

Araştırma Makalesi - Research Article

1H, 1'H-3,3'-Biindazol Maddesinin Ratlarda Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkisinin Araştırılması

Investigation of the Effect of 1H, 1'H-3,3'-Biindazole on Some Biochemical Parameters in Rats

Ebru Çöteli^{1*}, Fikret Karataş², Haki Kara³, Süleyman Servi⁴

Geliş / Received: 22/09/2021

Revize / Revised: 18/01/2022

Kabul / Accepted: 19/01/2022

ÖZ

İndazoller kimya ve farmakoloji'de önemli bileşiklerdir. Bu çalışmada, ratlara belirli sürelerde enjekte edilen 1H,1'H-3,3'-biindazol maddesinin, ratların kan serumu, karaciğer ve böbrekteki antioksidan vitaminler (A, E, C), Se, MDA miktarları ile GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Serum, karaciğer ve böbrek numunelerindeki selenyum miktarları florimetrik metotla, A, E, C ve MDA seviyeleri ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Eritrositlerin GSH-Px enzim aktivite miktarları spektrofotometrik metotla ölçülmüştür. Deneysel sonuçlarımız, A, E, C vitaminleri ve Se düzeylerinin genel olarak kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, 3. enjeksiyon periyodunda GSH-Px enzim aktivite miktarının maksimum arttığı ve diğer enjeksiyon periyodlarındaki aktivitelerin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 1H,1'H-3,3'-biindazolmaddesi uygulamasından sonra ratların A, E, C vitaminleri ve Se düzeyleri azalırken, MDA seviyeleri ve GSH-Px enzim aktivite miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan bu tıbbi maddelerin hayati önem taşıdığı ancak metabolizmada oksidatif strese yol açtığı belirlenmiştir. Bu maddeleri içeren ilaçların kullanımlarında antioksidan vitaminlerin ve selenyum desteğinin faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler- Biindazol, Antioksidan Vitaminler, MDA, GSH-Px, Se

ABSTRACT

Indazoles are important compounds for chemistry and pharmacology. This study aimed to investigate the amount of antioxidant vitamins (A, E, C), Se, MDA and GSH-Px enzyme activities in the blood serum liver and kidneys of rats the 1H,1'H-3,3'-biindazole injected into rats for certain periods. Amounts of selenium in serum, liver and kidney samples were determined by fluorimetric method, A, E, C, and MDA levels were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). GSH-Px enzyme activity amounts of erythrocytes were measured by spectrophotometric method. In our experimental results, it was observed that the levels of vitamins A, E, C, and Se were generally lower than the control group, maximum increase in the amount of GSH-Px enzyme activity in the 3rd injection period and the activities in the other injection periods were higher than the control group. It was determined that levels of decreased vitamin A, E, C, and Se while increased of levels MDA and GSH-Px enzyme

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: e.coteli@ahievran.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-9473-0914>)

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye

²İletişim: fkaratas@firat.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-0884-027X>)

Kimya Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye

³İletişim: hakikara@cumhuriyet.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-0295-0582>)

Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Veteriner Fakültesi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye

⁴İletişim: sservi@firat.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-0827-8624>)

Kimya Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye

activity. It has been determined that these medicinal substances used in the treatment of many diseases are vital; however, it causes oxidative stress in metabolism. It has been concluded that it may be useful beneficial of supplements antioxidant vitamins and selenium in the use of drugs containing these substances.

Keywords- *Biindazole, Antioxidant Vitamins, MDA, GSH-Px, Se*

I. GİRİŞ

İndazoller, heterosiklik aromatik organik bileşiklerdir. İndazoller doğaları gereği nadir olup, türevleri çok çeşitli biyolojik aktivite sergilerler [1]. Özellikle son yıllardaki çalışmalar, indazol iskeletini oluşturmak için çeşitli sentetik yöntemlerin denenmesi ve indazol türevlerinin geniş biyoaktivitelerinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır [2,3]. İndazol ve türevlerinin halka sistemleri, çok sayıda ilaç molekülünün oluşumuna katkı sağladığı için farmakolojik olarak önemli bileşiklerdir. Bu ilaç molekülleri granisetron, 5HT₃' ün reseptör antagonistidir ve antiemetik [4], analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar, antikanser, antiviral, antibakteriyel, antispermatojenik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [5-7]. Ayrıca indazol ve türevlerinin antifungal [8], antidepresan ve anestetik [5], antidiyabetik, antiproliferatif, antipsikotik, antitüberküloz aktivite sergilemektedirler [6]. Glukagon reseptörü [9] ve trombin reseptörü [10] antagonizması olan indazol ve indazol bazlı bileşikler rapor edilmiştir. Ayrıca 7-Nitroindazol (7-NI) güçlü bir hidroksil radikali (OH[•]) temizleyicisi olduğu bildirilmiştir [11]. Özellikle indazol ve indazol analogları kanser tedavisinde hayati önem taşırlar [12,13].

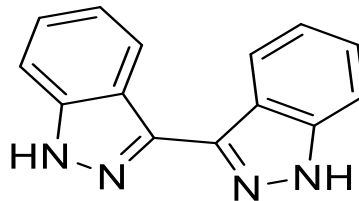
Bu çalışmada, ratlara belirli sürelerde verilen 1H,1'H-3,3'-biindazolmaddesinin, ratların kan serumu, karaciğer ve böbrekteki antioksidan vitaminler (A, E ve C), Se, MDA miktarları ile GSH-Px enzim aktivitelerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Materyal

Bu çalışmanın Etik Kurul Belgesi Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyle Yeri Etik Kurulunda alınmıştır. Ayrıca çalışma protokolü kurumsal etik kurul onayı (2016, sayı 65202830-050.04.04.2011) ile birlikte çalışma öncesinde yazılı onayı alınan gönüllülerde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prosedürler "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Klavuzunda" belirtilen standartlara uygun olarak yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 1H,1'H-3,3'-biindazol maddesi literatüre göre sentezlenmiştir [14]. Toplam 36 erkek Wistar sıçan (14-16 hafta, 200-220 g) kullanılmıştır. Hayvanların iki hafta boyunca sıcaklık kontrollü bir odada (22- 25 °C), paslanmaz çelik kafeslerde 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüyle tutulup ortama uyumları sağlanmıştır. Sıçanlara pelet diyeti ve istedikleri kadar musluk suyu verilmiştir. Hayvanlar kontrol grubu (n:18 adet) ve deney grubu (n:18 adet) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Kontrol grubuna mısır yağında çözülmüş % 10 DMSO çözeltisinden 250 µL deri altına enjekte edilmiştir. Deney grubunda ise; her gün aynı saatte olmak şartıyla %10 DMSO' da çözülmüş 20 mg kg⁻¹ 250 µL 1H,1'H-3,3'-biindazol maddesi verilmiştir. Enjeksiyonlara 30 gün boyunca devam edilmiştir. Tüm hayvanlara deney süresi boyunca normal bir diyet uygulanmıştır. 3., 7. ve 15. enjeksiyonlardan sonra her gruptan 6 sıçan aşırı dozda eter ile öldürülmüştür. Hayvanların kan, karaciğer ve böbrek örnekleri toplanılarak analizleri yapılabilmek için -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 1. 1H,1'H-3,3'-biindazol

B. Yöntem

1) Serum, Karaciğer ve Böbrek Örneklerinin A ve E Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi: Serum, karaciğer ve böbrek örneklerinden (1.0 mL veya 1.0 g) alınarak üzerine 2.0 mL etanol: sülfürik asit (99:1) karışımından ilave edilerek. proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Numuneler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 4500 devirde 5

dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen örnekler üzerine 0.3 mL n-hekzan ilave edilerek tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda hekzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alınmıştır. Örnek üzerine tekrar 0.3 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlenmiştir. Numunelerin n-hekzan fazları birleştirilmiştir. Örneklerin ekstrakte edilen hekzan fazları azot gazı ile dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmış ve tüpteki kalan kalıntı 0.10 mL metanol’ de çözülmüştür. Bu çözültiden 20 µL alınıp HPLC’ ye enjekte edilmiştir. HPLC’ de mobil faz olarak metanol: su (98:2) karışımı ve SUPELCOSIL LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5µm) kolonu kullanılarak 326 nm’ de A vitamini ve 296 nm’ de ise E vitamini miktarları belirlenmiştir [15,16].

2) *Serum, Karaciğer ve Böbrek Örneklerinin C Vitamini ve MDA Miktarlarının Belirlenmesi:* C vitamini miktarlarının belirlenmesi için; serum, karaciğer ve böbrek örneklerinden (1.0 mL veya 1.0 g) alınarak üzerine 0.5 M HClO₄’ den 0.5 mL ilave edilerek vortekslenmiştir. Vortekslenen bu karışım 4500 devir/dk’ da 5 dk santrifüjlenerek proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüjlenen örneğin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20 µL alınarak HPLC’ye enjekte edilmiştir. HPLC’de hareketli faz olarak: 3,7 mM KH₂PO₄ (pH=4), akış hızı: 0.8 mL/dk ve 245 nm’ lik dalgaboyunda, Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6×150 mm) kolonu kullanılarak C vitamini miktarları tayin edilmiştir [17].

Örneklerin MDA miktarlarının belirlenmesi için; C vitamini tayini için hazırlanmış olan süzütüden 20 µL alınarak HPLC’ ye tekrar enjekte edilmiştir. HPLC’ de Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6×150 mm) kolonunda, 30 mM KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%65-%35), pH: 4’e H₃PO₄ ile ayarlanmış mobil faz kullanılarak 254 nm dalga boyunda MDA miktarları belirlenmiştir [18].

3) *Serum, Karaciğer ve Böbrek Örneklerinde Selenyum Miktarlarının Belirlenmesi:* Selenyum tayini için serum, karaciğer ve böbrek örneklerinden (1.0 mL veya 1.0 g) alınmıştır. Örneklerin içerisine 5.0 mL perklorik asit: nitrik asit (1: 5, v /v oranında) karışımı ilave edilip, teflon bomba içerisinde 120 °C’ de etüvde 12 saat bekletilerek parçalanması sağlanmıştır [19]. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan parçalanmış örnekler üzerine ortamın derişimi 4N HCl olacak şekilde derişik HCl ilave edilerek 90°C’ de su banyosunda 15 dakika ısıtılmıştır. Ortamda HNO₃ etkisiyle +6 değerliğe yükseltgenmiş olan selenyumun +4 değerlikli olması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler üzerine 0.1 M EDTA çözültisinden 5 mL ve 2.5 M HCOOH çözültisinden de 2 mL katılarak karıştırılmıştır. Daha sonra ortamın derişimi 1000 µg/mL olacak şekilde 1,2-diaminobenzen çözültisinden katılarak karıştırılmıştır. Kompleks oluşumu için 4N NH₃ile örneklerin pH’ ı 1.5’ e ayarlanmıştır. Kompleks oluşumunun tamamlanması için örnekler karanlıkta 60 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda örnekler üzerine 0.5 mL n-hekzan ilave edilerek ayırma hunisine alınmış ve iyice karıştırılmıştır. Ayırma hunisindeki n-hekzan fazı bir tüpe alınmıştır. Kolon tüpe alınan n-hekzan fazından 20 µL alınarak HPLC’de dalga boyu 332 nm, mobil faz metanol : su (1:1) karışımı ile akış hızı 1 mL/dk’ ya ayarlanarak analizlenmiştir [20]. Bu çalışmada standart ekleme yöntemi uygulandığından çalışma grafiği ile Se grafiğinin paralel olduğu ve girişimin olmadığı tespit edilmiştir. Deneysel veriler çalışma grafiği ile değerlendirilmiştir.

4) *Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Miktarlarının Belirlenmesi:* GSH-P_x H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutayonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini kataliz etmektedir. H₂O₂’ in bulunduğu ortamda GSH-P_x’ in oluşturduğu GSSG, GSH-Rd ve NADPH yardımıyla tekrar GSH’ a indirgenir. GSH-P_x aktivitesi NADPH’ in NADP⁺’ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm’ de okunmasıyla ölçülmektedir.

GSH-Px aktivitesinin tayini için; örnek ve kör numune tüpleri alınmıştır. Örnek tüpüne 50 mM Fosfat tamponundan (pH 7.5) 2.66 mL, 150 mM GSH çözültisinden 0.1 mL, 3 mM NADPH çözültisinden 0.1 mL, ticari preparattan (U/mL, spesifik aktivite) direkt olarak seyreltme yapılmaksızın alınan GSH-Rd enziminden 0.01 mL, 1 M NaN₃ ve homojenattan 0.02 mL alınıp karıştırılmıştır. Kör tüpüne homojenat hariç diğer çözültüler konulmuştur. Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 25°C 30 dk inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda absorbansı okunacak her tüpe 0,1 mL H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Dalga boyu 340 nm’ ye ayarlanmış spektrofotometrede örnekler 5 dk süre ile takip edilmiştir. Örneklerin İlk absorbans-son absorbans değerleri okunarak 5’e bölünmüştür. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplanmıştır [21].

5) *Kimyasallar:* Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck firmasından temin edilmiş ve tüm çalışmalarda bidistile su, vitaminlerin analizlerinde ise Cecil 1100 serisi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Cotati marka 7125 enjeksiyon lobu, Cecil 68174 UV dedektörü ve HP 3395 integratörü) cihazı kullanılmıştır.

6) *İstatiksel Analiz:* Numune analizleri üç örnek halinde paralel yürütülmüştür. SPSS 17.0 Windows yazılımı (SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) program kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart

sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi ve Duncan'ın çoklu aralık testi ile ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir.

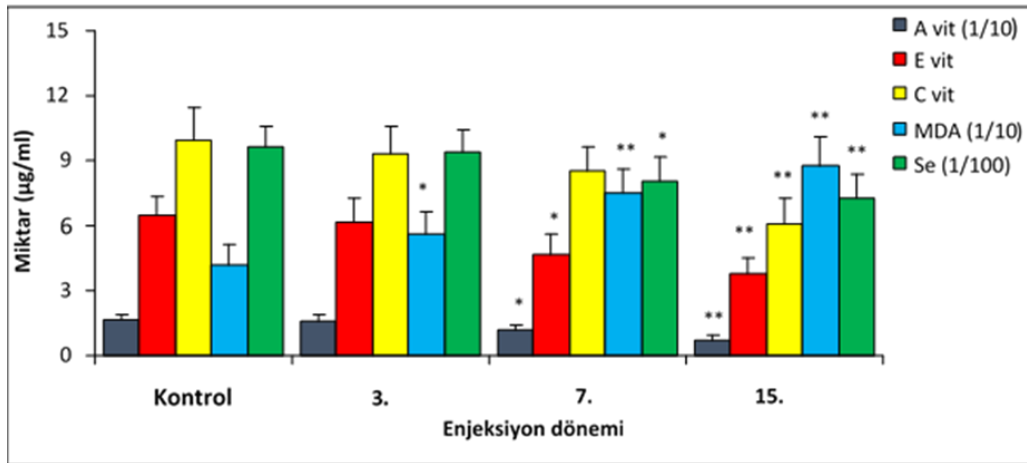
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

İndol halka sistemi, ilaç araştırmalarında en çok çalışılan farmakofor grupları arasında yer almaktadır [22]. Son yıllarda ticari olarak temin edilebilen çok sayıda ilaçta yaygın olarak bulunan İndazol analoglarına daha fazla ilgi gittikçe artmaktadır. İndazol türevleri anti-inflamatuar, antibakteriyel, anti-HIV, antiaritmikler, antifungal ve antitümör gibi geniş biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir [23]. Antimikobakteriyel olarak aktif olan birçok farmakolojik ürünün yapısında mevcuttur [24-27]. 7-Nitro İndazol ile benzeri bir yapıya sahip olan 1H,1'H-3,3'-biindazol de indol ve indazol halkaları arasında π konjikasyonlu yapıya sahiptir. Çalışmamızdaki bu maddenin sentezi ve karakterizasyonu [28]'e göre yapıldı. Bu çalışmada, 1H,1'H-3,3'-biindazol enjekte edilen ratların antioksidan vitaminleri (A, E, C), Se ile lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarına ve GSH-Px aktivitesine etkilerini belirlemek, ayrıca bu parametreler arasındaki ilişkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Hücre metabolik sürecin gereği olarak sürekli serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerini üretir. Bu serbest radikaller, karmaşık bir antioksidan sistem tarafından nötralize edilmektedir. Oksidatif stress, serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidan sistemler arasındaki denge kaybı olarak tanımlanmıştır. Serbest radikal türleri lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi hücrelerin tüm önemli bileşenlerini etkilemektedir [29].

Yapılan bu çalışmada, 1H,1'H-3,3'-biindazol enjekte edilen ratların serum A, E ve Se düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre önemli miktarlarda düşüşlerin olduğu gözlemlendi. Bu düşüşlerin aksine serum MDA düzeylerinde artışlar gözlemlenmiştir ($p < 0.01$). Serum ve kontrol grubu C vitamini değerleri karşılaştırıldığında, 15. enjeksiyonda C vitamini düzeylerinde keskin bir düşüş tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü Malondialdehit' tir. Lipid peroksitler hızla parçalanarak reaktif karbon bileşiklerini oluştururlar. 7-NI enjeksiyonu yapılan epileptik ratlarda, MDA miktarının kontrol grubuna göre düştüğü bildirilmiştir [29]. Bu çalışmada 1H,1'H-3,3'-biindazol enjekte edilen ratların tüm enjeksiyon dönemlerindeki MDA miktarları ile kontrol grubu miktarları karşılaştırıldığında; serum, karaciğer ve böbrek numunelerinin hepsinde artışların olduğu belirlenmiştir. MDA miktarlarındaki bu artışın nedeni nin lipid peroksidasyonun sonucundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür [30-32]. Enjeksiyon dönemine bağlı olarak ratların serum örneklerinin A, E, C vitaminleri, Malondialdehit düzeyleri (MDA) ve Se miktarları Şekil 2' de gösterilmiştir.

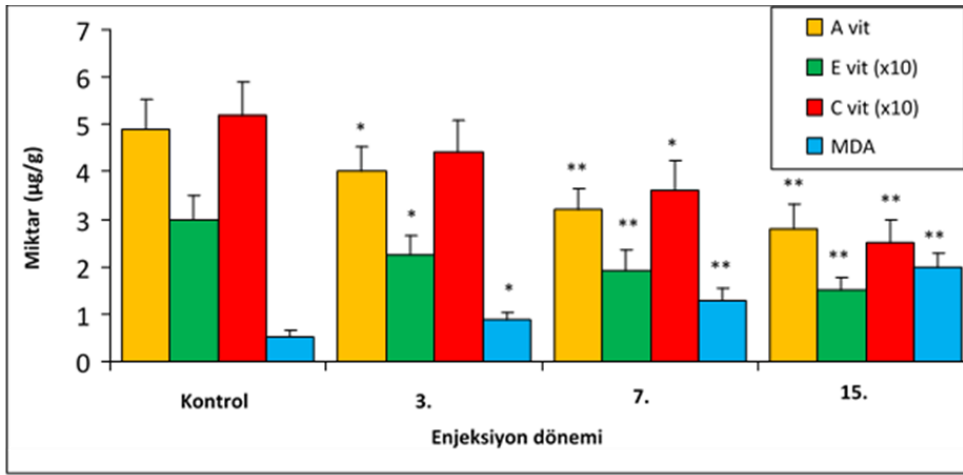


Şekil 2. Ratların enjeksiyon dönemine bağlı olarak serum vitamin (A, E, C), MDA ve Se miktarlarındaki değişim (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ kontrol ve deneysel grubun enjeksiyon dönemi)

3. Enjeksiyon sonunda karaciğer ve böbrek numunelerinde A, E ve C vitamin miktarları düşerken, MDA seviyelerinde artışların olması maksimum stresin olduğunu göstermiştir. Ratlarla yapılan bazı çalışmalarda artan MDA düzeylerinin A, E, C vitamin seviyelerinde düşüşlere yol açtığı bildirilmiştir [31, 32]. Serum A, E ve Se miktarlarının 7. enjeksiyondan sonra önemli derecede düştüğü ($p < 0.05$) bildirilmiştir. Karaciğer ve böbrek

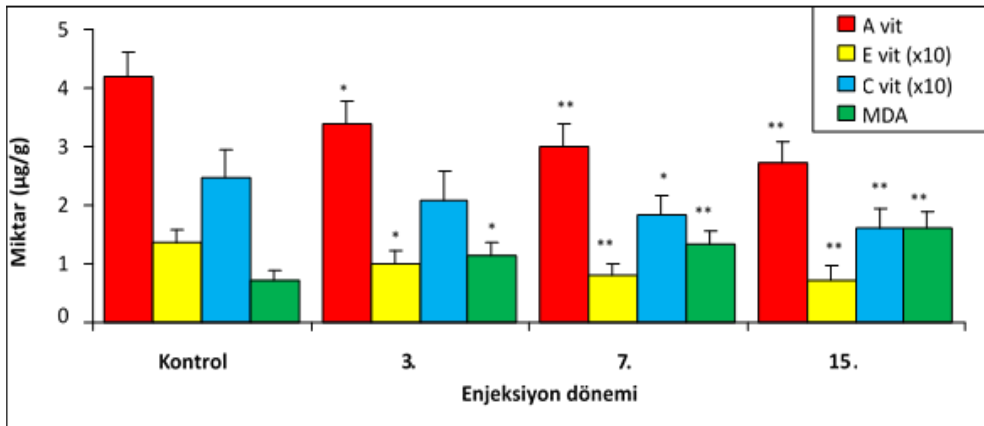
dokuların da ise; 3. enjeksiyondan sonra vitamin A, E ve Se miktarlarında düşüşlerin olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, karaciğerde depolanan A ve E vitamini düzeylerinin kademeli olarak tükendiğini göstermiştir.

Serum, karaciğer ve böbrek numunelerindeki C vitamini miktarları kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında, vitamin değerinde düşüşlerin olduğu belirlenmiştir. Bu düşüşlerin sebebinin C vitamininin antioksidan bir vitamin olması ve suda çözünen bir vitamin olmasından dolayı depolanamaması ile açıklanmıştır. Metabolik stresten kurtulmanın yolunun antioksidan vitaminlerin harcanmasıyla sağlandığı düşünülmüştür. Çünkü A, E, C ve Se vücuttaki enzimatik olmayan antioksidanlardır [33]. Sonuçlarımızın literatürlerle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Enjeksiyon dönemine bağlı olarak ratların karaciğer dokusu örneklerinin A, E, C vitaminleri, Malondialdehit düzeyleri (MDA) ve Se miktarları Şekil 3' de gösterilmiştir.



Şekil 3. Ratların enjeksiyon dönemine bağlı olarak karaciğer dokusu vitamin (A, E, C), MDA ve Se miktarlarındaki değişim (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ kontrol ve deneysel grubun enjeksiyon dönemi)

Enjeksiyon dönemine bağlı olarak ratların böbrek dokusu örneklerinin A, E, C vitaminleri, Malondialdehit düzeyleri (MDA) ve Se miktarları Şekil 4' de gösterilmiştir.

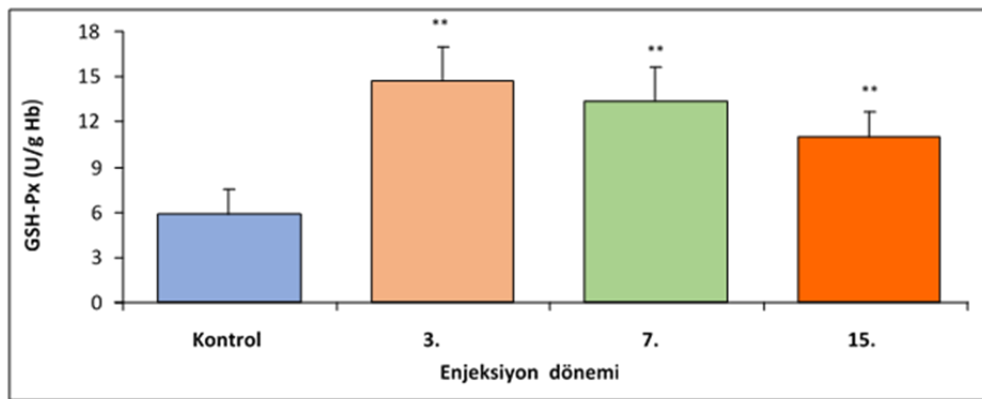


Şekil 4. Ratların enjeksiyon dönemine bağlı olarak böbrek dokusu vitamin (A, E, C), MDA ve Se miktarlarındaki değişim (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ kontrol ve deneysel grubun enjeksiyon dönemi)

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimi, organizmayı oksidatif hasarlardan koruyan bir selenoproteindir. Ayrıca bu enzimin ana biyokimyasal işlevi, glutatyonun oksitlenmesi yolu ile lipid veya lipid olmayan hidroperoksitleri ve H_2O_2 'in miktarlarını azaltmaktır [34]. Selenyum miktarı GSH-Px enzim aktivite miktarı ile doğrudan ilişkilidir. $1H,1'H-3,3'$ -biindazol enjekte edilen ratların GSH-Px enzim aktivite miktarları kontrol grubu miktarı ile karşılaştırıldığında; 3. enjeksiyonda enzim aktivite miktarının maksimum arttığı ($p<0.01$) tespit edilmiştir. Ancak enzim miktarındaki bu artışın 7. ve 15. enjeksiyonlarda düştüğü belirlenmiştir (Şekil 5). Serum Se seviyeleri enjeksiyon sürelerine bağlı olarak kontrol grubuna göre sürekli artarken, GSH-Px enzim miktarları da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında enzim aktivite miktarlarında artışların olduğu belirlenmiştir. Özellikle 3.

enjeksiyonda enzim aktivite miktarında ani bir artış saptanmıştır. 3. enjeksiyonun enzim aktivite miktarındaki ani artış sebebinin, 1H,1'H-3,3'-biindazol maddesi verilen ratlarda bu maddenin oksidatif strese karşı verdiği metabolik cevap olarak düşünülmüştür. Ayrıca 3. enjeksiyondan sonraki sürelerde enzim aktivite miktarlarının azalma sebebi metabolizmanın bu maddeye adaptasyonu ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda GSH-Px enzim miktarları incelenmiş ve enzim aktivite miktarlarının kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Ayrıca bu diyabetik ratlara C ve E vitamini verilerek böbrek dokularındaki GSH-Px enzim aktivite miktarı incelenmiştir. Vitamin verilen dokuların enzim aktivite miktarlarının azaldığı tespit edilmiştir [35]. Metabolizmaya alınan yabancı maddeler oksidatif strese yol açmış ve antioksidan sistemleri harekete geçirmiştir. Bulgularımızın literatürlerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Ratların enjeksiyon dönemine bağlı olarak eritrosit örneklerindeki Glutasyon Peroksidaz Enzimi (GSH-Px) düzeyleri Şekil 5' de gösterilmiştir.



Şekil 5. Ratların enjeksiyon dönemine bağlı olarak eritrosit örneklerindeki GSH-Px düzeylerindeki değişim (*, p< 0.05; **, p< 0.01 kontrol ve deneysel grubun enjeksiyon dönemi)

IV. SONUÇ

1H,1'H-3,3'-biindazol maddesinin metabolizmaya uygulanması sonucunda, serbest radikal üretimine bağlı olarak MDA ve GSH-Px enzim aktivite miktarlarında artışlara, A, E, C antioksidan vitamin miktarlarındaise düşüslere yol açtığı belirlenmiştir. Rat serum, karaciğer ve böbrek dokularında aynı sonuçların gözleendiği ve birbirini desteklediği tespit edilmiştir. İndazol bileşiklerinin enflamatuvar hastalıklar, kanser, ateroskleroz, diyabet, kalp ve böbrek hastalıkları, hipertansiyon gibi daha bir çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı yapılan literatür çalışmalarında bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile; pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan bu ilaç maddelerinin hayati önemlerinin olduğu ve bunların kullanımları esnasında antioksidan vitaminler ile Se desteğinin faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmanın Etik Kurul Belgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulunda alınmıştır. Ayrıca çalışma protokolü kurumsal etik kurul onayı (2016, sayı 65202830- 050. 04.04. 2011) ile birlikte çalışma öncesinde yazılı onayı alınan gönüllülerde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prosedürler "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Klavuzunda" belirtilen standartlara uygun olarak yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Schmidt, A., Beutler, B., & Snovydyovych, B. (2008). Recent advances in the chemistry of indazoles. *European Journal of Organic Chemistry*, 4073-4095.
- [2] Denya, I., Malan, S.F., & Joubert, J. (2018). Indazole derivatives and their therapeutic applications: a patent review (2013–2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28, 441–53.
- [3] Dong, J., Zhang, Q., Wang, Z., Huang, G., & Li, S. (2018). Recent advances in the development of indazole based anticancer agents. *Chem Med Chem*, 13, 1490–507.
- [4] Elguero, J., Fruchier, A., Tjiou, E.M., & Trofimenko, S. (1995). ¹³C NMR of indazoles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 31, 1006-1026.
- [5] Mosti, L., Menozzi, G., Fossa, P., Filippelli, W., Gessi, S., Rinaldi, B., & Falcone, G. (2000). Synthesis and preliminary biological evaluation of novel N-substituted 1-amino-3-[1- methyl (phenyl)-1H indazol 4-

- yl oxy]-propan-2-ols interesting as potential antiarrhythmic, local anesthetic and analgesic agents. *Arzneimittelforschung*, 50, 963-972.
- [6] Ali, N.A., Dar, B.A., Pradhan, V., & Farooqui, M. (2013). Chemistry and biology of indoles and indazoles: amini-review. *Mini- Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(12), 1792-800.
- [7] Wang, Y., Yan, M., Ma, R., & Ma, S. (2015). Synthesis and Antibacterial Activity of Novel 4 Bromo-1H Indazole Derivatives as FtsZ Inhibitors. *Arch. Pharm Chemistry in Life Sciences*, 348, 266-274.
- [8] Gopalakrishnan, M., Sureshkumar, P., Thanusu, J., & Kanagarajan, V. (2008). Synthesis, spectral analysis, antibacterial and antifungal activities of some 4,6-diaryl-4,5-dihydro-3-hydroxy-2[H]-indazole- a novel fused indazole derivative. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 974-979.
- [9] Lin, S., Zhang, F., Jiang, G., Qureshi, S. A., Yang, X., Chicchi, G. G., Tota, L., Bansal, A., Brady, E., Trujillo, M., Salituro, G., Miller, C., Tata, J. R., Zhang, B. B., & Parmee, E. R. (2015). A novel series of indazole-/indole based glucagon receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4143-4147.
- [10] Zhang, H. C., Derian, C. K., Andrade-Gordon, P., Hoekstra, W. J., McComsey, D. F., White, K. B., Poulter, B. L., Addo, M. F., Cheung, W. M., Damiano, B. P., Oksenberg, D., Reynolds, E. E., Pandey, A., Scarborough, R. M., & Maryanoff, B. E. (2001). Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (PAR-1) antagonists: Potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(7), 1021-1024.
- [11] Thomas, B., Saravanan, K. S., Kochupurackal, P., & Mohanakumar, K. P. (2008). In vitro and in vivo evidence that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitro indazole. *Neurochemistry International*, 52, 990-1001.
- [12] Shirinzadeh, H., Altanlar, N., Yucel, N., Ozden, S., & Suzen, S. (2011). Antimicrobial evaluation of indole containing hydrazone derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66, 340-344.
- [13] Yurttaş, L., Ertaş, M., Cankılıç, M. Y., & Demirayak, Ş. (2017). Synthesis and antimycobacterial activity evaluation of isatin-derived 3-[(4-aryl-2-thiazolyl)]hydrazone]-1H-indol-2, 3-diones. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55, 51-58.
- [14] Servi, S., & Akgün, Z. R., (2002). A Novel and efficient synthesis of 3-aryl and 3-hetero-aryl substituted-1H-indazoles and their mannich derivatives. *Synthetic Communication*, 32(22), 3399-3405.
- [15] 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 Biochemistry*, 38, 340-345.
- [16] Çetinkaya, N., & Özcan, H. (1991). Investigation of seasonal variations in cow serum Retinol and β -Carotene by high performance liquid chromatographic method comp. *Biochem. Physiol*, 100(4), 1003-1008.
- [17] Cerhata, D., Bauerova, A., & Ginter, B. (1994). Determination of ascorbic acid in serum using high-performance liquid chromatography and its correlation with spectrophotometric (colorimetric) determination. *Caska Slow Farm*, 43, 166-168.
- [18] Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 311, 76-79.
- [19] Breyer, P. H., & Gilbert, B. P. (1987). Determination of Selenium (IV) differential pulse voltametry of the 3,3'-Diaminobenzidine piarselenol. *Analytica Chimica Acta*, 201, 23-32.
- [20] Arain, M. A., Khuhawar, M. Y., & Bhangar, M. I. (1999). Liquid chromatographic determination of Selenium in vegetables and tea leaves as 2,1,3-Benzoselenadiazole. *J. Chem. Soc. Pak*, 21(2), 137-140.
- [21] Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169.
- [22] North, J., & Jackson, M. C. (2018). Indole-based therapeutics. U.S. Patent Application No. 15/669, 289.
- [23] Yaquan, C., Chunying, L., Pu, Y., Pan, L., & Chunli, W. (2021). Indazole scaffold: a generalist form marketed and clinical drugs. *Medicinal Chemistry Research*, 30, 501-518.
- [24] Ashok, D., Gundu, S., Aamate, V. K., & Devulapally, M. G. (2018). Conventional and microwave-assisted synthesis of new indole-tethered benzimidazole-based 1,2,3-triazoles and evaluation of their antimycobacterial, antioxidant and antimicrobial activities. *Molecular Diversity*, 22, 769-778.
- [25] Nyantakyi, S. A., Li, M., Gopal, P., Zimmerman, M., Dartois, V., Gengenbacher, M., Dick, T., & Go, M. L. (2018). Indolyl Azaspiroketal Mannich bases are potent anti-mycobacterial agents with selective membrane permeabilizing effects and in vivo activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 5733-5750.
- [26] Shirinzadeh, H., Altanlar, N., Yucel, N., Ozden, S., & Suzen, S. (2011). Antimicrobial evaluation of indole containing hydrazone derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66, 340-344.

- [27] Yurttaş, L., Ertaş, M., Cankılıç, M. Y., & Demiryak, Ş. (2017). Synthesis and antimycobacterial activity evaluation of isatin-derived 3-[(4-aryl-2-thiazolyl)hydrazono]-1H-indol-2, 3-diones. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55, 51–58.
- [28] Servi, S., & Akgun, Z.R. (2002). A novel and efficient synthesis of 3-aryl and 3-heteroaryl substituted 1H-indazoles and their Mannich derivatives. *Synthetic Communications*, 32(22), 3399–3405.
- [29] Liu, Z.W., Zhang, T., & Yang, Z. (2007). Involvement of nitric oxide in spatial memory deficits in status epilepticus rats. *Neurochemical Research*, 32, 1875-1883.
- [30] Pawlak, W., Kedziora, J., Zolynski, K., Kedziora-Kornatowska, K., Blaszczyk, J., Witkowski, P., & Zieleniewski, J. (1998). Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defense and lipid peroxidation in erythrocytes. *Journal of Gravitational Physiology*, 5, 163- 164.
- [31] Karatas, F., Kara, H., Servi, S., Kıran, T.R., & Saydam, S. (2008). Investigation of oxidative status of the 2-furan-2-yl-1H-benzimidazole in rats. *Biological Trace Element Research*, 126, 214- 221.
- [32] Karatas, F., Coteli, E., Aydın, S., Servi, S., & Kara, H. (2010). Effect of 3-(1H-Pyrrol-2-yl)-1H-indazole on the antioxidant status of rats. *Biological Trace Element Research*, 136, 79–86.
- [33] Halliwell, B. (1994). Free radical antioxidants in human disease. Curiosity cause or consequence. *The Lancet*, 344, 721-724.
- [34] Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G., & Akcay, F. (2005). Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer letters*, 227(2), 133-139.
- [35] Bostancı, H. E. (2014). Deneysel olarak Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda vitaminlerin oksidasyona etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Denizli.