (2012).
- [44] Dürüst, Y., "Synthesis of some novel 1,3,4- and 1,2,4-thiadiazole derivatives", *Phosphorus, sulfur, and silicon and the related elements*, 184 (11), 2923-2935, (2009).
- [45] Mrozeka, A., Wojciechowska, K.J., Amiel, P. and Barbe, J., "Five-membered heterocycles. Part II. Crystal structures and HOMA index calculations for selected 1,3,4-thiadiazole derivatives", *Journal of Molecular Structure*, 524, 159–167, (2000).
- [46] Can, Ş., "Taç eterli bir salisilaldimin schiff bazı sentezi ve CoII, CuII, NiII ve UO₂VI ile komplekslerinin incelenmesi", *Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (1988).

- [47] Kerwin, S. Synthesis of a DNA- Cleaving bis(propargylic) sulfon Crown Ether, *Tetrahedron Letters*. Vol.35; pp.1023-1026, (1994).
- [48] Hipler, F., Winter, M. and Fischer, A.R., “N–H•••S hydrogen bonding in 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazole. Synthesis and crystal structures of mercapto functionalised 1,3,4-thiadiazoles”, *Journal of Molecular Structure*, 658, 179–191, (2003).
- [49] Qin, T.T., Li, J., Luo, H.Q., Li, M. and Li, N.B., “Corrosion inhibition of copper by 2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole monolayer in acidic solution”, *Corrosion Science*, 53, 1072–1078, (2011).
- [50] Ijeri, V.S. and Srivastava, A.K. Voltammetric determination of lead at chemically modified electrodes based on Taç ethers, *Anal. Scie.*, 17,605, (2001).
- [51] Karakulak, Ş. “Zeytin yapraklarından Antioksidan Eldesinde Mikro dalga ve Etüv ile Kurutmanın Çözücü, Sıcaklık ve Zaman Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, (2009).
- [52] Kara, S., Farklı Kurutma Yöntemlerinin Zeytin Yaprağındaki Fenolik Madde Dağılımına ve Antioksidan Kapasitesine Etkisinin Araştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [53] Basile A., et all., “Antibacterial and Antioxidant Activities in Sideritisitalica Miller) Greuter et Burdet essential oils”, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 240–248, (2006).
- [54] Promega Corporation, “CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay,” [Www.Promega.Com/Protocols/](http://www.Promega.Com/Protocols/), pp. 2014–12–15, (2012).
- [55] Yavaşer, R. —Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, (2011).

- [56] Sagdic, O., Aksoy, A., Ozkan, G., Ekici, L. and Albayrak, S. "Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey", *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 80-84, (2008).
- [57] Karadağ, M. - Bazi Yeni 1-Asetil-3,4-Disubstitue-4,5-Dihidro-1h-1,2,4-Triazol-5-On Türevlerinin Sentezi e Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kars, (2015).
- [58] Aamer S., Naeem A. and Ulrich F., "Synthesis and Antibacterial Activity of some Novel 2-Aroylimino-3-aryl-thiazolidin-4-ones" *J. Braz. Chem. Soc.* 18, (3), 559-565, (2007).
- [59] G. Pessini, B.P.D. Filho, C.V. Nakamura, D.A.G. Cortez, Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 1115-1120 (2003).
- [60] A. Mavrova, D. Wesselinova, "Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells" *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 , 63-69, (2009).