

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

**SİYAH ve YEŞİL ÇAY İLE ATIKLARININ
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Adem DEMİR

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

RİZE, 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

SİYAH ve YEŞİL ÇAY İLE ATIKLARININ ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Adem DEMİR

Yüksek Lisans

Tezin Estitüye Verildiği Tarih : 13.06.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 06.07.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan EFE

Jüri Üyesi: : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Fatih YILMAZ



RİZE, 2011

ÖNSÖZ

‘Siyah ve Yeşil Çay İle Atıklarının Antioksidan Özelliklerinin Karşılaştırılması’ adlı bu çalışma Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmalarım boyunca bana her türlü desteği sağlayan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU’ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteğini her zaman yanımda hissettiğim çok sevgili çalışma arkadaşım Kimyager Mehtap ATAK’a, tez yazımında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER’e ve Arş. Gör. Emine ÜLKER’e, çalışmalarımda yardımcı olan Arş. Gör. Talat BARAN’a, Arş. Gör. Kaan KARAOĞLU’na, Arş. Gör. Arife Pınar EKİNCİ’ye ve Arş. Gör. Mehmet KAYA’ya teşekkür ederim.

Ayrıca gerek maddi gerekse manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Adem DEMİR
Haziran, 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	4
1.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	5
1.2.1.1. Singlet Oksijen	6
1.2.1.2. Süperoksit Radikali	6
1.2.1.3. Hidrojen Peroksit.....	7
1.2.1.4. Hidroksil Radikali	7
1.2.1.5. Perhidroksil Radikali	8
1.2.2. Nitrik Oksit Radikali	8
1.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	9
1.3. Lipit Oksidasyonu Hakkında Genel Bilgi	11
1.3.1. Lipit Oksidasyonunun Kimyasal Süreci.....	11
1.3.2. Lipit Oksidasyonunun Patolojik Etkileri.....	13
1.4. Protein Oksidasyonu Hakkında Genel Bilgi	14
1.4.1. Protein Oksidasyonun Temel Mekanizmaları	15
1.4.2. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu	15
1.5. Antioksidan Sistemler	17
1.5.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar	19
1.5.1.1. Endojen Kaynaklı Enzimatik Antioksidanlar.....	19
1.5.1.2. Endojen Kaynaklı Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	21
1.5.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	23
1.5.3. Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler	25

1.6.	Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	33
1.6.1.	MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi.....	33
1.6.2.	Eritrosit Membranında Protein Karbonil Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi.....	34
1.6.3.	Eritositlerde Toplam Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi Yöntemi.....	34
1.6.4.	Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi Yöntemi.....	34
1.6.5.	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi.....	34
1.6.6.	Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi.....	35
1.6.7.	DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi	35
1.6.8.	Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	36
1.7.	Çay Bitkisinin Özellikleri.....	36
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	40
2.1.	Kullanılan Cihazlar.....	40
2.2.	Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	41
2.3.	Numunelerin Toplanması ve Özütlemlerin Hazırlanması.....	43
2.3.1.	Çay Numunelerinin Eldesi	43
2.3.2.	Çay Özütlemlerinin Hazırlanması	44
2.4.	Özütlemlerde Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi	44
2.5.	Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	45
2.5.1.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi.....	45
2.5.2.	Eritrositlerde Anti-Lipit Oksidasyon Aktivitesinin Analizi.....	46
2.5.2.1.	Eritrosit Paketinin Hazırlanması	46
2.5.2.2.	Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması	46
2.5.2.3.	Eritrosit MDA Miktar Tayini	47
2.5.3.	IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması.....	47
2.5.4.	Fraksiyonlaştırılmamış Plazmanın (UFP) Cu ⁺² Aracılı Oksidasyonunun İncelenmesi.....	48
2.5.5.	Eritrosit Hücre Zarında Anti-Protein Oksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi	49
2.5.5.1.	Eritrosit Hücre Zarı Eldesi	49
2.5.5.2.	Eritrosit Hücre Zarı Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	50
2.5.5.3.	Eritrosit Hücre Zarı Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesi	51
2.5.6.	Eritrosit Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	51
2.6.	İstatistiksel Analiz	52
3.	BULGULAR	53

3.1.	Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri ...	53
3.2.	Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi	54
3.3.	Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının Anti-Lipit Oksidasyon Aktivitesi	56
3.4.	Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının Özütlerinin Anti-Protein Oksidasyon Aktivitesi	58
3.5.	Eritrosit Toplam Glutasyon Düzeyleri.....	59
3.6.	Yeşil ve Siyah Çay İle Atıklarına Ait Özütlerin Cu^{+2} Aracılı UFP Oksidasyon Kinetiği Üzerine Etkileri	61
4.	TARTIŞMA.....	64
5.	SONUÇLAR	70
6.	ÖNERİLER	71
	KAYNAKLAR.....	72
	ÖZGEÇMİŞ.....	79

ÖZET

Son zamanların önemli çalışma alanlarından biri de kanser, ateroskleroz, katarakt, Parkinson hastalığı gibi birçok hastalığın oluşmasına ve yaşlanmaya neden olan serbest radikallerin temizlenmesinde rol oynayan antioksidanlar üzerine olmuştur. Siyah ve yeşil çayın antioksidan özelliğe sahip olduğunu gösteren birçok çalışma olmasına rağmen, bunların atıklarıyla ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, siyah ve yeşil çay ile bunların farklı atıklarından elde edilen özütlerin fenolik içeriğini belirlemek ve onların antioksidan kapasitelerini eritrosit, eritrosit hücre zarı ve fraksiyonlaştırılmamış plazma üzerinde karşılaştırmaktır. Çalışmada kullanılan numuneler Rize’de bulunan çay fabrikalarından sağlanmıştır. Çay ve atık ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi ile kateşin standartına eşdeğer olarak belirlendi. DPPH radikal temizleme aktivitesi Cuendet metodu ile eşdeğer kateşin standartıyla karşılaştırılmalı olarak tayin edildi. Ekstraktların anti-lipit oksidasyon aktivitesi Stocks metodu ile anti-protein oksidasyon kapasitesi modifiye Levine metoduna göre eşdeğer kateşin standartıyla karşılaştırılmalı olarak tayin edildi. Özütlerin hücre içi glutatyon seviyesine etkisi Sedlak metoduna göre tespit edildi. Fraksiyonlaştırılmamış plazmada ise konjugedien oluşumunu gösteren parametreler Spranger protokolüne göre saptandı. Özütlerin fenolik bileşimi en yüksek yeşil çayda gözlemlendi. Buna bağlı olarak en yüksek radikal temizleme etkisi, anti-lipit oksidasyon kapasitesi, anti-protein oksidasyon aktivitesi, hücre içi glutatyon düzeyi ve en uzun t-lag süresi yeşil çayda izlendi. Sonuç olarak yeşil ve siyah çay ile onların atıklarının antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve yeşil çay ile onun yaprak atığının siyah çaydan daha yüksek antioksidan gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Yeşil Çay, Siyah Çay, Çay Atıkları, TBARS, DPPH, Protein Karbonil, İndirgenmiş Glutatyon, Plazma Konjuge Dien

SUMMARY

Comparison of Antioxidant Properties of Black, Green Tea and Their Wastes

One of the important research fields of the recent years has been focused on the antioxidants, which have a role in scavenging the free radicals that cause many disease such as cancer, atherosclerosis, cataract, Parkinson's disease and aging. Although there are many researches show that black and green tea have antioxidant property, there is no enough study showing the effect of their wastes on cellulare systems. The aim of this study is to determine phenolic contents and compare antioxidant capacity of black, green tea and their different wastes' extracts on erythrocyte, erythrocyte membrane and unfraction plasma. Samples used in the present study was provided tea factory in Rize. Total phenolic contents of all extracts of tea samples were evaluated with Folin- Ciocalteau reagent as catechin equivalent, the standard antioxidant. DPPH radical scavenging activities of the extracts were measured by the Cuendet method comparing with catechin equivalent. Anti-lipid oxidation activities of the extracts were determined with the Stocks method. Anti-protein oxidation capacities of the extracts were estimated by modified Levine method by comparing with catechin equivalent. Effects of samples on intracellular glutathione level were investigated with Sedlak method. Parametres of the conjugated-dien in plasma were analyzed by the method of Spranger. It was clearly observed that the phenolic content was the most abundant in the green tea extract. Accordingly, the highest radical scavenging activity, anti-lipid oxidation capacity, anti-protein oxidation activity, intracellular glutathione level and the longest t-lag time were determineted in the green tea extract. Consequently, green, black tea and their waste materials have different antioxidant properties and it was shown that antioxidant capacity of green tea and its leaf waste were higher than those of black tea.

Keywords: Green tea, Black Tea, Tea Wastes, TBARS, DPPH, Protein Carbonyl, Reduced Glutathione, Plasma Conjuge Dien.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu	6
Şekil 2. Serbest radikallerin hücrel hedefleri	10
Şekil 3. Lipit oksidasyon zincir reaksiyonları	11
Şekil 4. Lipit oksidasyonunun kimyasal yolu.....	13
Şekil 5. Protein oksidasyonu sonucu çapraz bağların oluşumu.....	16
Şekil 6. Glutasyonun yapısı	22
Şekil 7. Melatoninin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 8. Ürik asidin kimyasal yapısı	23
Şekil 9. A vitamininin molekül yapısı	24
Şekil 10. C vitamininin molekül yapısı	24
Şekil 11. E vitamininin molekül yapısı.....	25
Şekil 12. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b).....	26
Şekil 13. Flavonoidlerin kimyasal yapısı	27
Şekil 14. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları	29
Şekil 15. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	35
Şekil 16. DPPH radikalinin molekül yapısı.....	36
Şekil 17. Çay bitkisinin resimleri	38
Şekil 18. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği	45
Şekil 19. MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon	47
Şekil 20. Cu ⁺² aracılı plazma oksidasyon kinetiği.....	49
Şekil 21. Protein tayininde kullanılan BSA standart gafiği.....	50
Şekil 22. Glutasyon standart grafiği.....	52
Şekil 23. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde.....	54
Şekil 24. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri	55
Şekil 25. Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik.....	56
Şekil 26. Numunelerin anti-lipit oksidasyon aktivitelerinin IC ₅₀ değeriyle gösterimi.	57
Şekil 27. Numunelerin anti-lipit oksidasyon kinetiğini gösteren grafik.....	57
Şekil 28. Numunelerin protein oksidasyon temizleme aktiviteleri	59
Şekil 29. Numunelerin anti- protein oksidasyon kinetiğini gösteren grafik.....	59

- Şekil 30. Standart ve farklı çay özütlerinin eritrosit glutatyon düzeyleri 60
- Şekil 31. Standart, kontrol ve özütlerin bulunduğu plazmalara ait ortalama t-lag değerleri 61
- Şekil 32. Kontrol, standart ve farklı çay numunelerinden elde edilen özütlerin bulunduğu Cu^{+2} aracılı fraksiyonlaştırılmamış plazmalara ait konjugedien oluşum grafiği.. 62

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türleri.....	5
Tablo 2. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri	10
Tablo 3. Biyolojik dokularda bulunan oksidatif protein değişim formları	14
Tablo 4. Oksidasyona yakın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri	17
Tablo 5. Ekzojen ve Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması.....	19
Tablo 6. Çay yaprağının bileşimi	37
Tablo 7. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu.....	38
Tablo 8. Denemelerde kullanılan cihazlar.....	40
Tablo 9. Çözeltiler ve hazırlanışları	41
Tablo 10. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	43
Tablo 11. Numune Kodları.....	44
Tablo 12. Polifenol tayini için pipetleme miktarları	45
Tablo 13. Protein tayini için pipetleme miktarları	50
Tablo 14. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları.....	53
Tablo 15. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri	54
Tablo 16. H ₂ O ₂ aracılı oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerde anti-lipit oksidasyon aktivitesi	56
Tablo 17. Numunelerin protein oksidasyon inhibisyonunu sağlayan IC ₅₀ değerleri	58
Tablo 18. Çay örneklerinin Eritrosit Glutasyon Düzeylerine Olan Etkisi.....	60
Tablo 19. Cu ⁺² Aracılı UFP Okidasyon Kinetiği Üzerine Çay Özütlerinin Etkisi.....	61
Tablo 20. Çalışmada ölçülen tüm parametreler ve sonuçlar	63

KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BSA	Bovine (Sığır) Serum Albumin
CAT	Katalaz
ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asidi
CUPRAC	Bakır(II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi
DKH	Dien Konsantrasyon Hızı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşingallat
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşingallat
FAD	Flavinadenindinükleotit
FP	Bkz. UFP
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
GST	Glutatyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi
HOCl	Hipokloröz asit
HO ₂ [·]	Perhidroksil radikali
IC ₅₀	% 50 İnhibisyon konsantrasyonu
KD	Konjuge Dien
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MDK	Maksimum Dien Konsantrasyonu
MDA	Malondialdehit
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaN ₃	Sodyum azit
NO [·]	Nitrik Oksit
NO ₂	Azot Dioksit

$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit Radikali
OH^{\cdot}	Hidroksil Radikali
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PCP	Pentaklorofenol
PK	Protein Karbonil
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TBA	2-Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloro asetik asit
TEAC	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
UFP	Fraksiyonlaştırılmamış Plazma

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Serbest radikaller ve antioksidan sistemler son yıllarda en çok üzerinde durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı konular arasında yer almaktadır. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması, bugün bilinmeyen pek çok klinik durumların patogeneze açıklık getireceği düşünülmektedir [1].

Sürekli gelişmekte olan teknoloji, oluşan çevre kirliliği, sigara, ilaçlar, güneşin UV ışınları ve pek çok diğer etken sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır. Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla gösterir. Tüm bu nedenlerden dolayı dış etkilerle oluşan hastalıklar artmakta, genetik hastalıkların da çevresel etkilerle daha çok belirginleşmesine neden olmaktadır. Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle bu hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir [2].

In vivo olarak hücrede normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller olduğu kadar, organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara ve doğal durumda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler [3]. Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidirler. Ancak, her bir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrel hedefler risk altındadır [4].

Organizmada serbest radikal oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı arasında oksidatif denge sağlandığı sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulur ve serbest radikallere bağlı oksidatif stres ortaya çıkar [5].

Oksijen radikalleri endojen (mitokondriyal elektron transport zinciri, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, vs.) olarak üretileceği gibi, dışarıdan ekzojen alınan ilaçlar ve ksenobiyotikler gibi maddeler tarafından da oluşabilirler [6]. Modern gıdalar, yüksek şeker, yağ miktarı yüksek gıdalar, alkol ve hatta yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber vücudumuzdaki serbest radikallerin miktarının artmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller; membran yapılarında bulunan fosfolipitlerin

doymamış yağ asitlerini oksidasyona uğratarak membran bütünlüğünün bozulmasına ve membran akışkanlığında değişime, proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonuna, çapraz bağlarla agregasyonlarına veya parçalanmaları suretiyle aktivite kaybına, karbohidrat polimerlerinin yıkılmasına, polisakkaritlerin fonksiyonlarının bozulmasına sebep olurlar [7]. Eklemler arası kayganlaştırıcı (lubrikant) özelliği olan hyaluronik asidin vizkositesinin kaybolması buna bir örnektir. Ayrıca oksidatif yarılma ile DNA hasarına yol açabilirler ve karsinogoneze sebep olabilirler ile reaksiyona girerek istenmeyen mutasyonlar oluşturabilirler [8]. Hiroşima ve Nagazaki' ye atılan bombaların büyük biyolojik etkileri bu mekanizmayla açıklanmaktadır. Serbest radikaller; birçok hastalıkla ilişkili olması ve bu hastalıklara eşlik eden çeşitli komplikasyonların ortaya çıkışında merkezi rol oynaması dolayısıyla son yıllarda araştırmacıların ilgi alanı haline gelmiştir. Özellikle vücutta oluşan oksijen radikallerinin kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, serebrovasküler rahatsızlıklar, nörosensoryel bozukluklar, katarakt ve romatoid artrit gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir [9]. Yaşlanma sürecinde gözlenen cilt kırışıklıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve bağışıklık sisteminde bozulma gibi belirtilerde serbest radikaller esas faktör olarak düşünülmektedir [10].

Vücut kaynaklı veya çevresel faktörler sonucu meydana gelen serbest radikalleri etkisiz hale getirmede süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve peroksidaz gibi enzimler, glutatyon ve vitaminler gibi hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları engelleyen veya etkilerini azaltan endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidan maddeler mevcuttur [11]. Son yıllarda besin kimyasının ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmıştır. Bunun sebebi sentetik antioksidanların kanserojenik etki gösterdiğinin düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamakla beraber canlı organizmalardaki savunma sisteminde olduğu kadar gıda sanayisinde de önemli derecede yararlıdırlar [12]. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup daha çok polifenoller ve flavonoidler halinde bulunurlar [13].

Polifenoller veya flavonoidler özellikle çayda, meyve, sebze, fındık ve ceviz gibi sert kabuklu yemişlerde, tohumlarda, bitkilerin sap kısmında ve çiçeklerinde, şarapda ve balda yaygın şekilde bulunmaktadır [14]. Çay yapraklarının bileşimi klimatolojik, üretimi ve genetik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yeşil çayın flavonoid içeriği yaklaşık 160-1500 mg/g kuru ağırlık, siyah çayın ise 120-1300 mg/g kuru ağırlık aralığındadır ve bu

değer elma, şeftali, üzüm, portakal, greyfurt gibi antioksidan kapasitesi yüksek olan meyvelerden daha fazla olduğu söylenmektedir [15]. Çayın flavonoid muhtevası ve antioksidan kapasitesinin incelenmesiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Zeyuan ve arkadaşları yeşil ve siyah çayın eritrositler üzerinde antioksidan etkisini karşılaştırmış ve siyah çayın daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir [16]. Langley-Evans, diyetle alınan antioksidanların % 35-45'inin çay flavonoidlerinden kaynaklandığını, demleme sırasında sıcaklık arttıkça deme geçen antioksidan miktarının arttığını belirtmişlerdir [17]. Yen ve arkadaşları, günde ortalama 23 mg flavonoid alındığını bunun % 48'inin çaydan sağlandığını belirtmişlerdir [18]. Vinson ve Dabbagh, A.B.D'de günlük çay tüketiminin kişi başına 1 g/gün olduğunu böylece çayla 200-300 mg/gün flavonoid alındığını, bu miktarın günlük tavsiye edilen C ve E vitaminleriyle β -karotenin toplamından (70 mg/gün) daha yüksek olduğunu bildirerek antioksidan kaynağı olarak çayın önemini vurgulamışlardır [19]. Yang ve Landau, 2000 çay fenoliklerinin farelerde deri ve akciğer tümörü oluşumunda, hücre çoğalmasını önlemekte, saf kateşinlerin hücre oluşumu ve büyümesini inhibe ettiğini gözlemişlerdir [20]. Vinson ve Dabbagh, ile Langley ve Evans'ın yaptıkları çalışmaya göre yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan çayın, düşük yoğunluklu kolesterolün (LDL) oksidasyonunu geciktirdiği ve çay tüketimiyle plazmadaki antioksidan potansiyelin önemli derecede arttığını göstermiştir [21].

Bilindiği üzere kuru çay imalatı sırasında bir miktar da çay atığı ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde yetiştirilen yaş çayın genetik yapısından kaynaklanan nedenlerden dolayı selüloz oranı yüksek olduğu için imalat sonrası ortaya çıkan atık miktarı da artmaktadır. Yaş çay fabrikalarının ortaya çıkan bu atıkları çevreye zarar vermeden imha etme konusunda zaman zaman sıkıntı yaşadıkları bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda bu atıklar genel olarak buhar kazanlarında yakılarak veya fabrika sahalarında çürütülerek üreticilere dağıtılmak suretiyle imha edildiği belirlenmiştir. Bu şekilde atıklar ekonomik olarak hiçbir şekilde değerlendirilmeden imha edilmiş olmaktadır.

Çay atıklarının değerlendirilerek ekonomiye kazandırılması amacıyla ülkemizde ve yurt dışında birçok bilimsel araştırma yapılmaktadır. Son zamanlarda çay atık özütlerinin banyo suyu ile kullanımının cilt sağlığı ile ilişkisini açıklayan çalışmalar olduğu gibi onların hücresel ortamda etkinliklerini ortaya koyan araştırmalar da giderek artmaktadır. Ayrıca Hindistan'da fabrika çay atıklarının ve kafeini alınmış çay atıklarının hem küçükbaş hem de büyük baş hayvan çiftliklerinde yem olarak kullanılmakta ancak bu

konuda çok fazla veri mevcut değildir. Yapılan literatür taramalarında çay atıklarının bu ve bunun gibi birçok amaçla kullanılabilmesine dair bilgiler mevcuttur.

Bu çalışmada, Rize’de yetişen ve Taşlıdere Çay Fabrikasından alınan yeşil çay ve Zihni Derin Çay Fabrikasından alınan siyah çay ve bunların farklı kısımlarının üretim aşamasında ortaya çıkan ve hiçbir katma değer oluşturmadan imha edilen çay atıklarının lipid, protein oksidasyonuna etkisi ve hücre içi indirgeme potansiyeline olan antioksidan etkileri araştırılmıştır.

1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, bir ya da daha fazla esleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olup bu yapısal özellikleri nedeni ile eşlenmemiş elektronlarını diğer bir moleküle verebilen veya kendi elektronlarını eşlemek üzere başka bir molekülden elektron alan reaktif bileşiklerdir [22, 23, 24, 25]. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. NO (nitrik oksit), Nitrik dioksit (NO_2) gibi bileşiklerde dış orbitalde tek elektron bulunduğundan bu bileşikler de radikal yapısındadırlar [26].

Vücudumuzda dengede olan oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki düzenlemenin oksidan sistem lehine bozulmasına “oksidatif stres” denilmektedir.

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler; parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara, solventler gibi çevresel faktörler, nitofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyusturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler iken endojen kaynaklar ise; fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler mitokondrial elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları gibi hücresel olaylardır [27, 28, 29].

Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısına ancak iki elektron girebilir. Ayrıca bu iki elektronun ters spinli olması gerekir. Yani elektronlardan biri saat yönünde dönerken diğeri

tersi yönde döner. Bu şekilde bir araya gelmiş elektron çiftleri oldukça kararludur ve insan vücudunda neredeyse tüm elektronlar elektron çifti halinde bulunur [30].

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen kaynaklı olanlardır. Bu radikaller, oksijenin suya indirgenmesi sırasında tek elektron aktarması sonucunda oluşan; oksijenin kendisi (singlet oksijen), süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir [31]. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), peroksinitrit (ONOO^-), lipidlerin peroksidasyonu sırasında oluşan peroksi ($\text{ROO}\cdot$), ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl_4) metabolizması sırasında oluşan triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) radikalidir [32, 33].

Tablo 1. Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türleri

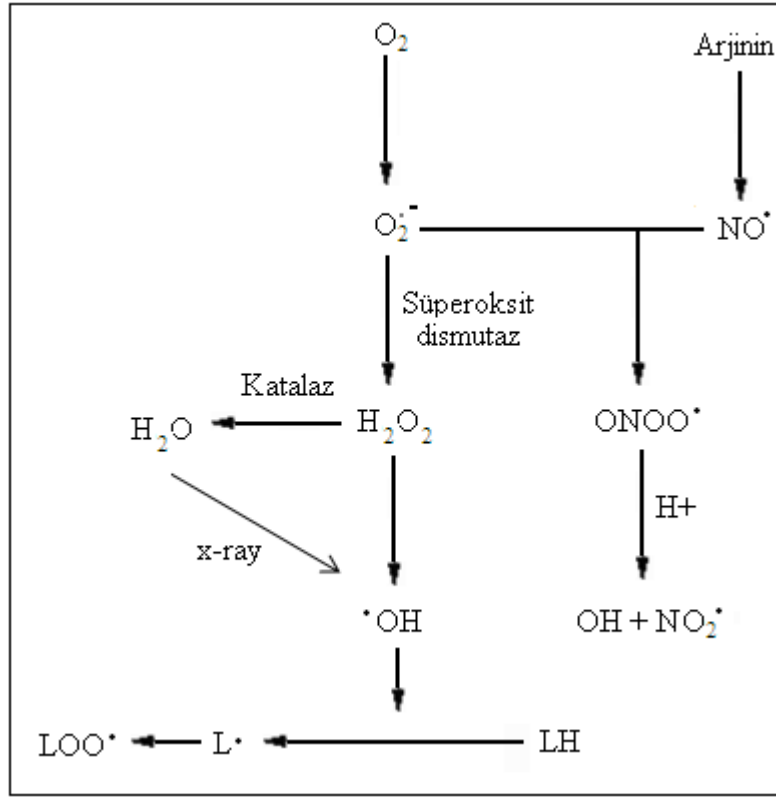
TÜR	ADI	TÜR	ADI
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen	$\text{NO}\cdot$	Nitrik oksit
$\text{O}_2\cdot$	Süperoksit	$\text{NO}_2\cdot$	Nitrojen dioksit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit	NO_2^+	Nitril katyonu
OH^-	Hidroksil radikali	NO^-	Nitroksil
$\text{ROO}\cdot$	Peroksi radikali	NO^+	Nitrozil
ROOH	Hidroperoksit	ONOO^-	Peroksinitrit
$\text{RO}\cdot$	Alkoksil radikali	$\text{ONOO}\cdot$	Peroksinitrit radikali
$\text{ROOR}\cdot$	Endoperoksit	N_2O_3	Dinitrojen trioksit
$\text{HO}_2\cdot$	Hidroperoksi radikali	N_2O_4	Dinitrojen tetraoksit

1.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri hidroksil radikali, peroksi radikali, singlet oksijen radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir [34].

Moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati bir öneme sahiptir. Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur ancak aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikallerine dönüşür. Ayrıca enzim reaksiyonları da ROT oluşumuna neden olmaktadır [35]. Örneğin nitrojen

fiksasyonunu katalizleyen nitrojenaz enzimleri ve CO₂ fiksasyonunu katalizleyen ribüloz bifosfat karboksilaz oksijen tarafından kompetitif olarak inhibe edilir [36].



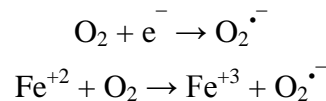
Şekil 1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu

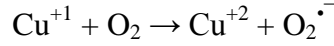
1.2.1.1. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (¹O₂), moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Oksijenin enerjistik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. İhtiva ettiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir veya kovalent tepkimelere girer. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10⁻⁶ ile 10⁻⁵ saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir [35].

1.2.1.2. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali (O₂^{•-}) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit radikali meydana getirebilir.





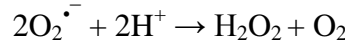
Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır [5].

1.2.1.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir [37].

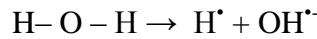


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur.

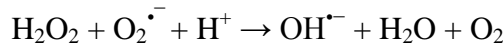


1.2.1.4. Hidroksil Radikali

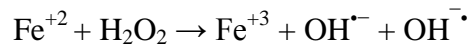
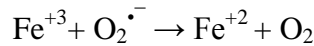
Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir [38].



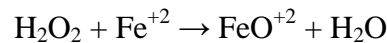
Ayrıca hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona “Haber-Weiss” reaksiyonu adı verilir [39].



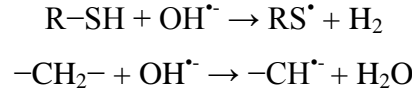
Bunun yanında $\text{O}_2^{\bullet -}$ doğrudan Fe^{+3} ile reaksiyona girer ve oluşan Fe^{+2} ile H_2O_2 etkileşerek OH^{\bullet} molekülü oluşur. Bu reaksiyona da Fenton Reaksiyonu adı verilir [40].



Bazen de H_2O_2 ile Fe^{+2} nin etkileşimi OH^{\bullet} in oluşumu ile sonuçlanmayıp FeO^{+2} (ferro demir) molekülüne dönüşüm ile sonuçlanabilmektedir. Buna Alternatif Reaksiyon adı verilir.

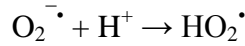


Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşumuna sebep olur.



1.2.1.5. Perhidroksil Radikali

Perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot-}$), süperoksit radikalının protonlanmasıyla meydana gelir [41].



Biyolojik sistemlerde HO_2^{\cdot} radikali $O_2^{\cdot-}$ den daha az polardır. Biyolojik zarlardan kolayca geçebilir ve yağ asitlerine doğrudan etki edebilir ve lipit peroksidlerini oluşturur [42].

1.2.2. Nitrik Oksit Radikali

Nitrik Oksit(NO), hücrenin patofizyolojisinde önemli rol oynayan gaz halinde ve çözünabilir bir serbest radikaldir. İleri derecede lipofilik olmasından dolayı lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Endotel türevi gevşetici faktörle eşdeğerdir ve damar düz kas hücrelerinin gevşemesi için temel sinyal oluşturur. Nitrik Oksit Sintetaz enzimiyle oksijen varlığında L-arjininden meydana gelir [43].



Nitrik oksit (NO), aynı zamanda bir nörotransmitter olarak görev yapar. Sinir veya endotel hücrelerinde yapısal nitrik oksit sentetazların kısa süreli aktivasyonundan önce salınan az miktarda NO'nun sırasıyla nörotransmisyon ve damar tonusunun düzenlenmesi gibi eylemlere iştirak ettiği düşünülmektedir. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol oynamaktadır: kan akımının regülasyonu, nörotransmisyon, inflamasyon ve immün savunma mekanizması, koagülasyon ve muhtemelen hücre büyümesi. NO aynı zamanda bağışıklık, sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemin de bir mesajcısıdır.

Ancak aşırı ve kontrolsüz nitrik oksit sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Nitrik oksitin, üzerinde yük taşınamaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir engelle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesi demektir ve bu da hücrelere

önemli ölçüde harabiyet verir. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü olma özelliği taşır [44].

1.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek oksidasyon ürünleri oluştururlar. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit oksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit oksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipit oksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına neden olur [45].

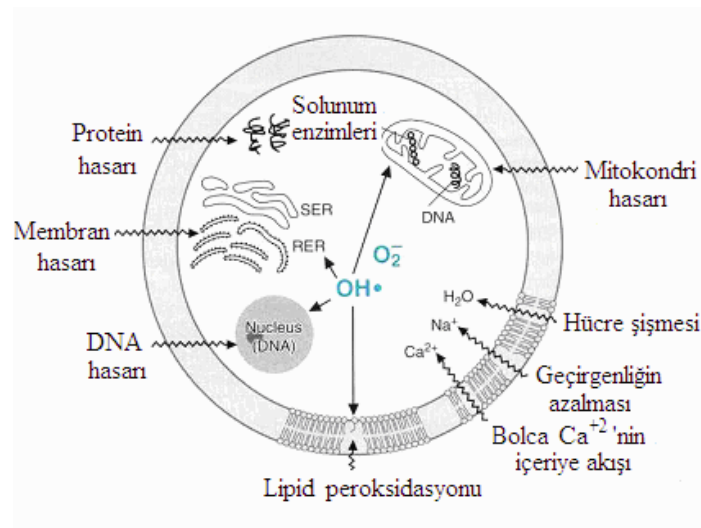
Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedefdir (Tablo 2).

Proteinler serbest radikal etkisine karşı doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinler üzerinde olan serbest radikal hasarı birikmişse ya da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar.

Tablo 2. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri

HEDEF	SONUÇ
Küçük Moleküller	
Doymamış ve tiyol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu
Nükleik asitler	Hücre siklus değişimi
Kofaktörler	Nikotinamit ve flavin içeren kofaktörlerde ve aktivitelerinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitlerde ve aktivitelerinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve beta karoten miktarında azalma
Büyük Moleküller	
Lipitler	Hücre membran yapısındaki değişiklikler
Proteinler	Peptit zincirinde kopma, denatürasyon
DNA	Zincir kopması, mutasyonlar
Hyaluronik asit	Sinoviyal sıvı vizkozitesinde değişiklik

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar [46].



Şekil 2. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

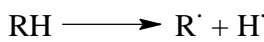
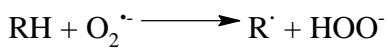
Serbest radikallerin hücredeki bu etkileri sonucu pek çok hastalığın oluşabildiği düşünülmektedir. Vücudumuz serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir sisteme sahiptir. Bu sistem, ‘antioksidan savunma sistemi’ olarak bilinir.

1.3. Lipit Oksidasyonu Hakkında Genel Bilgi

Lipit oksidasyonu, zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır [47].

Lipit oksidasyonu kimyasal bir proses olup serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar [48]. Lipit oksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri oksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonların hücre membranına hasarı geri dönüşümsüzdür. Zincir reaksiyonlarının tamamı Şekil 3’te özetlenmiştir [49].

a) Başlama



RH: Çoklu Doymamış Yağ Asidi

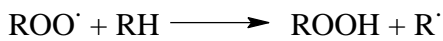
R \cdot : Serbest Radikal

ROO \cdot : Peroksil Radikali

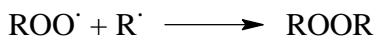
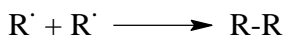
ROOH : Hidroperoksit

HOO \cdot : Hidroperoksil Radikali

b) Yayılma



c) Sonlanma



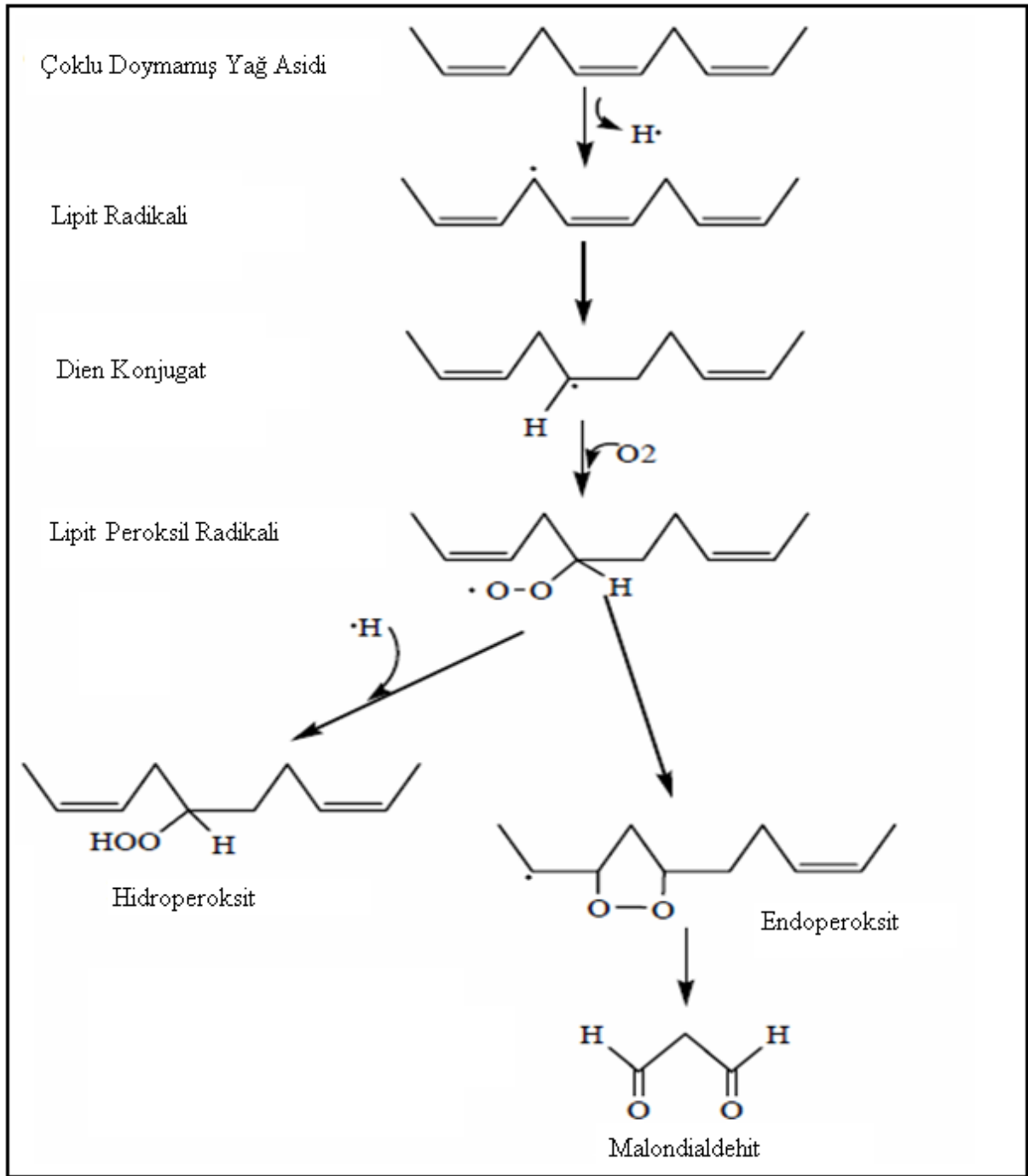
Şekil 3. Lipit oksidasyon zincir reaksiyonları

1.3.1. Lipit Oksidasyonunun Kimyasal Süreci

Çoklu doymamış yağ asitleri oksidasyona kolaylıkla maruz kalabilen yapılardır. Lipit oksidasyonu tepkimeleri serbest radikallerin çok doymamış yağ asidi zincirinin α -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle karbon atomu üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asidi zincirinin radikal olmasına neden olur. Oluşan lipit radikali kararsız bir bileşiktir. Molekül stabil duruma gelebilmek için molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjugedien

yapısına dönüşür. Reaksiyon moleküler oksijenin lipit radikali ile etkileşmesi ve lipit peroksil radikalının oluşmasıyla devam eder. Lipit peroksil radikali, membran yapısında bulunan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksite dönüşmüş olur. Böylece tek bir substrat radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden çok lipit hidroperoksit oluşmasına sebebiyet verir. Bu tetikleme olayının ne zaman sona ereceği ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlıdır. Hidroperoksitler oldukça stabil moleküller olup yapıları ancak yüksek sıcaklıkla veya demir, bakır gibi geçiş metallerine maruz kalmakla bozulabilir [50].

Lipit oksidasyonu, lipit hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile son bulur. Oluşan son ürünlerden birisi de kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilen ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılan MDA molekülüdür [51].



Şekil 4. Lipit oksidasyonunun kimyasal yolu

1.3.2. Lipit Oksidasyonunun Patolojik Etkileri

Lipit oksidasyonu tepkimeleri sonucunda başta aldehitler olmak üzere çok sayıda ürün oluşmaktadır. Oluşan bu aldehitler oksidatif hasarı artırmaktadırlar. Lipit oksidasyonunun başlıca ürünü olan MDA uzun ömrü ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açmaktadır. Bunun yanında membran akıcılığının

azalmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca^{+2} iyonlarının zar geçişlerinin artmasına neden olmaktadır [52].

Dokularda MDA seviyesinin artması koroner arter hastalığına akciğer kanseri ile diğer akciğer hastalıklarına, DNA'ya bağlanarak mutasyonlara ve iltihaplanmalara yol açtığı bildirilmektedir [53].

1.4. Protein Oksidasyonu Hakkında Genel Bilgi

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir [54]. Protein oksidasyonun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, protein agregasyonu, reseptör aracılığı ile endositozun bozulması, immunojen aktivitedeki artış, gen transkripsiyonundaki değişimler olarak sıralanır [55]. Reaktif türevler tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, birçok bozukluk ve hastalıkların ciddi bir şekilde ilerlemesine yol açar (Tablo 3). Bu hastalıklar katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, iskemi ve reperfüzyon hasarı, Parkinson, Alzheimer, romatoid artrit, sepsis, amiyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklardır [56].

Tablo 3. Biyolojik dokularda bulunan oksidatif protein değişim formları

DEĞİŞİM	HASTALIK
Karboniller	
Glutamin Sentaz	Yaşlanma, Alzheimer, iskemi-reperfüzyon
Ig G	Romatoid artrit
Akciğer Proteinleri	Hiperoksia
Beyin Proteinleri	İskemi-reperfüzyon
Göz- lens Proteinleri	Katarakt
Tanımlanmamış Proteinler	Yaşlanma, Parkinson hastalığı
Metionin sülfoksit	
α -1-proteinaz inhibitörü	Bronşit akciğer sıvıları, sinoviyal sıvılar
Lipit oksidasyon kalıntıları	
LDL	Aterosklerozis
Glutasyon (SH oksidasyonu)	
Karbonik anhidraz III	Yaşlanma
Kas proteinleri	Kas bozukluğu
Tanımlanmamış proteinler	Aktive monositler

1.4.1. Protein Oksidasyonun Temel Mekanizmaları

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar;

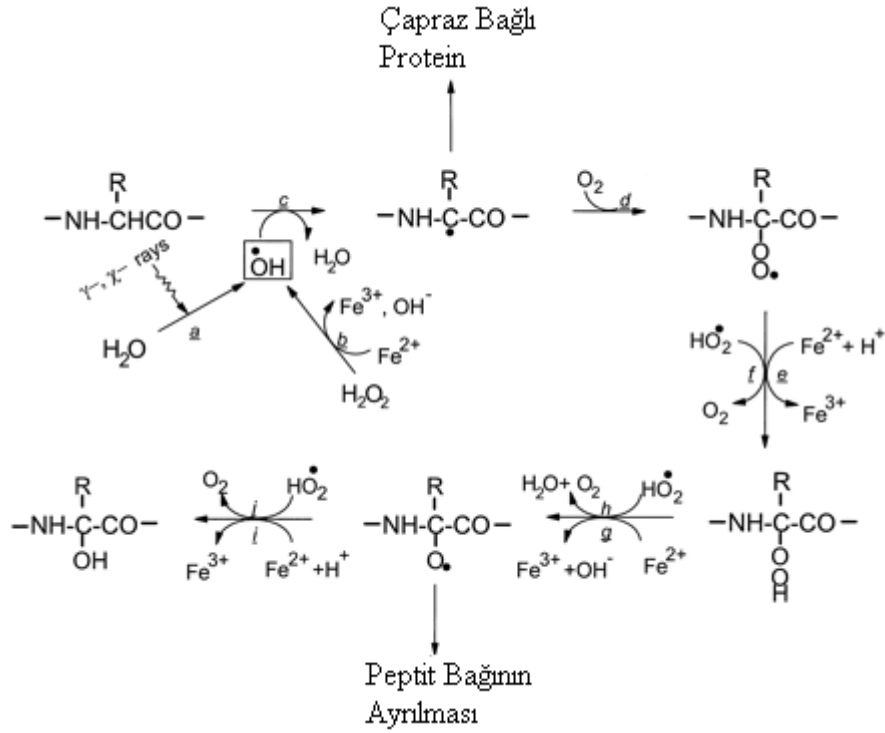
1. Protein karbonil oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu
2. Protein tiyol gruplarının (P-SH) kaybı [57].
3. Nitrotirozin (NT) oluşumu [58, 59].
4. İleri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumu olarak sıralanır [60, 61].

1.4.2. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu

Protein oksidasyonu temel olarak hidroksil radikali (OH^\cdot) ile başlar. Oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HO_2^\cdot)'in varlığı da gereklidir. Bu reaktif oksijen türevleri aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur.

Protein karbonil türevlerin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları aminoasitlerin α -karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır [62].

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin, lizin, sistein ve glisin gibi çok sayıda aminoasit bakiyesinde ve proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil ürünleri meydana gelir [63].



Şekil 5. Protein oksidasyonu sonucu çapraz bağların oluşumu

Polipeptit omurgasındaki α -karbon atomundan OH^{\cdot} radikali ile α -Hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda aminoasit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 5, Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan OH^{\cdot} radikali suyun radyolizinden (x ve γ ışınları ile oluşan) veya H_2O_2 ' in metal katalizli yıkımından açığa çıkar (Reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek (Reaksiyon d) daha sonra alkil peroksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkil peroksit, alkoksil radikali (Reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (Reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının çoğunda Fe^{+2} ve Cu^+ varlığında HO_2^{\cdot} ile etkileşim önem taşır (Reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile yan reaksiyonlar etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olur. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda (Reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein- protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar.

Alkoksil radikalinin oluşumu (Reaksiyon h ve g) peptit bağlarının diamit veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına sebep olur. Diamid metabolik yolu ile ayrılma

sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı, α -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- α Ketoaçıl yapısına sahip peptit parçacıkları oluşur. Diamit ve α -amidasyon metabolik yolları dışında polipeptit zincirinin serbest radikal aracılığı ile ayrılması; prolin, glutamil ve aspartil rezidülerinin oksidasyonu yolu ile de gerçekleşebilmektedir [58, 63].

Tablo 4. Oksidasyona yakın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri

AMİNOASİT	OKSİDASYON ÜRÜNLERİ
Sistein	Disülfidler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	2, 4, 5, 6 ve 7- hidrokstriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	2,3-dihidroksifenilalanin, 2,-3,- ve 4 hidroksifenilalanin
Tirozin	3,4- didihidroksifenilalanin, tirozintirozin Çapraz bağları, try-o-tyr çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin	asparagin, aspartik asit
Arginin	Glutamik semialdehit, aminovalerik asit
Lizin	Lizin hidroperoksitleri ve α - aminoadipik semialdehit
Glisin	Aminovalerik asit
Prolin	2-pirrolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin	Valin hidroperoksitleri ve hidrokstitleri
Lösin	Lösin hidroperoksitleri ve hidrokstitleri, α - ketoizokaproik asit, izovalerik asit ve aldehit
İzolösin	izolösin hidroperoksitleri
Treonin	2-amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asit	Okzalik asit, pirüvik asit

1.5. Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar, oksidatif hasara karşı moleküllerinin oksidasyonunu geciktiren, temizleyen veya engelleyen moleküller olarak tanımlanmaktadır. Organizmalardaki lipid,

protein, nükleik asit ve karbohidratlar gibi diğer moleküller oksidatif hasar için hedef durumundadır. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarı ve ölümüne kadar giden birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir. Organizmada antioksidan mekanizmalar pro-oksidan maddelere karşı koruyucu olarak bulunmaktadır. Bunlar zararlı oksidanları ortadan kaldırır veya *in vivo* olarak reaktif oksijen türü tarafından oluşturulan hasarı onarır [64].

Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre 4 gruba ayrılırlar:

1. Süpürücü etki gösterenler; yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.

2. Giderici etki gösterenler; Oksidanlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe ederler. β karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3. Zincir kırıcı etki gösterenler; Zincirleme olarak devam etmekte olan reaksiyonları belli aşamalarda kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4. Onarıcı etki gösterenler; Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

Antioksidanlar kaynaklarına göre ekzojen ve endojen antioksidanlar olarak gruplandırılabilir ve bunlar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Ekzojen ve Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması

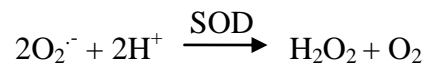
Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	Endojen Kaynaklı Antioksidanlar
Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar	Enzimler
Vitamin A	Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
β-karoten	Süperoksit dismutaz
Vitamin C	Katalaz
Vitamin E	Glutasyon peroksidaz
	Glutasyon-S-transferaz
	Hidroperoksidaz
Antioksidan yiyecek aditifleri	Enzim olmayanlar
Bütile hidroksitoluen (BHT)	a. Lipit fazda bulunanlar
Bütile hidroksianizol (BHA)	β-karoten, α-tokoferol
Etoksikin	b. Sıvı fazda bulunanlar(hücre sitozolü veya kan plazmasında)
Sodyum benzoat	Glutasyon, melatonin, sitokinler, ürat, sistein,
Propil galat	seruloplazmin, transferrin, miyoglobin,
Fe-süperoksitdismutaz (bakteriyel)	hemoglobin, ferritin, metionin, albümin, bilirubin

1.5.1.Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

1.5.1.1. Endojen Kaynaklı Enzimatik Antioksidanlar

Endojen kaynaklı enzimatik antioksidanlara Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT), Glutasyon Redüktaz (GR) gibi enzimler örnek verilebilir.

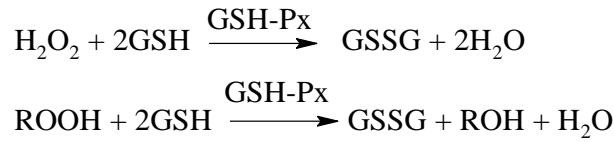
SOD (EC 1.15.1.1), süperoksidan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Daha önce bulunduğu dokuya göre bakır içeren protein manasına gelen eritrocuprein, serebro cuprein gibi isimlerle anılan enzim ilk kez 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından adlandırılmıştır. Bu enzim subsellüler kompartmanlarda süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir role sahiptir.



SOD sayesinde, spontan olarak gerçekleşen bu reaksiyon 400 kat hızlandırılır ve reaksiyon difüzyon hızında yürür. İnsanda SOD' un iki tipi bulunmaktadır. Sitozolde

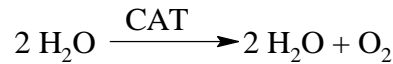
bulunan dimerik Cu-Zn ihtiva eden CuZn-SOD ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn SOD'dür. Genel olarak hücrelerde en bol bulunan sitozolik form olan CuZn-SOD'dür. CuZn-SOD enziminin başlıca fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücrelerde meydana gelen süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktır. Böylece lipit oksidasyonunu inhibe eder. SOD izoenzimlerinin doku ve organellerdeki dağılışı buralarda oksijenin kısmi basıncındaki artışa bağlıdır. Mitokondrilerde bulunan Mn-SOD bakterilerde de bulunmaktadır ve aralarında yapısal benzerlik vardır. Bakterilerde ayrıca Fe ihtiva eden SOD da tespit edilmiştir [65].

Glutasyon peroksidaz GSH-Px (Glutasyon: H₂O₂ okside redüktaz EC: 1.11.1.9) molekül ağırlığı 85000 dalton olan, tetramerik dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonlarla hidrojen peroksidi suya indirgerken hidroperoksitlerin de daha etkisiz bileşiklere dönüşümünü katalizler.



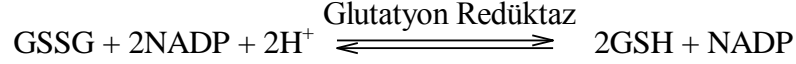
GSH-Px lökositlerde de önemli fonksiyona sahiptir. Özellikle fagositik hücrelerde oksidatif yıkım sonucu oluşan hidrojen peroksidin detoksifiye edilmesinde rol oynar. GSH-Px aktivitesi düşük fagositlerde ortama H₂O₂ salınımını artırmaktadır. Eritrositlerde de GSH-Px hücreyi H₂O₂'nin tesirinden koruyan en önemli antioksidan enzimdir. GSH-Px yaşlılarda ve Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, yaşlılar ve hipertansiyonlu şahısların lökositlerinde ise düşük olduğu ileri sürülmektedir [66].

Katalaz (H₂O₂ oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6) dört hem grubu ihtiva eden bir enzimdir. Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar.



CAT, GSH-Px 'den farklı olarak daha çok peroksizomlarda lokalize olmuştur. CAT başta karaciğer olmak üzere vücutta çeşitli doku ve organlarda bol miktarda bulunur. GSH-Px düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında aktif iken CAT daha çok yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarında aktif hale gelir. Ayrıca CAT daha çok H₂O₂ etilhidroperoksit, metilhidroperoksit gibi küçük molekülleri substrat olarak kullanır. Lipit peroksitlerine ise etki etmez. Dolayısıyla lipit oksidasyonu başladığında lipit hidroperoksitler meydana geldikten sonra CAT antioksidan aktivitede etkisiz kalır. Katalaz insan eritrositlerinde yüksek konsantrasyonda sitozolde çözünmüş halde bulunur [67].

Glutasyon Redüktaz (NADPH: okside glutasyon oksidoredüktaz, E.C: 1.6.4.2) okside glutasyonun indirgenme reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. Molekül ağırlığı 104.800 olan enzim dimerik yapıdadır. Koenzimi NADP ve prostetik grubu FAD'dır.



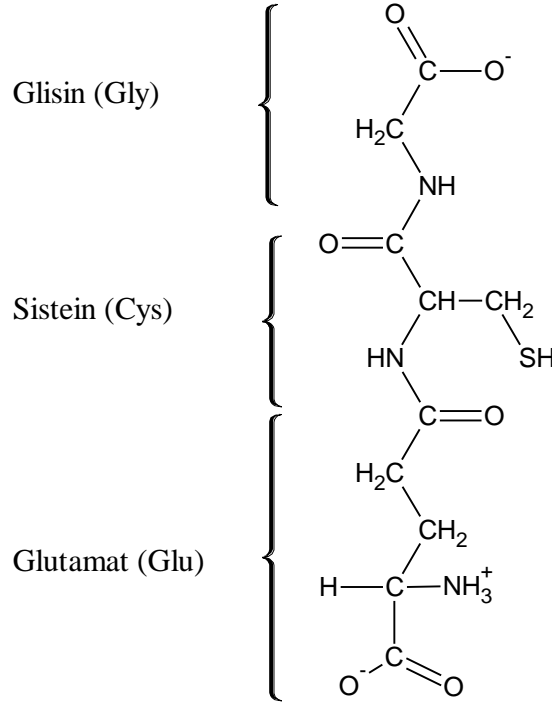
GR, reaksiyonuyla redükte glutasyon rejenerasyonunu sağlar. Fizyolojik şartlarda reaksiyon tek yönlüdür ve bu şekilde GSH/ GSSG oranı (1/500) yüksek tutulur. GSH ise tüm hücrelerde en bol bulunan protein dışı tiyoldür ve hücre metabolizmasında, bazı bileşiklerin transportunda hücre korunmasında rol alır. Emzimin NADPH'a olan afinitesi NADH' a karşı olandan 60 kat fazladır. Koenzim olarak kullanılan redükte NADPH'lar ise pentoz monofosfat metabolik yolunda üretilir. Bu yolun anahtar enzimi ise glukoz-6-fosfat dehidrogenazdır. Dolayısıyla antioksidan savunma sisteminde GR ile birlikte bu enzimin de önemli rolü vardır. GR, sitozol ve mitokondrilerde bulunur. GR, glutasyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde glutasyon redoks döngüsü yoluyla hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında rol alır. Dokularda GSH konsantrasyonu ve GR aktivitesinin yaşlanmayla azaldığı gösterilmiştir. Alyuvarlarda GR eksikliği daha çok riboflavin eksikliğine bağlı olarak görülmüştür. Bu durumda enzim FAD ile ön inkübasyona tabi tutulursa gerçek aktivitesi ortaya çıkar. Biskloronitrozoüre, glutasyon redüktazın spesifik inhibitörüdür [68].

1.5.1.2. Endojen Kaynaklı Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Endojen kaynaklı olup da enzimatik olmayan antioksidanlara glutasyon, askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, albümin, bilirubin örnek verilebilir.

Glutasyon (GSH), vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir. Tabiatta yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tri-peptit olduğu anlaşılmış ve 1935 yılında δ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir. GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (0,1 – 10 mM). Glutasyon disülfid (GSSG), GSH'deki sisteinin tiyol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH' ın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiyol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile

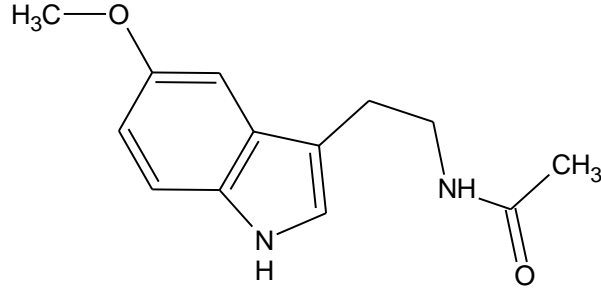
beraber bulunur. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır [69]. Glutatyonun molekül yapısı Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6. Glutatyonun yapısı

GSH’deki en aktif grup tiyol grubudur. GSH’daki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. Tiyol grubunun asitliği GSH’ı kendi anyonu (RS^-) ile sulu çözeltilerde kuvvetlice reaksiyon vermesine sebep olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH ‘sının artışı ile doğru orantılıdır.

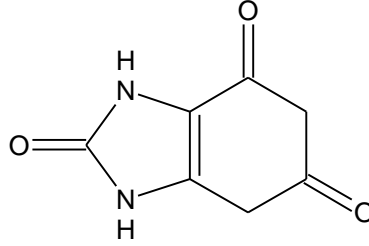
Melatonin ($C_{13}H_{16}N_2O_2$), HO^- ’ni temizleyen güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Melatonin, HO^- ile reaksiyona girdikten sonra bir indolilkatyon radikaline dönüşür ki, bu da ortamdaki O_2^- tutarak antioksidan etki gösterir. Lipofilik bir madde olduğu için kan-beyin bariyeri de dahil birçok kompartmana girerek geniş bir antioksidan aktivite gösterir ki, bu özellik diğer antioksidanlara karşı bir üstünlüktür. Melatoninin diğer bazı antioksidanlar gibi prooksidan etkisi yoktur. Yaşlanma ile birlikte melatonin de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların patojenezinde önemli rolü olabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak Şekil 7’de verilen melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğuna inanılmaktadır [69].



Şekil 7. Melatoninin kimyasal yapısı

Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından benzerlerine göre çok daha üstün bir özellik kazandırır.

İnsan dokuları ürat oksidaz içermez. Bu yüzden pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit birikir. Şekil 8'de verilen ürik asit, 1O_2 , peroksil radikalleri, HO^- ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve *in vivo* antioksidan olarak kabul edilmektedir. Japon araştırmacılar lipit oksidasyonunun ürik asitle önlendiğini bildirmişlerdir [69].



Şekil 8. Ürik asidin kimyasal yapısı

Seruloplazmin, ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu böylece hidroksil radikali oluşumunu önler [69].

Albumin, önemli bir hücre dışı antioksidandır. Lipit oksidasyon oluşumunu önler ve HOCl toplayıcısıdır.

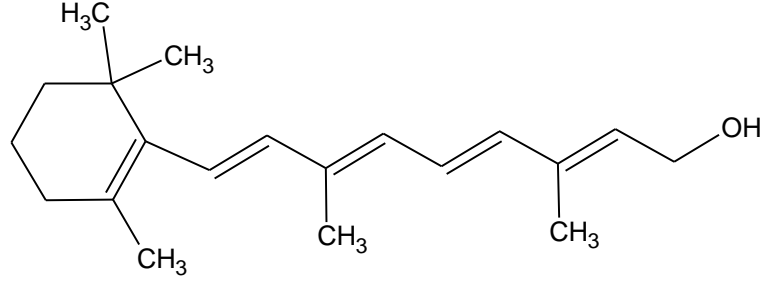
Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Fakat proteolitik enzimleri de aktive ettiklerinden dolayı zararlı olabilirler [69].

Bilurubin yüksek düzeyde doku toksini olmasına rağmen, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizler.

1.5.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar

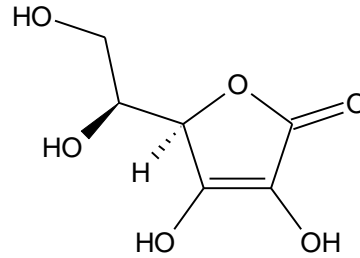
Ekzojen kaynaklı antioksidanlara A, C, E vitaminleri ve diyetle aldığımız fenolik bileşikler örnek olarak verilebilir.

Vitamin A (β -Karoten): Yağda eriyen vitaminlerden ilk bulunanıdır. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü singlet O_2 temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon verip lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir. Şekil 9’da verilen A vitamini oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme, epitel hücre sağlamlığında rol oynar [69].



Şekil 9. A vitamininin molekül yapısı

C vitamini kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit özelliği yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaktan kolayca emilir. Isılmaya dayanıksız olup dondurulmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dL kadardır.

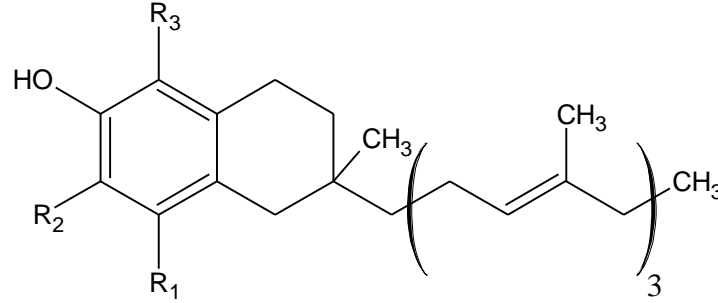


Şekil 10. C vitamininin molekül yapısı

C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit, semihidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. O_2^- ve HO^- İle kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. C vitamininin; bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir [70].

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak 1922 yılında izole edilmistir ve α , γ , β , δ olarak adlandırılan dört tokoferol karışımıdır. α -tokoferol doğal dağılımı en geniş ve

biyolojik aktivitesi en fazla olandır. Antioksidan etkisi en fazla olan α -tokoferol'dür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur. E vitamininin molekül yapısı Şekil 11'de verilmiştir [71].



Şekil 11. E vitamininin molekül yapısı

α -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Miyokard membranlarındaki miktarı da fazladır. Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır, en çok yer fıstığı, badem, pamuk ve keten tohumunda, eser miktarda da zeytinyağında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır. Bir molekül E vitamini 100 molekül yağ asidi oksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini O_2^- , HO^- , 1O_2 , lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri temizler. α -tokoferol etanol, karbon tetraklorür, dikuat, parasetamol, kalsiyum boşalması ve diğer uyarıcılarla oluşan hepatosit lipid oksidasyonunu inhibe eder [71].

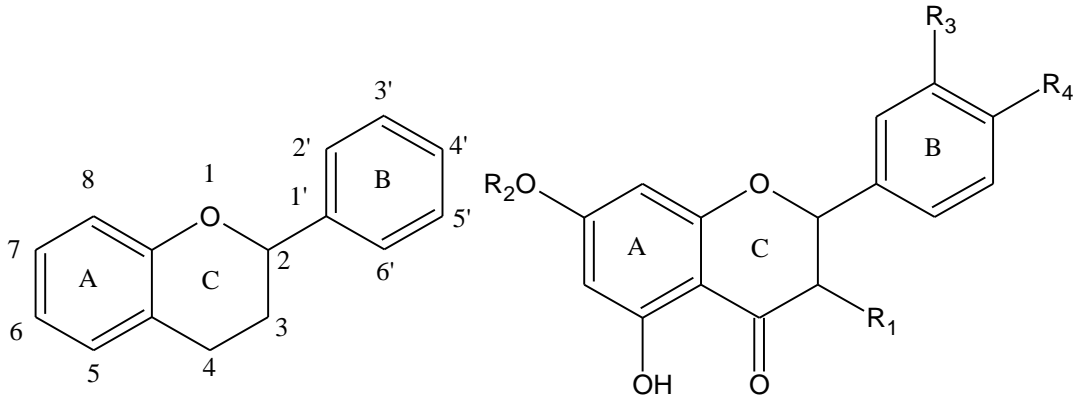
1.5.3. Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler daha yaygın olarak kullanılan ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. Bilindiği gibi hidroksi benzen, çoğunlukla fenol adı ile anılır. Buna göre en basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenoldür. Diğer tüm fenolik maddeler bundan türemişlerdir. Bitkisel fenoliklerin sağlık açısından yararlı ve önemli bileşikler olduğu saptanmıştır. Nitekim klorojenik asit ve kateşinler gibi çok yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin antimutajen ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir [72].

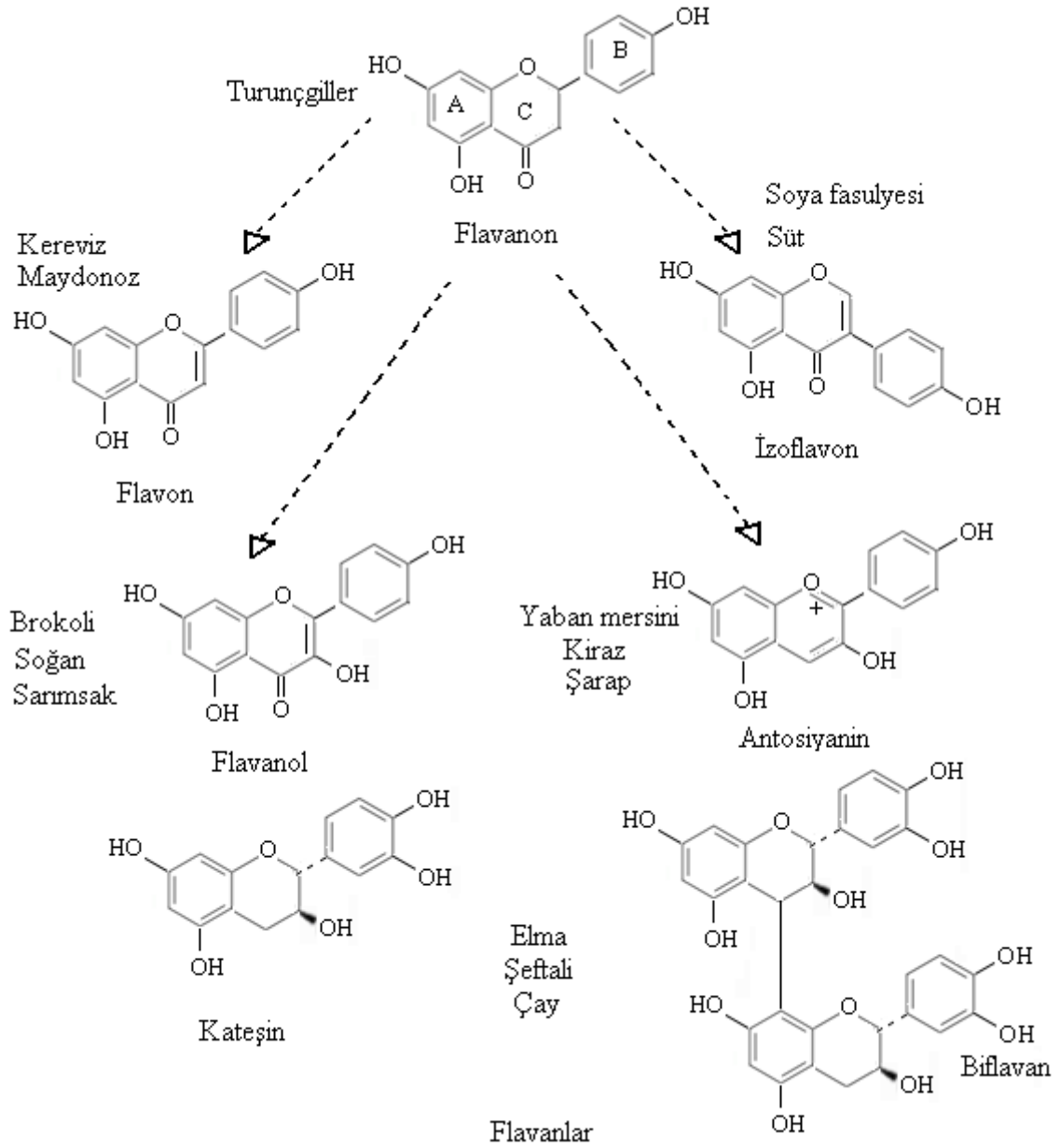
Fenolik maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılabilir. Bunlar çok önemli antioksidanlar olup, bitkisel gıdaların tüketilmesiyle

sağlığa olan pozitif etkileri artırılabilir. Fenolik asitler yaygın olarak bitki ta kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Başlıca fenolik asitler gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içerir [73].

Flavonoidler insanlar tarafından sentezlenemeyen bitki fitokimyasallarıdır. Flavonoidler, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerin (renk maddelerinin) C₆-C₃-C₆ çatısına sahip olanlarına verilen addır. Flavonoidlerin tümü C₆-C₃-C₆ yapısındadır, ancak molekuldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklıdırlar. A halkası  karbonlu bir bileşik olan malonil-CoA (sinamik asit) dan sentezlenirken, C ve B halkaları şikimat ve fenilpranoid metabolik yolu üzerinden yine glukozdan sentezlenir. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanmasıyla, bir başka deyişle, içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre altı ana alt gruba ayrılabilir: flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyanidinler, flavanlar, izoflavonoidler.

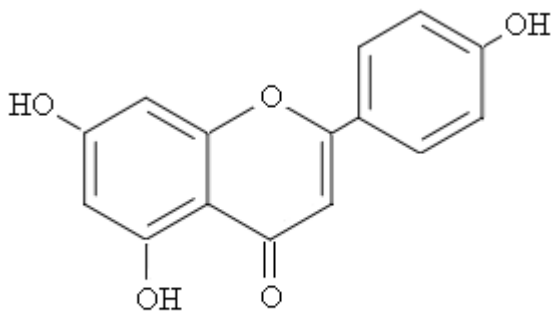


şekil 12. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b)

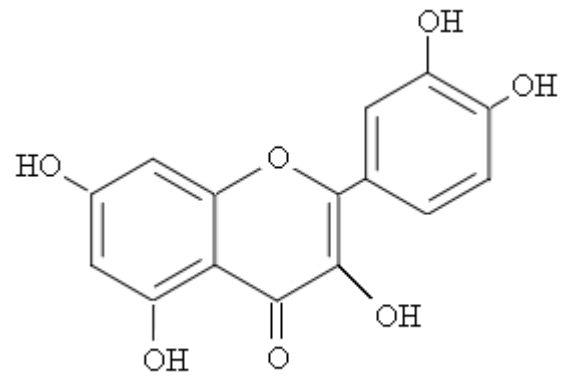


Şekil 13. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

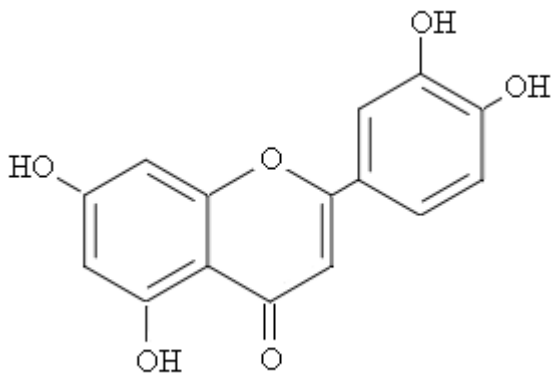
Genel olarak, flavanonlar turunçgil meyvelerde, flavonlar baharatlarda, izoflavonoidler baklagillerde, antosiyanin ve kateşinler meyvelerde, flavonoller tüm meyve ve sebzelerde bulunur.



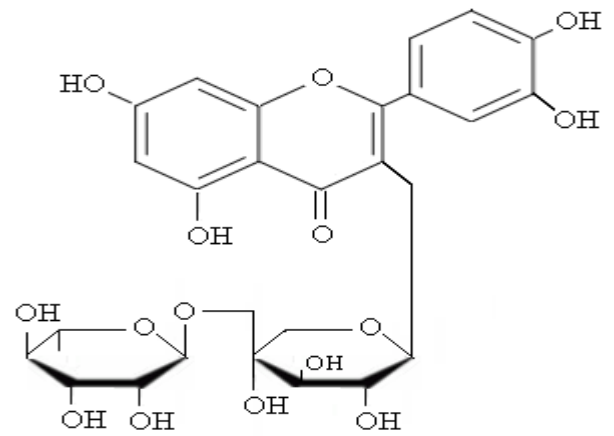
Apigenin
(Flavon)



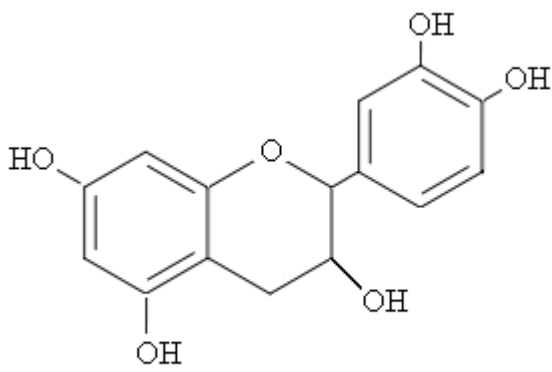
Kuersetin (Flavanol)



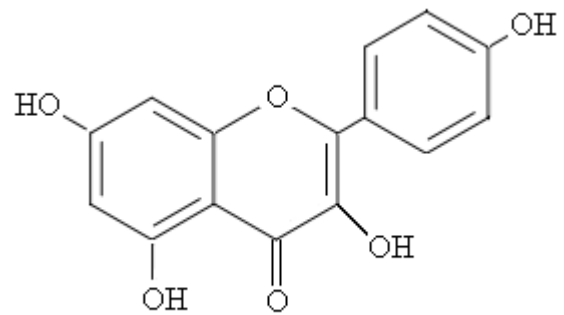
Luteolin (Flavon)



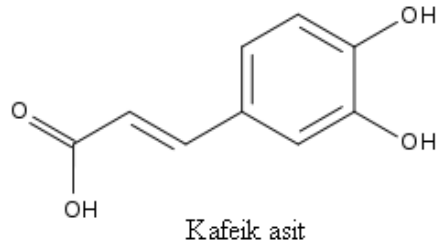
Rutin



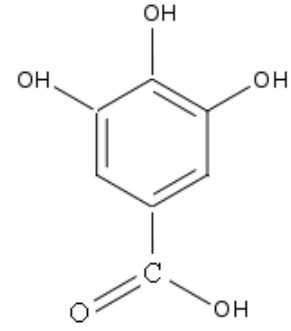
Kateşin (Flavanol)



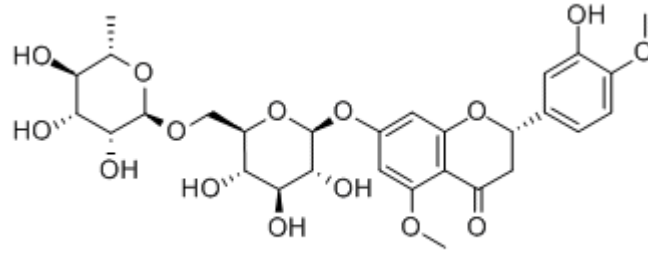
Kaempferol (Flavonol)



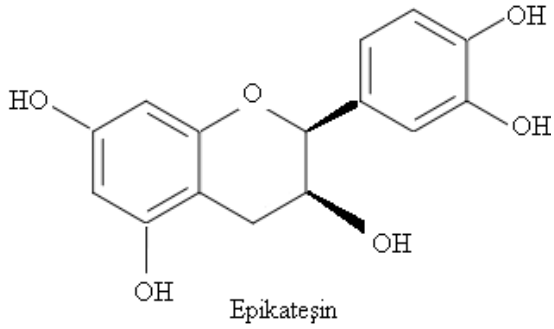
Kafeik asit



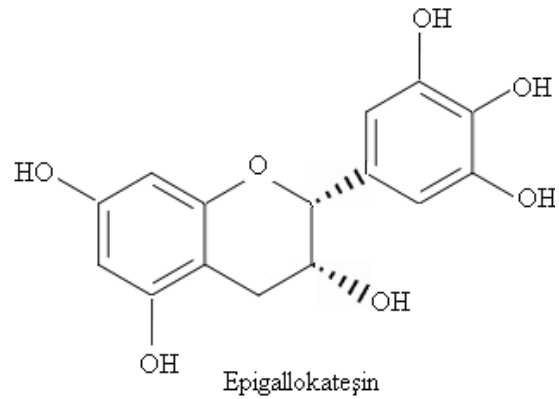
Gallik asit



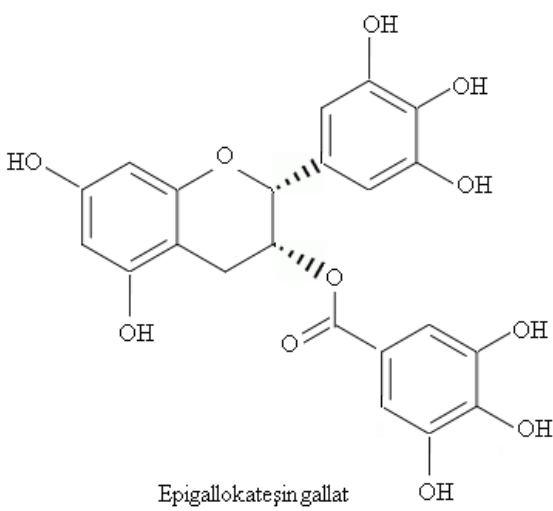
Hesperidin



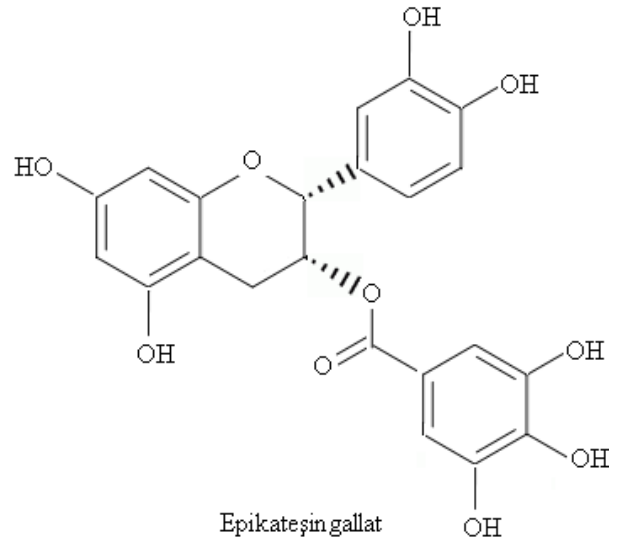
Epikateşin



Epigallokateşin



Epigallokateşin gallat



Epikateşin gallat

Şekil 14. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları

Flavanonlar renksizdirler ve özellikle; taksifolin, naringin, naringenin, eriodiktol ve hesperitinle temsil edilirler. Birçok gıda flavon ve flavonol içermesine rağmen; kimyon, yaban çileği, meyan kökü, nane ve turunçgil meyveler flavanon içerirler. Flavanonların asıl kaynağı turunçgil meyveler ve sularıdır. Yaban çileği ve kızılıçıkta narirutin ve naringenin glikozitleri; kimyon ve nanede hesperidin bulunur.

Flavonlar, meyvelerde pek bulunmayan fakat tahıl (arpa, buğday, mısır vb.) ve baharatlarda (nane vb.) bulunan flavonoid sınıfıdır. Flavonlar, soluk-sarı renklidir. Esas flavonlar; apigenin ve luteolinlerdir. Maydanoz apigenin ve kriseriol içerir. Biberiye ve kekik gibi baharatlar flavon içerir. Luteolin, en fazla tahıl ve baharatlarda bulunur. Sebzelerde ve sebze yapraklarında, luteolin glikozitleri ve apigenin mevcuttur. Glikozillenmiş flavonlar, acı maddelerin acılığını azaltır. Flavonlardan neodiosmin; limonin, naringin, kafein, kuinin ve sakkarinin acılığını azaltır.

Flavonoller ve glikozitleri çoğunlukla meyvelerin dış kısmında bulunur. En çok bilinen flavonoller kuersetin ve kaempferoldür. Kuersetin, birçok meyve, sebze ve içecekte bulunur. Diyetimizdeki en önemli flavonoiddir ve özellikle soğan ve çayda bolca bulunur. Kuersetin, luteolin ve galangin yapılarındaki farklılığa rağmen kuvvetli antioksidan olarak bilinirler. Kuersetin ve rutin lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek, hücreyi okside LDL'den gelen zarara karşı korur. Rutin, kan damarlarının hücre aralarını yapıştırır ve kanın damarın dışına sızmasını önler. Rutinde, bir aktif madde olan P vitamini vardır ki, kan damarları iltihaplanınca ve kanamanın durdurulmasında yardımcı olur; kan pıhtılaşmasını artırır; radyoaktif maddelerin etkisiyle damarların esnekliği zayıflamışsa, onun düzelmesini sağlar. Bunun yanı sıra rutin, gıstamine karşı da etkilidir. Rutin damarların daralmasına giderir ve kalp kaslarının artırır. O yüzden flavonlar, zehirlenen kalbin atması zayıflayınca sık uygulanır. Kaempferol, genellikle meyve ve lifli sebzelerde bulunur. Ayrıca bazı taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde (çilek, kiraz vb.), baharatlarda, baklagillerde ve köklü sebzelerde bulunur. İzohamnetin ve miresitin de flavonoller arasında yer alır. İzohamnetin, soğan ve şeftalide bulunur. Miresitin ise özellikle taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, mısır ve çayda bulunur.

İzoflavonoidler, östrojenik aktivitesi iyi bilinen farklı bir flavonoid sınıfıdır ve çoğunlukla baklagillerde bulunur. 'B' halkası oryantasyonuyla yapısal olarak genel flavonoidlerden ayrılır. Bunlar: İzoflavanonlar, İzoflavonlar ve İzoflavonollerdir. En iyi bilinen izoflavonoidler daidzein ve genisteindir. Soya fasulyesi; fasulye, yeşil bezelye ve yonca filizlerinde bulunan daidzein ve genisteinin ana kaynağıdır. Soya ürünleri insanlarda

LDL oksidasyonunu azaltmada etkin bulunmuştur. Bilinen diğer izoflavonoidler biokanin A ve formononetindir. Fasulyelerde, bezelyelerde, ayçiçeği tohumlarında, alfalfa filizlerinde ve yonca filizlerinde bulunur.

Antosiyaninler, taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, kiraz ve erikte, patlıcan, kırmızılâhana ve turpta kırmızı ve mavi rengi üretir. Antosiyanin rengi pH'a bağlıdır. Antosiyanin genellikle, pH 3.5'te kırmızıdır, pH artışıyla önce renksizleşir ve sonra maviye döner. Antosiyaninler, yenilebilir tahıllarda, köklerde ve yeşil sebzelerde bulunmasına rağmen özellikle meyvelerle ilişkilidir. Elma, armut, ayva, kayısı, erik ve şeftali gibi çekirdekli meyvelerin kabuğunda; taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerin hem kabuğunda, hem de etli kısmında bulunur. İçecekler ve diğer besin maddeleri için renklendirici ajan olarak kullanılırlar. Bir de farmasötik ürünlerin boyanmasında kullanılırlar. Test edilen antosiyaninlerin çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, antosiyaninlerin üzüm kabuğundan izole edilen ekstraktı çok iyi antioksidatif aktivite göstermiştir [70].

Flavanlar, yapısal ve adlandırma olarak karmaşık flavonoidlerdir. Bunlar: kateşinler, leukoantosiyeninler, proantosiyeninler ve tanninlerdir. Flavanlar renksizdirler. Flavan ve onun özel şekli olan kateşinler (flavan-3-ol), çayda bolca bulunur. Diğer kateşin kaynakları kırmızı şarap ve çikolatadır. Monoflavanlar, olgun meyvelerde ve taze yapraklarda bulunur. Turunçgil kabuklarında bulunan flavonoidlere, 'bioflavonoidler' denir. Biflavanlar ve triflavanlar meyve ve tahıllarda bulunur. Elma, böğürtlen, kuşüzümü, yabanmersini, üzüm, şeftali ve çilekte bulunur. Geleneksel tıpta, son yirmi beş yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve gerçekleştirilen çalışmalar sonucu flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki olduğu bulunmuştur. Örneğin; flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken, serbest 4'-OH grubunun metoksil grubu ile substitue olması aktiviteyi önemli derecede azaltır. Bu durum göz önüne alındığında kuersetin, luteolin, kateşin ve rutin antioksidan olarak etkili flavonoidlerdendir. Yapılan araştırmalarda, flavonoidlerin sadece antioksidan aktiviteye değil, aynı zamanda birçok biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir [72,73].

Flavonoidlerden kumarinler, molekülünde kokulu laktonlar mevcut olan maddelerdir. Kumarinler, kan pıhtılaşmasını önler, düz kasların kasılmasını azaltır ve ağrı kesici, yatıştırıcı ve idrar söktürücü özelliklere sahiptir. Kumarinli maddelerin en önemlisi, dihidroksikumarindir (dikumarol). Geperin gibi o da karaciğerdeki protrombin

biyosentezini azaltır. Rutin, kuersetin, kaempferol, miresitin ve hiperin de idrar sökücü özelliğine de sahiptir. Flavonoidli maddeler, çeşitli nedenlerden kaynaklanan kan akmasını durdurur. Bu nedenle onlar, hipertoni, miyokart enfarktüsü, bronş astımı, şeker diyabeti ve alerji tedavisinde önemli bir yer tutar. Flavonoidlerin antibakteriyal özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, kuersetinin gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı güçlü bir etkisi vardır.

Flavonoidler üzerine birçok mutajenik çalışma da yapılmıştır. Flavonoid aglikonların önemli mutajenik aktivite gösterdikleri, özellikle kuersetin, miresitin, kaempferol ve tamariksetinin aktif mutajenler olduğu bulunmuştur. Kuersetin, insan metabolizmasında anti-karsinojenik ve anti-arterit özellik de gösterdiğinden üzerinde en çok çalışılan bileşiktir. Bazı araştırmalar, kateşinlerin de antimutajenik ve antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin oksidatif DNA zedelenmesini serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önlediğini göstermektedir. Flavonoidlerin çoğu glutatyon-S transferazı (GST) aktive etme yeteneğine sahiptir [71].

Yapılan bazı araştırmalar ise kuersetin ve türevlerinin doğal antioksidan olan α -tokoferole göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil ve metoksil gruplarının antioksidatif aktiviteye katkıda bulunduğu da deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Araştırmacılar çeşitli yöntemler ve test mikroorganizmaları kullanarak, bitkilerden elde edilen bileşiklerin mantarlara karşı özelliklerini ortaya çıkarmışlardır. Bazı mantarlara karşı kuersetin, miresitin ve kaempferolün antifungal aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Flavonoidler serbest radikalleri temizleme, güçlü antioksidan olma özelliklerinin yanı sıra hidrolitik ve oksidatif enzimler olan fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenazın inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur [74].

Genel olarak 'Flavonoidler' ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, antibiyotik, antiallerjik, antidiyareik, antiülser, östrojenik, antiviral ve daha birçok etkilerinin olduğu söylenebilir [75].

Dünyada tedavi amaçlı olarak kullanılan bitki sayısının 20.000 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir [76].

1.6. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

'Oksidatif stres' koşullarında serbest radikaller biyolojik makromoleküllerle etkileşerek çeşitli hastalıklara yol açtığından özellikle risk grubundaki bireylerin aldığı gıdalarda, bu serbest radikalleri gideren, organizma tarafından sentezlenen ya da dışarıdan besinlerle alınan, antioksidanların toplamsal tayini önemlidir. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek için birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- 1- MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- 2- Eritrosit Membranında Protein Karbonil Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- 3- Eritrositlerde Toplam Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi Yöntemi
- 4- Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi Yöntemi
- 5- Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi
- 6- Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi
- 7- Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi
- 8- Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi
- 9- DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi
- 10- Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi
- 11- Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi(CUPRAC) Yöntemi

Bunlar arasında en yaygın kullanılanları burada özetlenecektir.

1.6.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

MDA, lipid oksidasyonunun ikincil ürünlerinden en iyi bilinenidir ve hücre duvarı hasarının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılabilmektedir. Lipit oksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için kullanılan pek çok yöntem mevcuttur. Son yıllarda, Ohkawa vd., (1979)'nin ortaya koyduğu yöntemlerden biri bir miktar değiştirilerek uygulanmaktadır [77]. Yöntem, karaciğer doku homojenatı, Fe⁺² ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında ortaya çıkan ve bir lipid peroksit ürünü olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbiturik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks 532 nm'de maksimum absorbans oluşturur. Tayinde antioksidan aktivite köre göre MDA oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları (IC₅₀) cinsinden verilir. %50 inhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen madde miktarını veren madde antioksidan aktivite yönünden en etkili olanıdır. MDA oluşumunun engellenmesi antioksidan aktivitenin varlığını gösterir [77].

1.6.2. Eritrosit Membranında Protein Karbonil Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

Protein karbonil(PK) gruplarının oluşumu protein oksidasyonunun oluşumunu ve hücre zarı tahribatının göstergelerinden biridir. Levine vd., (1990)'nin geliştirdiği yöntemle membran protein karbonil düzeyleri ölçülmektedir. Oksidatif strese maruz bırakılan hücre zarında bulunan proteinlerin 2-4-dinitro fenil hidrazin(DNPH) ile oluşturduğu schiff bazının 370 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır. Tayinde antioksidan aktivite köre göre PK oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları (IC₅₀) cinsinden verilir. %50 inhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen madde miktarını veren madde antioksidan aktivite yönünden en etkili olanıdır. PK oluşumunun engellenmesi antioksidan aktivitenin varlığını gösterir [78].

1.6.3. Eritositlerde Toplam Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi Yöntemi

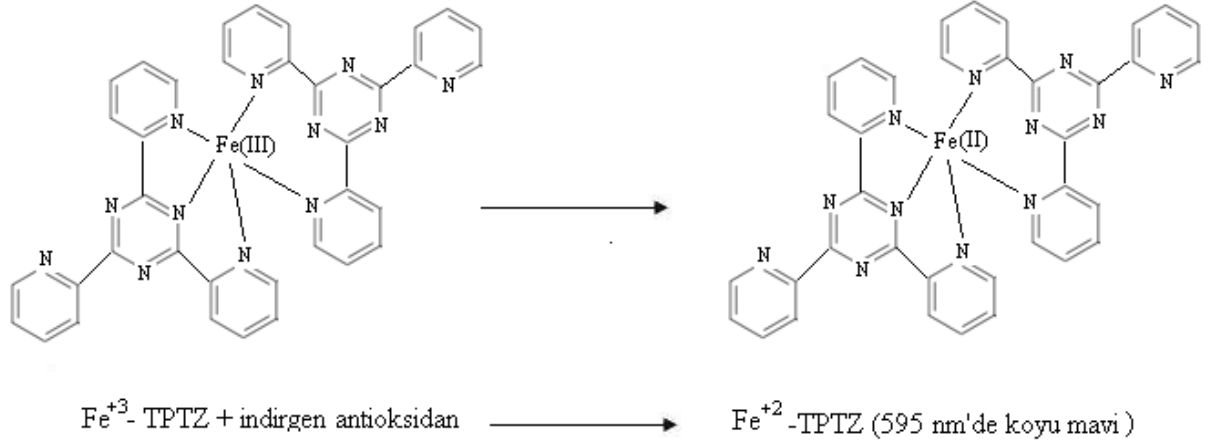
Redükte glutasyon hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülüdür ve ölçümü patogenezinde oksidatif stresin bulunduğu çeşitli hastalıklarda antioksidan savunma mekanizmasının durumu hakkında bilgi edinilmesi için iyi bir belirteçtir [79].

1.6.4. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi Yöntemi

Katalaz, süperoksit dismutaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin hücresel düzeyde antioksidan kapasiteleri ölçülebilir.

1.6.5. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan yöntemle göre indirgeme kuvveti özütün dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 595 nm'de takip edilerek belirlenir ve bu tepkime şekil 15'te verilmiştir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır. Güncel olarak kullanılan FRAP yönteminde 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0,7 V' tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidrosilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi hidrojen transferi ile radikal temizleyen özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir [80].



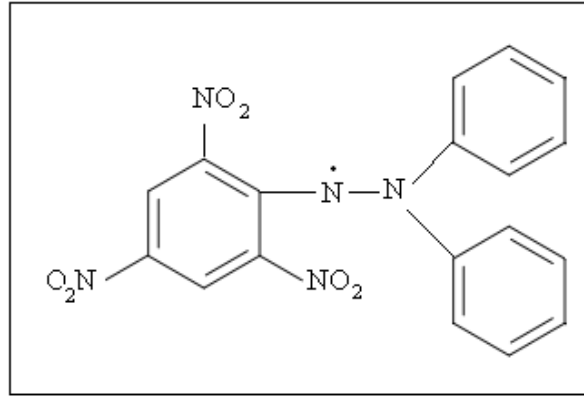
Şekil 15. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.6.6. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

Bu yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-nenekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbans oluşturur [81]. Adı bunu yansıtmamasına rağmen, bu yöntem aslında numunenin indirgeme kapasitesini ölçer. Yani, bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.6.7. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorbans oluşturmaktadır. Antioksidanlarla muamele, DPPH'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH'ın absorbansındaki değişim ölçülerek, absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilmekte; grafikteki $y=ax+b$ denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$ veya μM cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu yöntemde, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu yöntem, radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır [82].



Şekil 16. DPPH radikalinin molekül yapısı

1.6.8. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

CUPRAC yöntemi, diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerine göre daha hızlı, basit ve kullanışlıdır; radikal kromojen reaktiflerin pahalılık, güç temin edilebilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmıştır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan gıda maddelerinde bol bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidanları yükseltger ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuprin kelatının 450 nm'deki absorbanısı okunarak sonuç verilir. Yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. CUPRAC, pH 7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtma şansı daha fazladır. Uygun çözücü seçimiyle hem hidrofilik, hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir [83].

1.7. Çay Bitkisinin Özellikleri

Çay, *Camellia sinensis* olarak bilinen bitkinin yapraklarından elde edilen ve dünyada sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecektir. Çay, yaprağını dökmeyen her zaman yeşil olan bir bitkidir ve her yıl yaklaşık olarak 2,5 milyon ton kuru çay üretilmektedir. Farklı yöntemlerle üretilen çay, yeşil, siyah ve oolong olarak 3 ana kategoriye ayrılmaktadır. Yeşil çay fermente edilmemiş, siyah çay tam fermente edilmiş ve oolong çay ise, yarı fermente edilmiş bir özelliğindedir [84]. Dünyada üretilen ve tüketilen çayın % 78'si siyah çay, % 20'si yeşil çay ve % 2 oranında ise oolong çaydır. Çay bitkisi eski çağlardan beri yüzyıllardır tıbbi özellikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Çayın bu özelliği kimyasal bileşeni ile ilişkilidir. Çayın kimyasal bileşenlerin de proteinler, polifenoller, polisakkaritler, klorofil, mineraller ve eser elementler, uçucu bileşikler, amino ve organik asitler, ligninlerin ve alkaloidler (kafein, teofilin, ve teobromin) bulunmaktadır [84].

Çay yapısında bulundurduğu flavonoidlerden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Ana flavonoidlerden epigallokateşin-3-gallatın (EGCG), epikateşin (EC), epikateşingalat (ECG) ve epigallokateşin (EGC) yeşil çayda ve az miktarda da siyah çayda bulunmaktadır. EGCG en bol ve en yaygın bulunan çay polifenolüdür [85].

Tablo 6. Çay yaprağının bileşimi

Bileşen	% Kuru maddede	Bileşen	% Kuru maddede
Flavanoller	17-30	Kafein	3-4
Epikateşin (EC)	1-3	Aminoasit ve protein	15-19
Epikateşingalat(ECG)	3-6	Basit karbohidratlar	4
Epigallokateşin(EGC)	3-6	Polisakkaritler	13
Epigallokateşingallat	9 - 13	Kül	5
Kateşin	1 - 2	Selüloz	7
Gallokateşin	3-4	Lignin	6
Flavanoller, flavonol glikozitleri	3 - 4	Lipitler	2-3
Polifenolik asitler	2 - 3	Organik asitler	0.5 – 1.5
Leykoantosiyeninler	5	Pigmentler	0,5
Toplam polifenoller	30 - 36		

Ülkemizde yoğun bir şekilde tüketilen çay içeceğinin katı ekstresinde bileşenlerin yaklaşık olarak ortalama yüzde oranları; kateşinler (% 3-10), theaflavinler (% 3-6), thearubiginler (% 12-18), flavonoller (% 6-8), fenolik asitler ve depsitler (% 10-12), amino asitler (% 13-15), metilksantinler (% 8-11), karbohidratlar (% 15), proteinler (% 1), mineraller (% 10) ve uçucu maddeler (< % 0,1) şeklindedir [86].



Şekil 17. Çay bitkisinin resimleri

Tablo 7. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu

	Yeşil Çay	Siyah Çay	Oolong Çay
Epikateşin	6.06a; 1-9.54b; 7.22-13.3c; 0.55-0.87e	4.0 b; 4.1d; 0.04e	1.75a; 0.34e
Epikateşin gallat	5.34a; 3-4.92b; 1.42-4.54c; 1.95-2.91e	1.19-11b; 8.0d	3.58a; 0.63e
Epigallokateşin	36.53a; 2-36.2b; 3.94-7.92c; 0.44-0.88e	0.9-6.0b; 10.5d; 0.19e	7.70a; 0.38e
Epigallokateşin galat	18.10a; 6-32.6b; 5.55-10.4c; 13.37-13.74e	0.95-12.0b; 16.6d; 0.3e	8.99a; 3.62e
Gallokateşin gallat	0.26-0.38e	-	0.11e
Gallokateşin	2.57-2.81b	0.40-1.57b	-
Gallik asit	0.74-0.78b; 0.23-0.52e	2.79-3.33b; 1.83e	0.58e
Teaflavin	-	2.5d	0.66a
Tearubugin	-	59.4d	-

* a mg/g; b mg/100 mL; c %; d mg/g (kuru maddede); e % (kuru maddede)

Yeşil ve siyah çayın direkt olarak tedavi edici olarak görülmemekle birlikte, araştırmalarda toplanan bulgular göstermiştir ki, fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi pek çok hastalığın önleyicisi olabilmektedir. Çayda bulunan polifenollerin etkileri şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ Tümör gelişimini ve yayılımını (hücre zarı çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığını azaltarak, serbest radikal oluşumunda görev alan enzim sistemini inhibe ederek) önler,
- ✓ Vitamin P etkisi olarak bilinen, kılcal damarlarda kanama ve çatlamları engelleyici etkileri bulunmaktadır,
- ✓ H.pylori'nin (bir bakteri türü) neden olduğu gastrik hastalıkların kontrolünde kullanılabilir,
- ✓ Human papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu cervical lesion'ların (rahim yolunda oluşan anormal değişiklik) tedavisinde etkili olabilmektedir,
- ✓ Normal hücreleri, kanserli hücrelerin yayılımından korur,
- ✓ Serbest radikal ögütücüdür ve güçlü bir antioksidandır,
- ✓ Cilt için bir anti-inflamatuar gibi (enfeksiyon sonucu oluşan iltahaplanmalara karşı) kullanılabilir,
- ✓ Meme kanseri, akciğer kanseri, kolon (kalın bağırsak) kanseri riskini düşürür,
- ✓ Alkol kullananlarda, sigara içenlerde oluşabilecek kanser riskini düşürür,
- ✓ PCP (pentaklorofenol) kirleticilerinin sebep olduğu kanser riskini düşürür,
- ✓ Rahim yolu kanseri tedavisinde kullanılmıştır,
- ✓ Tümör gelişimine karşı prostatı, mesaneyi korur,
- ✓ Açlık esnasında oluşan mide zafiyetinden korur,
- ✓ Beyinde lipit oksidasyonunu azaltır,
- ✓ Kemik iliği lösemili hücrelerinin büyümesini kontrol altında tutar,
- ✓ Aterosklerosis'i (damar tıkanıklığı) önler,
- ✓ Parkinson ve Alzheimer hastalığını önleyebilir,
- ✓ Cilt tümörü, periodontal hastalıklar ve kellik tedavisinde kullanılabilir,
- ✓ Meme kanseri tümörlerinin gelişimini durdurur,
- ✓ Kataraktı önlemeye yardımcı olabilmektedir,
- ✓ Bozulmaya uğramış sinir hücreleri hastalıklarının tedavisinde etkili olabilir,
- ✓ Diyabet tedavisinde yararlıdır,
- ✓ Alkolün karaciğere verdiği zararları önleyebilir,
- ✓ Boğaz kanserini önleyebilir,
- ✓ Romatizma iltihaplanmalarını azaltır,
- ✓ Toplam kolesterol seviyelerini azaltır,
- ✓ İskemik (tıkanıklık, pıhtılaşma vb. sonucu) kalp hasarlarını önler.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde ve malzemeler Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Denemelerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Öğütücü (Blender)	Straume
Spektrofotometreler	Shimadzu UV-1601 spectrophometer Molecular Devices SpektraMax M5
Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı)	Heidolph Laborota 4000
Çalkalayıcı su banyosu	Nüve st 402
Isıtıcı magnetik karıştırıcı	Are Velp Scientifica
Isıtıcı çalkalayıcı	Biosan TS-100
Santrifüjler	ALC Centrifuge 4218 Thermo scientific Heraeus multifuge 3SR+
Etüv	Memmert
pH metre	Thermo scientific Orion 3 star
Mikroplaka yıkayıcısı	BioTek Elx50
Buzdolabı	Beko BK 7121 T
Derin dondurucu	Vestel FT-290
Hassas Terazı	Precisa XB 220 A
Vorteks	Velp scientica

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0,2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	2 N’lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 10 kat seyreltilerek hazırlanır.
% 7’lik (w/v) Na ₂ CO ₃ çözeltisi	7 g Na ₂ CO ₃ alınır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf suda 100 mL’ye tamamlanır.
Stok Kateşin (1 mM). Çözeltisi	2.9 mg kateşin az miktarda alkolde çözüldükten sonra son hacim 10 mL’ye tamamlanır.
0,1 M NaOH Çözeltisi	0.100 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim 25 mL’ye tamamlanır.
0,154 M NaCl (Serum Fizyoloji) Çözeltisi	9 g NaCl alınır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 1 litreye tamamlanır.
% 28 (w/v) Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi	28 g trikloroasetik asit alınır bir miktar saf suyla çözümlenerek hacmi 100 mL’ye tamamlanır.
% 20 (w/v) Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi	20 g trikloroasetik asit alınır bir miktar saf suyla çözümlenerek hacmi 100 mL’ye tamamlanır.
2-Tiyobarbütirik Asit (TBA) Çözeltisi	0.1 g NaOH ve 0.1 g 2- tiyobarbütirik asit (TBA) alınır ve son hacim 10 mL’ye tamamlanır.
0,02 M NaN ₃ Çözeltisi	0.13 g NaN ₃ alınır bir miktar saf suyla çözümlenerek PBS ile hacmi 50 mL’ye tamamlanır.
100 µM DPPH Çözeltisi	3.94 mg DPPH bir miktar metanolde çözüldükten sonra son hacim 100 mL metanolla tamamlanır.
0,2 M HCl Çözeltisi	206 µL HCl alınır bir miktar saf suyla çözümlenerek hacmi 10 mL’ye tamamlanır.
10 mM PBS Çözeltisi	217 mg Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ve 61,2 mg NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O alınıp 90 ml %0.9’luk NaCl ile çözümlenip pH 7.4’e ayarlanarak aynı çözeltiliyle son hacim 100 mL’ye tamamlanır.

Tablo 9'un devamı

5 mM CuSO ₄ Çözeltisi	12.47 mg CuSO ₄ .5H ₂ O alınır bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi 10 mL'ye tamamlanır.
Etanol: Etil Asetat Çözeltisi (1:1, v:v)	25 ml etanol ile 25 ml etil asetat karıştırılır.
2,5 M HCl Çözeltisi	2.07 ml stok HCl çözeltisinden alınır bir miktar saf suda çözülerek 10 mL'ye tamamlanır.
10 mM DNPH Çözeltisi	0.1 g DNPH bir miktar 2.5 M HCl çözeltisinde çözüldükten sonra aynı çözeltiyle 50 mL'ye tamamlanır.
20 mM K ₂ HPO ₄ içeren 6 M Guanidin HCl Çözeltisi	0.174 g K ₂ HPO ₄ bir miktar saf suda çözülüp üzerine 27.9 g Guanidin HCl eklenip çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanır.
2 mg/mL stok BSA Çözeltisi	50 mg BSA bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 25 mL'ye tamamlanır.
% 1'lik Sodyum Sitrat Çözeltisi (w:v)	1 g sodyum sitrat bir miktar saf suyla çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
% 0,02' lik DTNB Çözeltisi (w:v)	20 mg DTNB bir miktar %1'lik sodyum sitrat çözeltisiyle çözülüp son hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlanır.
1 mM stok indirgenmiş glutatyon çözeltisi	30 mg GSH bir miktar saf suda çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
3 M Na ₂ HPO ₄ çözeltisi	4.26 g Na ₂ HPO ₄ bir miktar saf suda çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
Lowry A Çözeltisi	10 g Na ₂ CO ₃ 130 mL'de, 0.2 g CuSO ₄ .5H ₂ O 10 mL' de ve 0,1 g Na-K Tartarat 10 ml saf suda çözüldükten sonra üçü karıştırılır.
Lowry B Çözeltisi	5 g SDS 50 mL saf suda çözülür.
Lowry C Çözeltisi	2 g NaOH 50 mL saf suda çözülür.
Lowry Reaktifi	Lowry A, B, C çözeltileri 3:1:1 oranında karıştırılır.
1 mM EDTA içeren 5 mM Tris-HCl çözeltisi	0.372 g Na ₂ EDTA ve 0.788 g Tris-HCl yaklaşık 900 ml saf suda çözülüp pH 7'ye ayarlanarak 1 litreye tamamlanır.
1 mM EDTA ve 0,05 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl çözeltisi	0.372 g Na ₂ EDTA, 7.88 g Tris-HCl ve 2.925 g NaCl yaklaşık 900 ml saf suda çözülüp pH 7'ye ayarlanarak 1 litreye tamamlanır.

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Kimyasal Adı	Satın Alınan Firma	Kimyasal Adı	Satın Alınan Firma
Asetik asit	Merck	Na ₂ EDTA	Merck
DPPH	Sigma	DTNB	Alfa aesar
Etanol	Merck	DNPH	Sigma
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma	Tris-HCl	Merck
HCl	Merck	Guanidin HCl	Sigma
Kateşin	Sigma	Etil Asetat	Merck
Metanol	Merck	NaCl	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck	Na-K Tartarat	Merck
NaOH	Merck	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Merck
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck	K ₂ HPO ₄	Merck
H ₂ O ₂	Merck	İndirgenmiş Glutatyon	Sigma
DMSO	Merck	TBA	Merck
BSA	Sigma	NaN ₃	Merck

2.3. Numunelerin Toplanması ve Özütlerin Hazırlanması

2.3.1. Çay Numunelerinin Eldesi

2010 Şubat ayında Rize Taşlıdere Çay İşleme Fabrikası'ndan yeşil çay ve farklı atıkları, Rize Zihni Derin Çay İşleme Fabrikası'ndan siyah çay ve onun lif atığı temin edildi. Numuneler etüvde düşük sıcaklıkta kurutuldu ve her biri öğütücüde ayrı ayrı parçalanarak toz haline getirilerek ekstraksiyon işlemine hazır hale getirildi.

Elde edilen numuneler Tablo 11'de şu şekilde kodlanmıştır.

Tablo 11. Numune Kodları

Verilen Kod	Numune Adı
YÇYA	Yeşil Çay Yaprak Atığı
YÇGA	Yeşil Çay Gövde Atığı
YÇ	Yeşil Çay
SÇ	Siyah Çay
SÇLA	Siyah Çay Lif Atığı

2.3.2. Çay Özütlerinin Hazırlanması

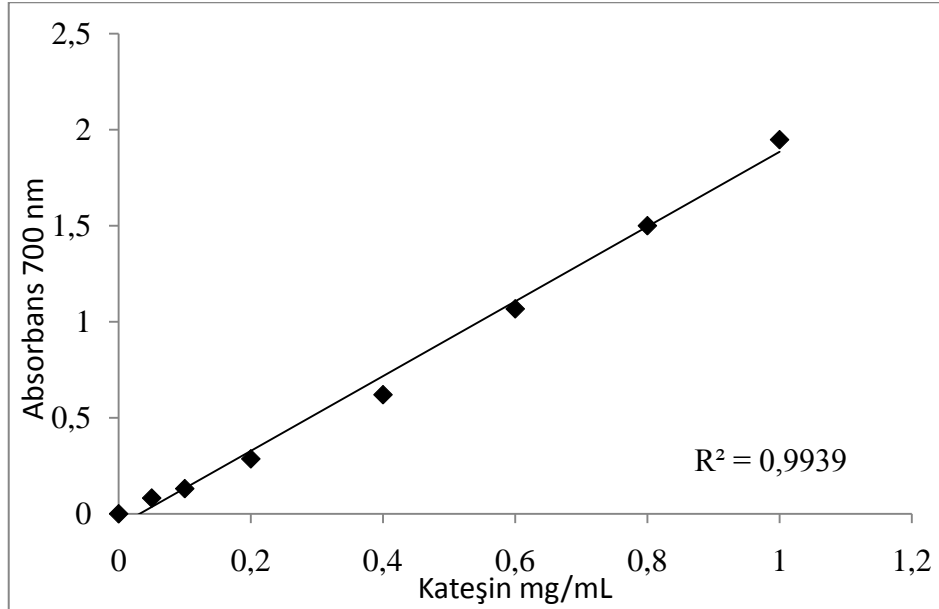
Yapılan literatür araştırmaları sonucu bitki özütleme işleminde kullanılan en verimli çözücülerden ikisinin metanol ve etil asetat olduğu göz önüne alınarak özütleme işlemi bu çözücülerle gerçekleştirildi [87]. Toz halindeki numunelerden 4 gram alınarak önce 50 mL etil asetat çözücüsü kullanılarak +4 °C’de ve manyetik karıştırıcı üzerinde 6 saat özütleme işlemine tabi tutuldu ve süzüntü alınarak tekrar aynı işlem yapıldı. Daha sonra etil asetat çözücüsüyle yapılan işlemlerin aynısı metanol kullanılarak yapıldı ve süzüntüler toplanarak çözücülerini evaporatörde uçuruldu. Elde edilen çamur kıvamındaki kalıntılar Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü laboratuvarında bulunan liyofilizatör ile yoğunlaştırıldı. Özütler DMSO’ da çözülerek sonraki tayinlerde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.4. Özütlerde Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntem, metanol ve etil asetat çözücülerinde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifli ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 700 nm’de maksimum absorbans oluşturur [88]. Özütler içindeki toplam fenol miktarları, bu yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bunun için; öncelikle kateşin standart maddesi kullanılarak 5 farklı konsantrasyonla (1- 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 mg/mL kateşin) Tablo 12’deki gibi pipetleme yapıladıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı ve bu zaman sonunda 700 nm’de köre karşı okuma yapıldı ve Şekil 18’de verilen kalibrasyon grafiği elde edildi. Oluşturulan bu grafikten numunelerin absorbansları standart grafik aralığında olacak şekilde seyreltmeleri yapılarak toplam fenolik içerikleri hesaplandı.

Tablo 12. Polifenol tayini için pipetleme miktarları

	Kör (mL)	Numune (mL)	Standart (mL)
Numune	-	0.05	-
Standart	-	-	0.05
Deiyonize su	2.55	2.5	2.5
0.2 N Folin	0.25	0.25	0.25
Tüpler çalkalandı ve 3 dakika sonra			
% 7 Na ₂ CO ₃	0.75	0.75	0.75
2 saat inkübasyona bırakılır ve 700 nm’de absorbansları okunur.			



Şekil 18. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği

2.5. Antioksidan Tayin Yöntemleri

2.5.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Denemelerde kullanılan DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup çay özütlerinin bu radikalin 100 µM’lık metanolik çözeltisinde radikal temizleme aktivitesi incelenmiştir. Denemelerde Cuendet yöntemi kullanıldı. Elde edilen özütler ve standart (kateşin) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartlar 5 - 10 - 15 - 20 µM’lık; numuneler ise µM kateşin eşdeğer cinsinden 5 farklı

konsantrasyonlarda hazırlandı ve ölçümler mikropilaka üzerinde yapıldı. Eşit hacimde (150 µL) DPPH• çözeltilisi, numune çözeltileri üzerine eklenerek çalkalandı, oda sıcaklığında ve karanlıkta 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için iki paralel çalışıldı. Ayrıca numune/standartın her bir konsantrasyonu için birer kör [(numune/standart + DPPH çözücüsü (metanol))] ve her bir çözücüsü (metanol) için de [kontrol tüpleri (DPPH + numune/standart çözücüsü)] üç paralel çalışıldı. Süre sonunda DPPH•'ın maksimum absorbanst verdiği 517 nm'de absorbanstlar okundu [89]. Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorbanstlara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC₅₀ değerleri µM cinsinden hesaplandı.

2.5.2. Eritrositlerde Anti-Lipit Oksidasyon Aktivitesinin Analizi

2.5.2.1. Eritrosit Paketinin Hazırlanması

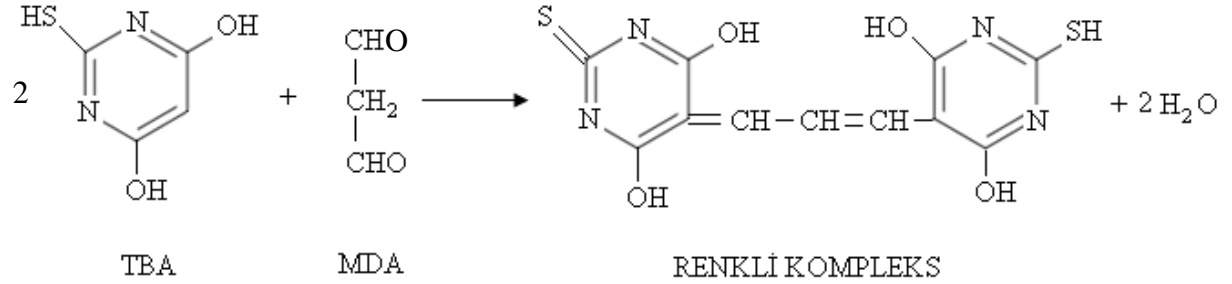
Rize 82. Yıl Devlet Hastanesi Kan Laboratuvarı'ndan alınan tam kanlar öncelikle 2500 rpm'de 10 dak. oda sıcaklığında santrifüjlenerek plazma kısmı atıldı. Daha sonra eritrosit paketi 3-4 kez % 0.9'luk NaCl ile yıkanarak lökosit ve trombosit fazları uzaklaştırıldıktan sonra eritrositlerin aynı hastanenin biyokimya laboratuvarında hemoglobin değerleri ölçüldü.

2.5.2.2. Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması

Reaksiyon ortamının hazırlanmasında Stocks ve Dormandy metodu kullanıldı [90]. Hazırlanan eritrosit paketi hastanede okunan hemoglobin değerine göre son konsantrasyonu 3 g/dL olacak şekilde PBS'li 0,02 M NaN₃ ile seyreltilip, 37 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakılarak stok çözelti hazırlanmış oldu. Hazırlanan çalışma tüplerine 2 mL stok, üzerine çalışma ortamında 100–250–500-1000 µM konsantrasyonlarında çay ve özütlerinin bulunduğu numune grubu, kateşin içeren standart grubu ve sadece PBS ihtiva eden kör tüpü olmak üzere 6 çalışma grubu oluşturuldu ve 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 1 saat ön inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda çalışma ortamlarında son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H₂O₂ ilave edilerek 1 saat daha 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra aşağıdaki şekilde TBARS tayini yapıldı.

2.5.2.3. Eritrosit MDA Miktar Tayini

TBARS, lipidlerin peroksidasyonu sonucunda oluşan ve büyük bir kısmı MDA olan lipid oksidasyonunun kararlı ve en son ürünüdür. Lipit oksidasyonu sonucu oluşan MDA, TBA çözeltisi ile ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak belirlenmesi ile tayin edilir.



Şekil 19. MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon

İnkübasyon süresi bittikten sonra çalışma tüplerinden 900 µL alınarak üzerine 600 µL TCA çözeltisi ilave edildi ve 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından 800 µL süpernatant alınarak üzerine 400 µL günlük taze olarak hazırlanan TBA çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okundu ve MDA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı [90].

$$[\text{MDA}] = (A_{532} - A_{600}) \times 900 = \text{nmol MDA/g Hb}$$

Bulunan MDA miktarlarına karşılık gelen özüt (veya standart) konsantrasyonları grafiğe geçirilerek IC₅₀ değerleri µM cinsinden hesaplandı.

2.5.3. IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

IC₅₀; radikal miktarını veya MDA miktarını yarıya indiren çay özüt miktarıdır. IC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC₅₀ değerini vermektedir. IC₅₀ değeri mg/mL veya µM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

2.5.4. Fraksiyonlaştırılmamış Plazmanın (UFP) Cu⁺² Aracılı Oksidasyonunun İncelenmesi

UFP'nin bakır aracılı oksidasyonu analiziyle diğer bir lipit oksidasyon ürünü olan ve oldukça kararsız özelliğe sahip konjugedien (KD) oluşumu incelendi. Böylece çay özütlerinin hem intraselüler hem de ekstraselüler ortamdaki antilipit oksidasyon kinetiği araştırıldı.

Bu yöntemde sitratlı kan tüplerine alınan kanın santrifüjünden elde edilen plazma kullanıldı. Reaksiyon ortamına son konsantrasyonu 50 µM Cu⁺² olacak şekilde CuSO₄ çözeltisi, 5 µM katasine eşdeğer miktarda ekstrakt ve son konsantrasyonu 100 kat seyreltilmiş olacak şekilde plazma ilave edildi ve son hacimler PBS ile 1 mL'ye tamamlandı. Ayrıca bir de hiçbir antioksidan bileşiğin içine ilave edilmediği sadece plazma ve Cu⁺² bulunan kontrol reaksiyon ortamı hazırlandı. Daha sonra 234 nm'de bütün çalışma gruplarının içerisinde sadece Cu⁺² ve PBS'nin bulunduğu köre karşı her 6 dakikada bir yaklaşık 17 saat boyunca absorbansı okundu. Absorbansa karşı zaman grafiği çizilerek her bir ekstraktın konulduğu reaksiyonun, standartın konulduğu reaksiyonun ve sadece plazmanın bulunduğu reaksiyon ortamında konjugedien oluşumunun bir göstergesi olan t-lag, MDK ve DKH değerleri incelendi [91].

a: Oksidasyon başlangıcındaki ilk absorbans

t-lag: oksidasyon gecikme süresi, dakika(a-b noktaları arasında geçen zaman)

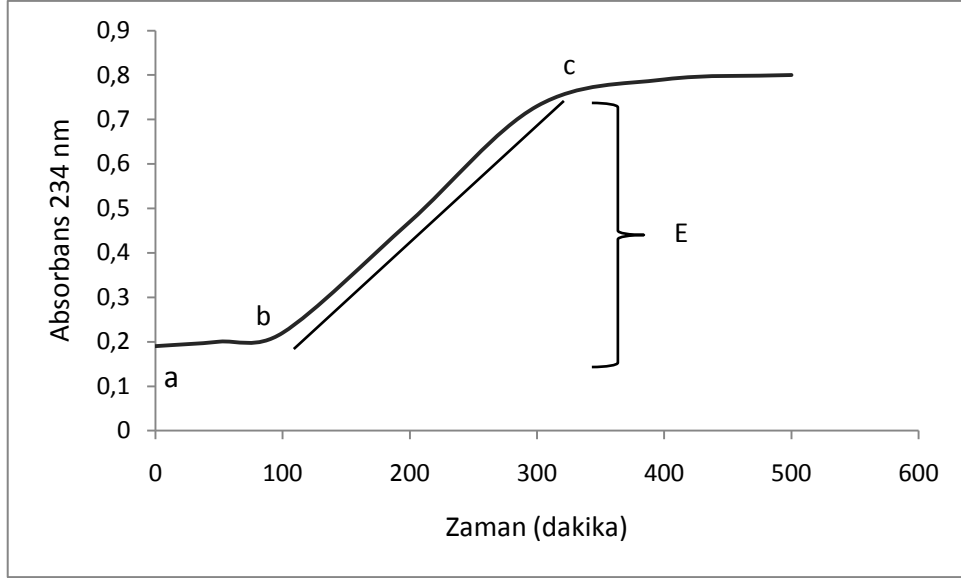
E: b-c noktaları arasındaki eğim (ΔA/ dakika)

E_{234} (Konjugedienin molar absorbtivite katsayısı) = 29500 Lmol⁻¹.cm⁻¹

λ (ışık yolunun uzunluğu) = 1 cm

Dien Konsantrasyon Hızı (DKH) = [(ΔA/dak).10⁶] / (E₂₃₄.λ.prt miktarı) = (nmol/dk/mg prt)

Maksimum Dien Konsantrasyonu (MDK) = [(A_c-A_a).10⁶] / (E₂₃₄.λ.prt miktarı) = (nmol/mg prt)



Şekil 20. Cu²⁺ aracılı plazma oksidasyon kinetiği

2.5.5. Eritrosit Hücre Zarında Anti-Protein Oksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Eritrositlerde anti-protein oksidasyon aktivitesinin izlenmesi; hücre zarının farklı konsantrasyonlardaki çay özütleriyle muamelesini müteakip protein karbonil düzeylerinin belirlenmesiyle gerçekleştirildi.

2.5.5.1. Eritrosit Hücre Zarı Eldesi

Eritrosit hücre zarı (ghost) Marchesi ve Palade'nin geliştirdiği ozmotik şok prosedürüne göre hazırlandı. Bunun için önce Rize Devlet Hastanesi'nden temin edilen tam kan 1800 g'de 10 dak santrifüjlenerek plazması atıldı ve sonrasında 2-3 kez % 0.9'luk NaCl ile yıkanarak trombosit ve lökositler uzaklaştırıldı. Elde edilen kırmızı kan hücreleri hacminin 10 katı kadar 1 mM EDTA içeren 5 mM Tris-HCl çözeltisiyle 15-20 dakika kuvvetle çalkalanarak 25000 g'de 30 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu işlem 2 kez yapıldıktan sonra serbest haldeki hemoglobin kalıntılarını bertaraf etmek için 0.5 M NaCl ve 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl çözeltisi ile 10 dak 25000 g'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Yoğun ve viskoz hemoglobin uzaklaştırıldıktan sonra 1 mM EDTA içeren 5 mM Tris-HCl çözeltisi ile 2 kez daha yıkama yapılarak beyaz görünümde eritrosit hücre zarı elde edildi [92].

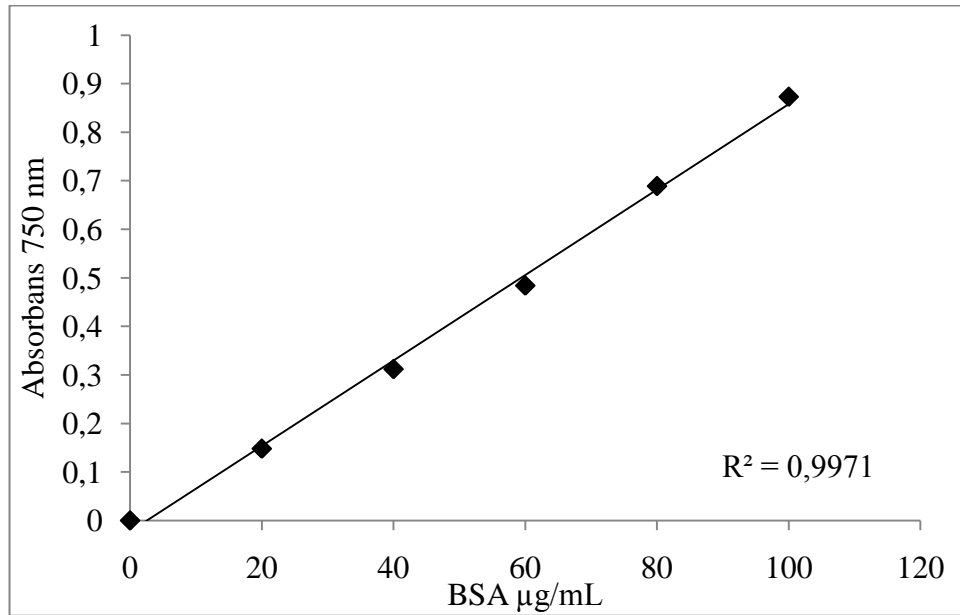
2.5.5.2. Eritrosit Hücre Zarı Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Eritrosit hücre zarı protein içeriği Lowry metoduyla BSA standartı kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi [93]. Bu metotta protein önce alkali bakır çözeltisi ile muamele edilir. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinlerin peptit bağları ile kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgenir. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek oluşan mavi renk 750 nm'de ölçülür. Standart grafiği 100–80–60–40–20 $\mu\text{g/mL}$ 'lik BSA standartı kullanılarak elde edildi ve ölçümler mikropalakada yapıldı. Pipetlemeler Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 13. Protein tayini için pipetleme miktarları

Reaktifler	Kör (μL)	Numune (μL)	Standart (μL)
Saf su	100	-	-
Numune	-	100	-
Standart	-	-	100
Lowry	100	100	100
Oda sıcaklığında 10 dak. bekletilir.			
Folin reaktifi	50	50	50

Oda sıcaklığında 30 dak bekletilir ve 750 nm'de absorbanları okunur.



Şekil 21. Protein tayininde kullanılan BSA standart grafiği

2.5.5.3. Eritrosit Hücre Zarı Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesi

Eritrosit hücre zarı protein karbonil miktarı Levine metoduna göre yapıldı [78]. Elde edilen eritrosit ghostları protein miktarı 0,8 – 2 mg/mL olacak şekilde seyreltildi. Eritrosit ghostları 100 mM'lık H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakıldı ve son hacimde 100 – 250-500 – 1000 µM çay özütleri olacak şekilde ve özüksüz çalışma ortamları hazırlanarak 1 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı konsantrasyonlarda kateşin standardı çalışıldı. İnkübasyon sonunda bütün çalışma grupları test (T) ve kontrol (K) olmak üzere ikiye ayrıldı. Test tüpüne 1 ml 10 mM DNPH, kontrol tüpüne ise 1 mL 2,5 M HCl eklenerek 37 °C'de karanlıkta ısıtmalı çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübasyona bırakılır. Daha sonra bütün çalışma gruplarına 2 mL % 20'lik TCA eklenerek 3500 rpm'de 20 dak. santrifüjlenerek protein pelletleri elde edildi. Süpernatant kısım dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra protein pelletleri etil asetat:etanol (1:1) karışımıyla 3 kez yıkanarak reaksiyona girmeyen DNPH ve lipid kalıntıları uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra elde edilen protein çökelekleri 6 M Guanidin hidrokloritte çözünerek 10 dak. 37 °C'de bekletildi ve karışım santrifüj edilerek süpernatant kısmının 370 nm'deki absorbansı ölçüldü. Test tüpünün absorbansından kontrol tüpünün absorbansı çıkarılarak ve DNPH'in molar absorbtivite katsayısı (22000 M⁻¹cm⁻¹) kullanarak protein karbonil miktarı nmol/mL olarak hesaplandı. Protein içeriği de Lowry metoduyla hesaplanarak karbonil içeriği nmol/ mg protein olarak ifade edildi.

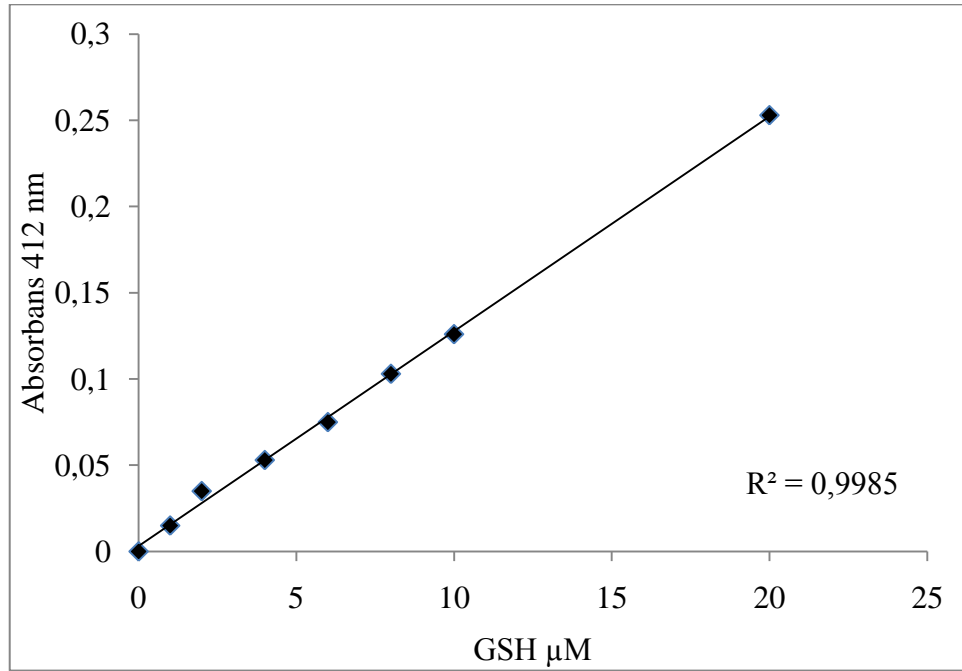
$$\text{Protein karbonil (nmol/mL)} = (A_T - A_K) / 22000 / 10^6$$

$$\text{Protein karbonil içeriği (nmol/ mg protein)} = \text{Protein karbonil (nmol/ mL)} / \text{Protein (mg/mL)}$$

2.5.6. Eritrosit Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Eritrosit glutasyon miktarı Sedlak ve Lindsay protokolü modifiye edilerek belirlendi [94]. Önce 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 20 µM konsantrasyonlarında indirgenmiş glutasyon kullanılarak standart grafiği oluşturuldu ve glutasyon miktarı bu grafiğe göre belirlendi. Eritrosit paketi soğuk suyla 10 kat seyreltilerek hemoliz elde edildi. Daha sonra ortamda 500 µM özüt ve 20 mM H₂O₂ ve bir de kontrol amaçlı özüksüz çalışma grupları hazırlandı ve 1 saat 37 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonunda tüm çalışma gruplarına % 5'lik TCA eklendi ve karışım 5000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan 200 µL ve 250 µL % 0.02'lik DTNB çözeltisi 0.2 M PBS ile 2 mL'ye

tamamlandıktan sonra meydana gelen sarı renk Şekil 22’de verilen standart grafiği üzerinden 412 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü.



Şekil 22. Glutasyon standart grafiği

2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar aritmetik ortalama (\bar{X}) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi ve SPSS 16.0 programı kullanılarak istatistiksel analizi yapıldı. Bütün çalışma gruplarındaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow-Smirnow testi ile değerlendirildi. Çalışma gruplarına ait ilgili parametrelerin anlamlılığı Tek Yönlü Varyans Analizi (One- Way ANOVA) ile çoklu karşılaştırma ise Duncan testine göre yapıldı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri

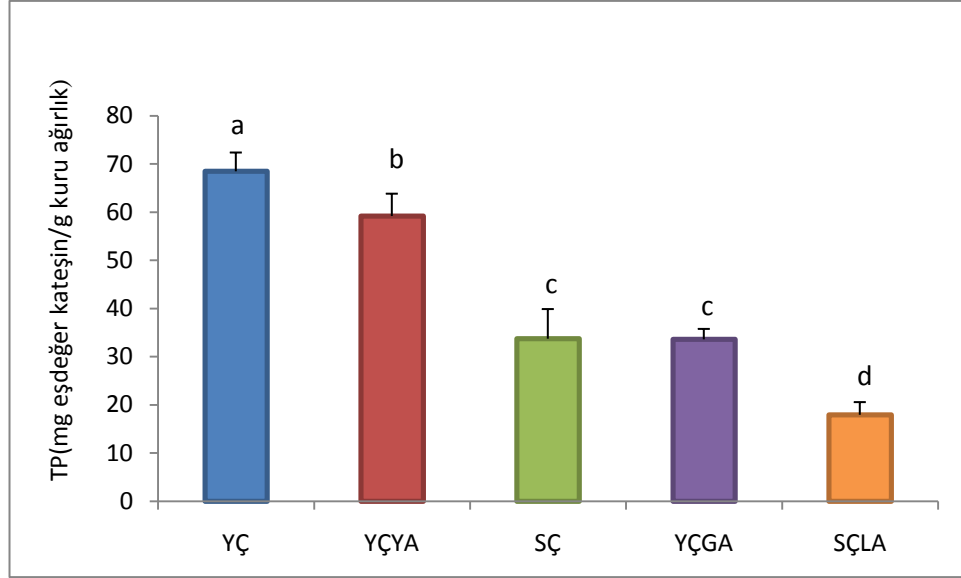
Folin-Ciocalteu yöntemiyle gram kuru ağırlık başına düşen mg kateşin eşdeğer olarak belirlenen fenolik madde miktarları Tablo 14'te verilmiştir. En yüksek fenolik madde muhtevası yeşil çayda gözlenirken siyah çay ve özellikle siyah çayın lif atığında bu içerik en düşük seviyededir.

Tablo 14. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları

Numune (n=15)	TP (mg eşdeğer kateşin/ gram kuru ağırlık)
YÇ	68 ± 3.9 ^a
YÇYA	59 ± 4.6 ^b
YÇGA	34 ± 2.2 ^c
SÇ	34 ± 6.2 ^c
SÇLA	18 ± 2.6 ^d

^{a,b,c,d}: Numuneler arasındaki fenolik bileşim farklılığının $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Yeşil çayın toplam fenolik madde miktarının siyah çaya oranla daha fazla olduğu, yeşil ve siyah çay numunelerinin ise kendi atıklarına göre daha yüksek fenolik madde içerdiği Şekil 23'te grafiksel olarak verilmiştir.



a,b,c,d: Numuneler arasındaki fenolik bileşim farklılığının $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 23. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları

Numunelerin polifenol miktarlarının en yüksekten en düşük düzeye doğru sıralanması şu şekildedir; $YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA$.

3.2. Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

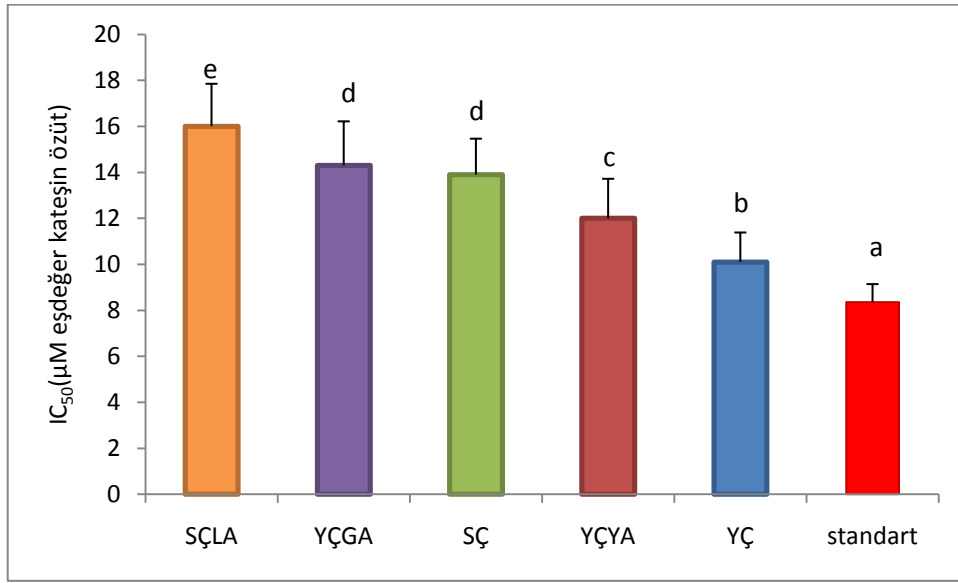
Numunelerde DPPH radikali temizleme yöntemiyle belirlenen örneklerin antioksidan kapasiteleri Tablo 15'te gösterilmiştir. Antioksidan aktivite, numunelerin farklı konsantrasyonları kullanılarak IC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Tablo 15. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri

NUMUNE(n=15)	DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi (IC_{50} μ M eşdeğer kateşin)
STANDART	8 ± 0.8^a
(Kateşin)	
YÇ	10 ± 1.3^b
YÇYA	12 ± 1.7^c
YÇGA	14 ± 1.6^d
SÇ	14 ± 1.9^d
SÇLA	16 ± 1.8^e

a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

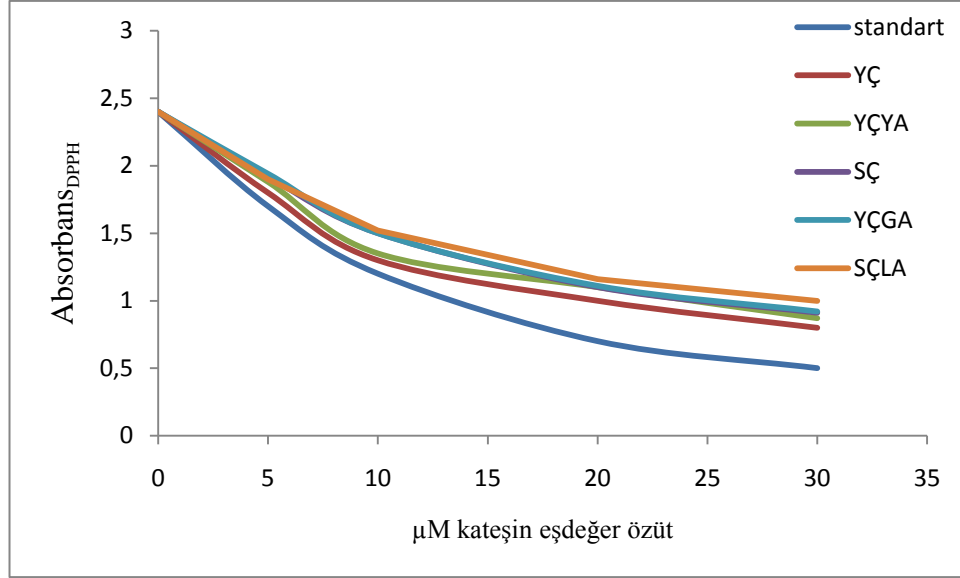
Ayrıca standart olarak kateşin kullanılarak numuneler arasında kıyaslama yapılmıştır. IC₅₀ değeri en düşük olan numunenin DPPH radikali temizleme aktivitesinin en yüksek olduğu göz önünde bulundurulduğunda yeşil çayın siyah çay ve diğer çay atıklarına göre radikal temizleme aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Siyah çay ve yeşil çay gövde yaprağının IC₅₀ değerlerinin ise birbirine istatistiksel olarak fark teşkil etmeyecek kadar yakın olduğu Şekil 24'te görülmüştür. Bu değerlerin numunelerin fenolik içerikleriyle paralellik göstermesi ilgi çekicidir. Numunelerin DPPH radikal temizleme aktivitelerini şu şekilde sıralanmaktadır: standart (kateşin) > YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA.



a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın p < 0,01 düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 24. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri

Numunelerin ve standart olarak kullanılan kateşinin DPPH radikal temizleme aktivitelerinin kinetiğini gösteren ve IC₅₀ değerlerini veren grafik Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 25. Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik

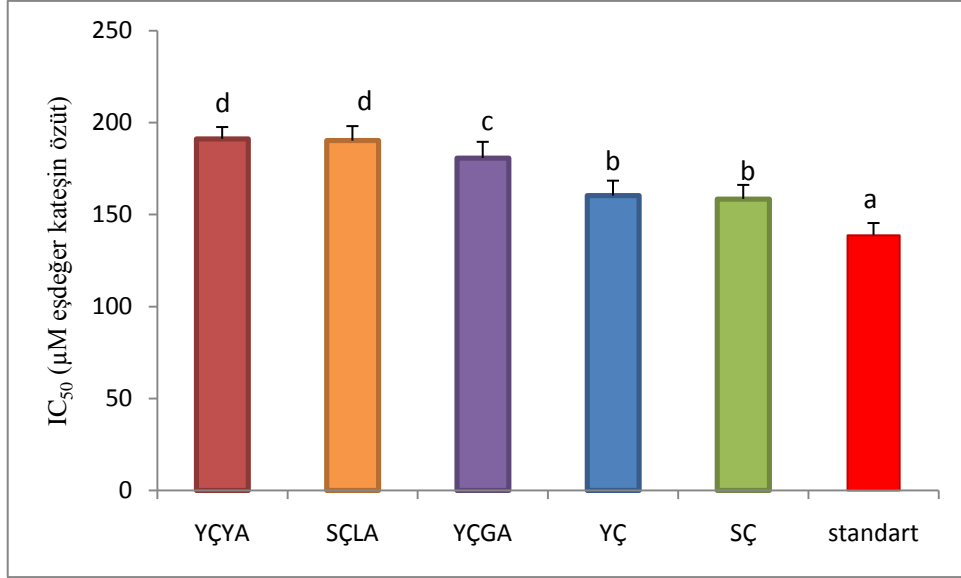
3.3. Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının Anti-Lipit Oksidasyon Aktivitesi

Numunelerdeki anti-lipit oksidasyon aktivitesinin değerlendirilmesi numunelerin IC₅₀ değerleri karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir ve bu değerler Tablo 16'da verilmiştir. Anti-lipit oksidasyon tayininde IC₅₀ değeri en düşük olan numunenin antioksidan kapasitesi en yüksek olduğu göz önüne alınırsa siyah çay ve yeşil çay numunelerinin atıklarına oranla daha etkili olduğu fakat kendi aralarında anlamlı bir fark olmayacak kadar IC₅₀ değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca siyah çay lif atığı ve yeşil çay yaprak atığının IC₅₀ değerleri yani anti-lipit oksidasyon kapasitelerinin birbirine istatistiksel anlamda bir fark yaratmayacak kadar yakın olduğu görülmüştür.

Tablo 16. H₂O₂ aracılı oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerde anti-lipit oksidasyon aktivitesi

NUMUNE (n=12)	Anti-Lipit Oksidasyon Aktivitesi
	(IC ₅₀ μM eşdeğer kateşin)
STANDART (Kateşin)	139 ^a ± 7
YÇ	160 ^b ± 8
YÇGA	180 ^c ± 9
YÇYA	191 ^d ± 6
SÇ	158 ^b ± 8
SÇLA	190 ^d ± 8

a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın p < 0,01 düzeyinde olduğunu gösterir

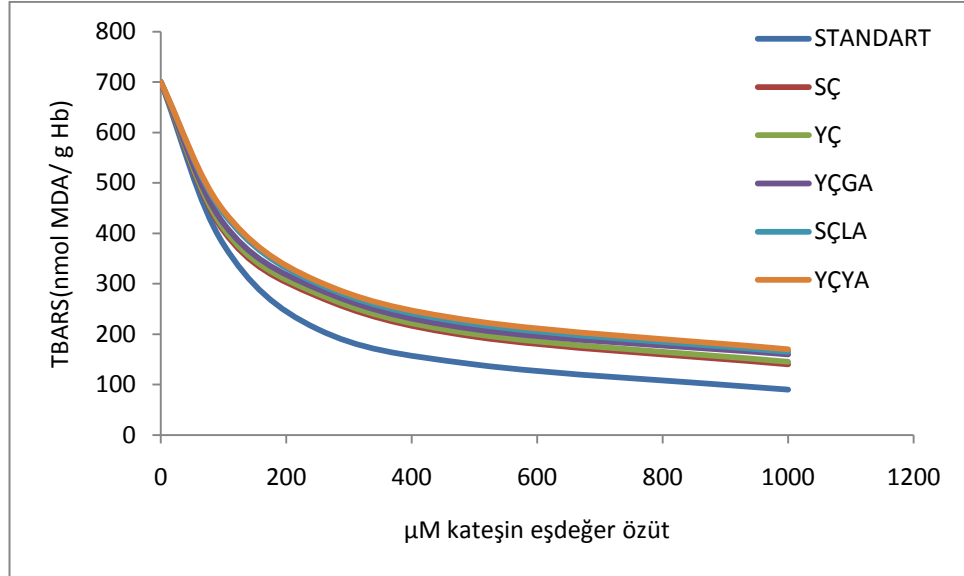


a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir

Şekil 26. Numunelerin anti-lipit oksidasyon aktivitelerinin IC₅₀ değeriyle gösterimi.

Şekil 26’da görülen IC₅₀ değerlerine göre numunelerin lipit oksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri şu şekilde sıralanabilir: standart (kateşin) > SÇ = YÇ > YÇGA > SÇLA = YÇYA.

Çalışma gruplarının anti-lipit oksidasyon aktiviteleriyle ilgili reaksiyon kinetiğinin gösterimi Şekil 27’de verilmiştir.



Şekil 27. Numunelerin anti-lipit oksidasyon kinetiğini gösteren grafik

3.4. Yeşil ve Siyah Çay İle Bunların Farklı Atıklarının Özütlerinin Anti-Protein Oksidasyon Aktivitesi

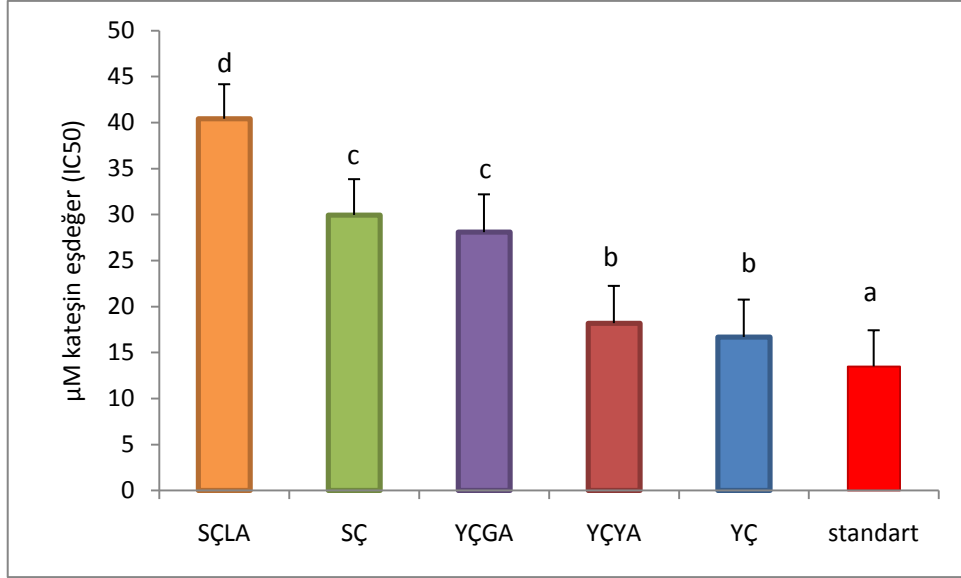
Numunelerin protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karbonil miktarını inhibe etme kapasitesi incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ kateşin eşdeğer olarak ifade edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (5 – 10 – 20 - 30 µM) özütler kullanılarak IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Protein karbonil inhibisyonu hesaplanırken oksidasyon birimi nmol protein karbonil/ mg protein olarak alındı ve farklı özüt konsantrasyonlarına karşılık gelen bu değerlerin grafiği oluşturularak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Numunelerin protein karbonil oluşum inhibisyonunda etkili olduğu IC₅₀ değerleri Tablo 17’de verilmiştir. Buna göre en yüksek anti-protein oksidasyon (en düşük IC₅₀ değeri) aktivitesi yeşil çayda iken en düşük siyah çay lif atığında görülmüştür.

Tablo 17. Numunelerin protein oksidasyon inhibisyonunu sağlayan IC₅₀ değerleri

NUMUNE (n=12)	Protein oksidasyon inhibisyonu(IC ₅₀ µM eşdeğer kateşin)
STANDART (Kateşin)	14 ± 4 ^a
YÇ	17 ± 4 ^b
YÇYA	18 ± 4 ^b
YÇGA	28 ± 5 ^c
SÇ	30 ± 6 ^c
SÇLA	40 ± 7 ^d

^{a,b,c,d}: Numuneler arasındaki farklılığın p < 0,01 düzeyinde olduğunu gösterir.

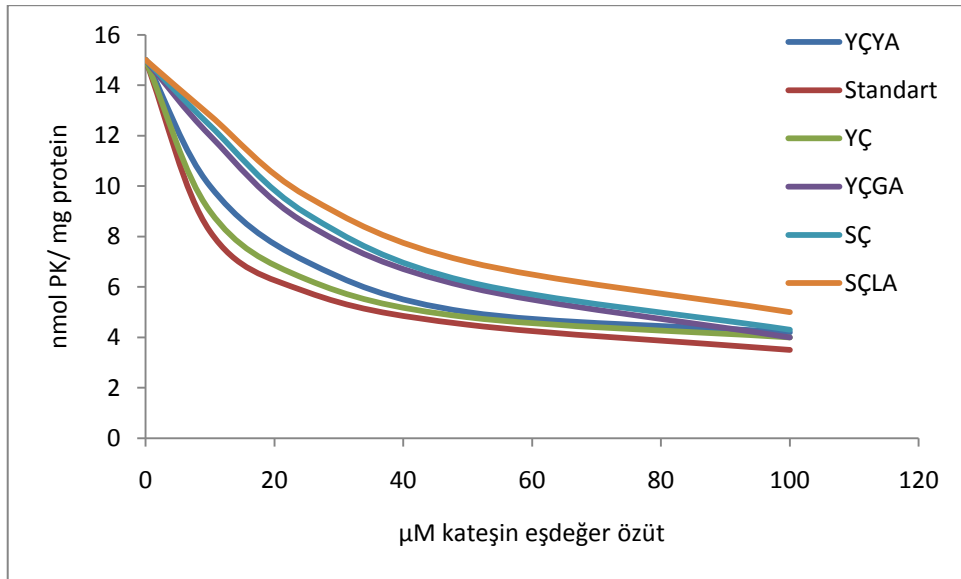
DPPH radikali temizleme aktivitesinde ve anti-lipit oksidasyon aktivitesinde olduğu gibi minimum IC₅₀ değerine sahip olan numune protein oksidasyonu önleme kapasitesi en yüksek olan numunedir. IC₅₀ değerlerine bakıldığında protein oksidasyon inhibe kapasitesi standart (kateşin) > YÇ = YÇYA > YÇGA = SÇLA > SÇ.



a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 28. Numunelerin protein oksidasyon temizleme aktiviteleri (IC_{50} µM kateşin eşdeğer)

Çalışma gruplarının anti-protein oksidasyon aktiviteleriyle ilgili reaksiyon kinetiğinin gösterimi Şekil 29’ da verilmiştir.



Şekil 29. Numunelerin anti- protein oksidasyon kinetiğini gösteren grafik

3.5. Eritrosit Toplam Glutasyon Düzeyleri

Eritrositlerde toplam glutasyon miktarları, H_2O_2 ile oksidatif strese maruz bırakılan hücrelere 500 µM özüt ilave edilerek değerlendirilmiştir. Örneklerin eritrosit glutasyon düzeylerine olan etkisi Tablo 18’de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda beklenildiği gibi intraselüler indirgenmiş potansiyelin en etkili koruması kateşin ilavesi ile görülmüştür.

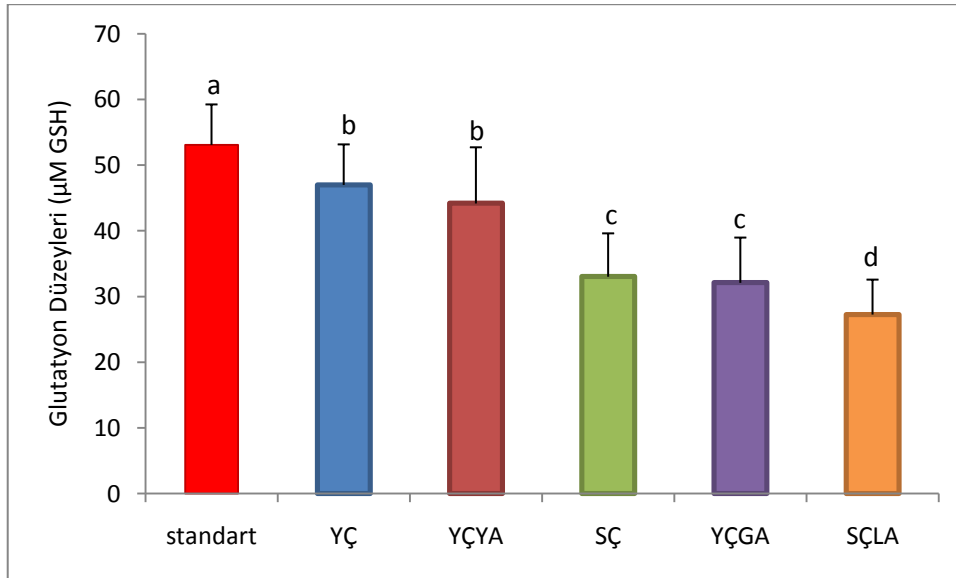
Çay örneklerinde ise diğer parametrelerde gözlenen değişimlere paralel şekilde yeşil çay ve yaprak atığının glutatyon düzeyine koruyucu etkisi belirlenmiştir. Bu değişimin $p < 0.01$ düzeyinde olduğu görülmüştür.

Tablo 18. Çay örneklerinin Eritrosit Glutatyon Düzeylerine Olan Etkisi

NUMUNE (n=8)	Glutatyon Düzeyleri ($\mu\text{M GSH}$)
STANDART(Kateşin)	53 ± 6^a
YÇ	47 ± 6^b
YÇYA	44 ± 9^b
YÇGA	32 ± 7^c
SÇ	33 ± 7^c
SÇLA	27 ± 5^d

a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Eritrosit toplam glutatyon düzeylerine bakıldığında ortamdaki indirgenmiş glutatyonun varlığına sebep olan numune antioksidan kapasitesi en yüksek olarak değerlendirilmektedir. Buna göre, numunelerin antioksidan kapasiteleri Standart > YÇ = YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA şeklinde sıralanabilir. Ayrıca numunelerin eritrosit glutatyon düzeylerine olan etkisi Şekil 30'da verilmiştir.



a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 30. Standart ve farklı çay özütlerinin eritrosit glutatyon düzeyleri

3.6. Yeşil ve Siyah Çay İle Atıklarına Ait Özütlerin Cu^{+2} Aracılı UFP Oksidasyon Kinetiği Üzerine Etkileri

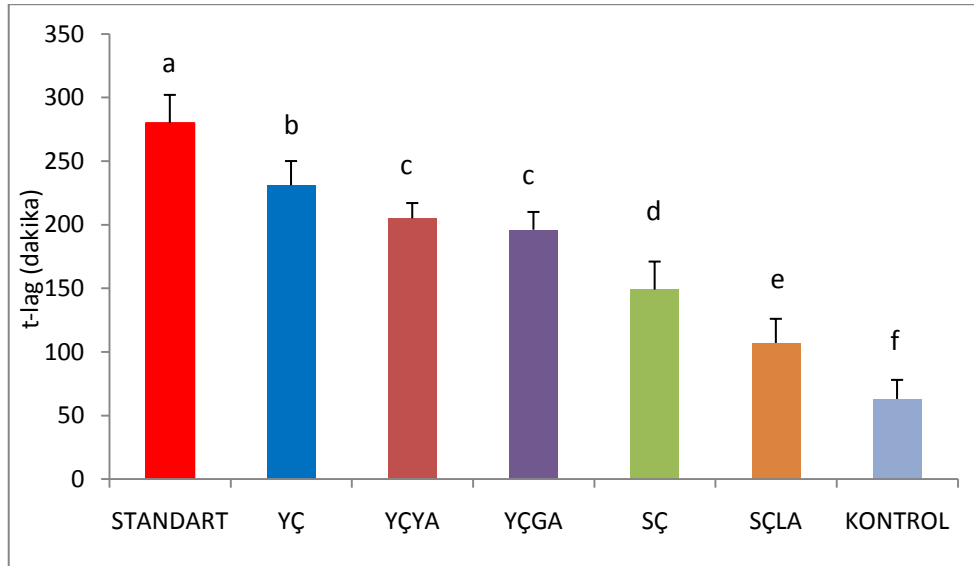
Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarından elde edilen bitki özütlerinin plazmada konjugedien oluşumunun göstergeleri olan t-lag, MDK ve DKH değerleri Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Cu^{+2} Aracılı UFP Okidasyon Kinetiği Üzerine Çay Özütlerinin Etkisi

(n=12)	STANDART	YÇ	YÇYA	YÇGA	SÇ	SÇLA
t- lag (dak)	280±22 ^a	231±19 ^b	205±12 ^c	196±14	149±22 ^d	107±19 ^e
MDK (nmol/mgprt)	7.8±0.4 ^a	6.9±0.2 ^b	7.5±0.4 ^a	9.2±1.2 ^a	6.8±0.4 ^b	7.3±0.7 ^b
DKH (nmol/dk/mgprt)	0.51±0.03 ^a	0.5±0.05 ^a	0.46±0.01 ^a	0.57±0.07 ^c	0.49±0.06 ^b	0.44±0.05 ^b

^{a,b,c,d,e,f}: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

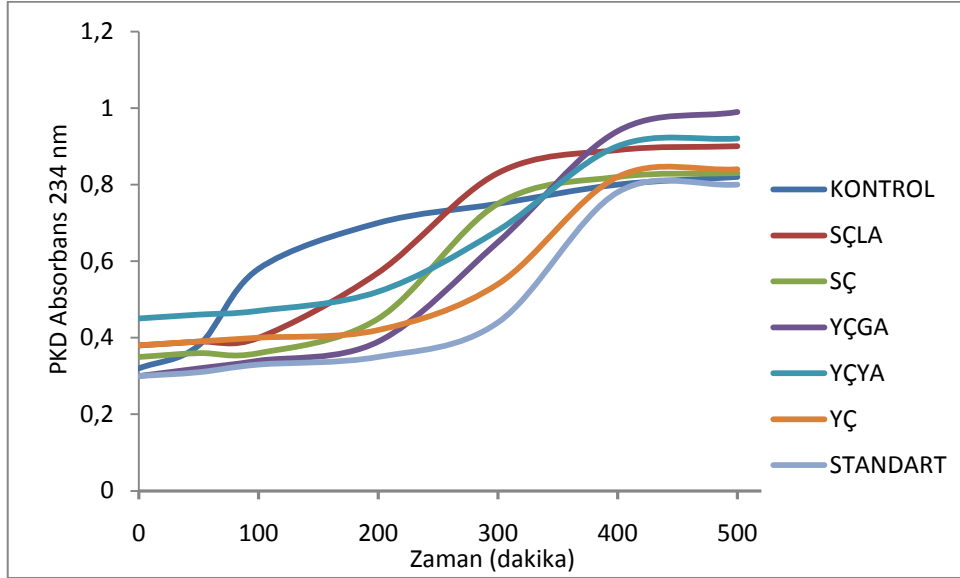
Çalışmada standart olarak kateşin ve kontrol olarak da özüt içermeyen sadece plazma ve Cu^{+2} bulunduran çalışma grubu oluşturuldu. İstatistiksel analiz sonucu YÇYA ve YÇGA arasındaki farklılık hariç bütün çalışma gruplarının t-lag zamanlarının birbirlerine göre değişimlerinin anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p < 0,01$).



^{a,b,c,d,e,f}: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 31. Standart, kontrol ve özütlerin bulunduğu plazmalara ait ortalama t-lag değerleri

t-lag değerlerine bakıldığında çalışma gruplarının plazma oksidasyonunu geciktirme kapasiteleri standart > YÇ > YÇYA = YÇGA > SÇ > SÇLA şeklinde sıralanır. Ayrıca kontrol, standart ve farklı çay numunelerinden elde edilen özütlerin bulunduğu Cu^{+2} aracılı plazma oksidasyon kinetiğinin grafiği Şekil 32’de gösterilmiştir.



Şekil 32. Kontrol, standart ve farklı çay numunelerinden elde edilen özütlerin bulunduğu Cu^{+2} aracılı fraksiyonlaştırılmamış plazmalara ait konjugedien oluşum grafiği

t-lag değerlerine bakıldığında tüm çalışma ortamları arasında $p < 0.01$ düzeyinde anlamlılık derecesi görülmesine rağmen, Maksimum Dien Konsantrasyon ve Dien Konsantrasyon Hızı değerlerinde aynı şekilde anlamlılık düzeyi görülmemiştir. MDK değerlerine bakıldığında standart, YÇYA, YÇGA grupları ile YÇ, SÇ, SÇLA grupları arasında $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı fark olduğu, DKH değerlerine bakıldığında ise standart, YÇ, YÇYA grupları ile SÇ, SÇLA grupları ve YÇGA grubu arasında $p < 0.01$ derecesinde anlamlılık düzeyinde fark olduğu görülmüştür.

Çalışılan bütün parametreler ve sonuçları Tablo 20’de özetlenerek verilmiştir.

Tablo 20. Çalışmada ölçülen tüm parametreler ve sonuçlar

ÖLÇÜLEN PARAMETRELER	STANDART (X±SD)	NUMUNELER				
		YÇYA (X±SD)	YÇGA (X±SD)	YÇ (X±SD)	SÇ (X±SD)	SÇLA (X±SD)
TP (mg eşdeğer kateşin / g kuru ağırlık) (n=15)	-	59.2 ± 4.6 ^a	33.6 ± 2.2 ^b	68.5 ± 3.9 ^c	33.7 ± 6.2 ^d	17.9 ± 2.6 ^e
DPPH Temizleme Aktivitesi (µM eşdeğer kateşin) (n=15)	8.4 ± 0.8 ^a	12 ± 1.7 ^c	14.3 ± 1.9 ^d	10.1 ± 1.3 ^b	13.9 ± 1.6 ^d	16 ± 1.8 ^e
Eritrosit Anti-Lipit oksidasyon aktivitesi (IC ₅₀ µM eşdeğer kateşin) (n=12)	138.8 ± 6.6 ^a	191.2 ± 6.4 ^d	180.7 ± 8.8 ^c	160.3 ± 8.1 ^b	158.5 ± 7.6 ^b	190.2 ± 7.8 ^d
Eritrosit Anti-Protein oksidasyon aktivitesi (IC ₅₀ µM eşdeğer kateşin) (n=12)	13.5 ± 3.9 ^a	18.2 ± 4 ^b	28.1 ± 4.1 ^c	16.7 ± 4.1 ^b	30 ± 3.9 ^c	40.4 ± 3.7 ^d
Eritrosit GSH (µM) (n=8)	53.1 ± 6.2 ^a	44.2 ± 8.5 ^b	32.1 ± 6.9 ^c	47 ± 6.2 ^b	33 ± 6.6 ^c	27.3 ± 5.3 ^d
Fraksiyonlaştırılmamış Plazma Konjuge Dien İndeksleri (n=12)						
t-lag (dak)	280 ± 5.5 ^a	205.7 ± 4.3 ^c	195.7 ± 7 ^c	231 ± 9 ^b	149 ± 8.8 ^d	107 ± 9.9 ^e
DKH (nmol/dk/mgprt)	0.51 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	0.57 ± 0.07 ^c	0.5 ± 0.05 ^a	0.49 ± 0.06 ^b	0.44 ± 0.05 ^b
MDK (nmol/mg prt)	7.8 ± 0.4 ^a	7.5 ± 0.4 ^a	9.2 ± 1.2 ^c	6.9 ± 0.2 ^b	6.8 ± 0.4 ^b	7.3 ± 0.7 ^b

Aynı satır üzerindeki farklı üssü harfler numuneler arasındaki farklılığın p < 0.01 düzeyinde olduğunu gösterir.

4. TARTIŞMA

Serbest radikaller doku hasarı, enflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve yaşlanmayı içine alan pek çok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Tüm radikallere karşı, organizmada enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri bulunmaktadır [70, 71, 77]. Enzimatik olmayan savunma sistemleri içinde endojen ve endojen olmayan antioksidan maddeler bulunmaktadır. Serbest radikalleri uzaklaştırıcı etkisi olan bu antioksidan bileşikler bu nedenle günümüzde son derece önem kazanmıştır. Antioksidanlar, fazlaca oluşan reaktif oksijen radikallerine karşı enzimatik savunma sisteminin yetersiz kalması durumunda organizmayı koruyucu olarak rol oynamaktadırlar. Son zamanlarda bu radikallere karşı koruyucu önlem olarak, doğal ürünler ve antioksidan maddeler giderek önem kazanmaya başlamıştır [64, 73]. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde farmasötik ürünlerin pahalılığından dolayı bazı sağlık problemlerinin çözümünde, bitkisel ürünlerle tedavi alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Türkiye’de halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan ve bilimsel aktivitesi bilinmeyen pek çok bitki bulunmaktadır. Çay, üzüm, elma ve nar gibi tabiatta bulunan birçok bitki, serbest radikal toplayıcı özelliğine sahip antioksidan bileşikler ihtiva ederler [84].

Çay işlenmesi sırasında işlenen ürünün yaklaşık % 5’i atık olarak ortaya çıkmakta çay fabrikalarının, ortaya çıkan bu atıkları çevreye zarar vermeden imha etme konusunda zaman zaman sıkıntı yaşadığı bilinmektedir. Bu atıklar buhar kazanlarında yakılmaktadır. Bu şekilde atıklar ekonomik olarak hiçbir şekilde değerlendirilmeden imha edilmiş olmaktadır.

Yapılan literatür taramaları ve değerlendirmeleri sonucunda [16, 21, 85, 86]; yeşil ve siyah çayın iyi birer antioksidan olduğu belirtilmiş fakat çay üretimi esnasında meydana gelen çay atıklarının onu oluşturan çay ürünü kadar antioksidan potansiyele ne kadar sahip olduğu gerek atık özütlerinde gerekse hücresel ortamda yeterince incelenmediği görülmüştür. Buradan yola çıkarak çay atıklarının da incelenmesinin çay atıklarının değerlendirilmesine farklı bir bakış açısı kazandırabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada; yeşil ve siyah çay ile atıklarına ait özütlerinin eşdeğer kateşinli polifenol içeriğinin belirlenmesinin yanında özütlerin radikal temizleme aktivitesi, lipid ve protein oksidasyonunu inhibe kapasitesi, intraselüler (eritrosit hemolizati) indirgeme

potansiyeline ve ekstraselüler kompartman (fraksiyonlaştırılmamış plazma) oksidasyonuna olan etkisi incelenmiştir.

Bu bağlamda, ilk olarak çaylar ve atıkları kurutulup öğütüldükten sonra özütleme işlemi yapıldı. Özütleme işlemi yapılırken uygun çözücü seçimi için yapılan literatür taramalarında metanol ve etil asetat çözücülerinin çay polifenollerini açısından en uygun çözücüler olabileceği kanısına varıldı. Beevi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan su, metanol, etil asetat, aseton, kloroform, hekzan gibi çözücüler arasında en verimli olan çözücülerin metanol ve etil asetat olduğu görülmüştür [95]. Henning ve arkadaşlarının yaptığı çay ve özütlerinin biyoyararlılığının incelenmesinde yine etil asetat ve metanolün özütleme işlemi için ideal çözücüler olduğu görülmüştür [87]. Özütleme işlemi yapıldıktan sonra numunelerin polifenol muhtevaları spektrofotometrik olarak kateşin eşdeğeri cinsinden incelenmesiyle yeşil çayın siyah çaya oranla daha fazla fenolik madde ihtiva ettiği ve hem yeşil hem de siyah çayın kendi atıklarından daha fazla etken madde içerdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar Henning ve arkadaşlarının çay ve atıklarının fenolik kompozisyonunun araştırılmasında bulduğu sonuçlarla uyumludur. Ayrıca benzer çalışmalarda farklı çay tiplerinin fenolik madde bileşimlerinin incelenmesinde bulunan sonuçlar, mevcut çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir [87, 98]. Yapılan tüm çalışmalarda yeşil çayın polifenol miktarının siyah çaydan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak, siyah çayın işlenmesi esnasında yapısında bulunan flavanollerden teaflavin ve tearubigin gibi sekonder polifenollerin oluşmasıyla flavanol miktarının azalması şeklinde açıklanmaktadır. Bu sebeple çayın işleme yöntemine bağlı olarak fenolik madde kompozisyonu da değişmektedir [19].

Organizmada prooksidan ve antioksidan arasındaki denge sağlıklı yaşam için önemli bir stratejiyi oluşturmaktadır. Sebze ve meyvelerde bulunan polifenolik bileşiklerin sağlık üzerinde meydana getirdiği koruyucu etki onların yapısında bulunan ve serbest radikalleri yakalayıcı özelliğe sahip gruplardan ileri gelmektedir. Bu yüzden çay ve çayın farklı dokularına ait atıklarının radikal temizleme etkisini belirlemek için DPPH radikali temizleme testi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar yeşil çay özütünün en düşük IC₅₀ değerine yani en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca yeşil çay yaprak atığı özütünün radikal temizleme aktivitesinin siyah çay özütünden daha yüksek olması YÇYA'nın piyasada en fazla tüketilen ve ticari değere sahip siyah çaydan daha zengin biyoyararlılığa sahip olması ilgi çekicidir. Yine siyah çay özütünün de diğer atık özütlerinden daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuçlar Vinson ve arkadaşlarının, Benzie ve Strain'in yaptığı benzer çalışmalara göre uyumludur [19,96]. Bunun yanında özütleme işleminde kullanılan çözücünün farklılığının DPPH radikal temizleme aktivitesine etkisi de görülmüştür. Bu bağlamda Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metanollü özütün radikal temizleme kapasitesinin sulu, bütanollü ve hekzanlı özütlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür [97].

Serbest radikallerin biyomolekülleri oksidasyona uğratarak oluşturduğu hasarları hücresele seviyede incelemek için eritrosit hücreleri kullanıldı. Basit hücre yapısına sahip olması, yüksek yoğunlukta oksijen taşıması, zar yapısında bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) bulundurması, özellikle hemoglobin yapısındaki demir gibi geçiş metallere sahip olması ve hasara uğrayan bileşenlerini telafi edememesi gibi özellikler eritrositlerin sıklıkla hücre modeli seçimindeki tercihlerin başlıca nedenleridir [67,70]. Mevcut çalışmada eritrositlere H₂O₂ aracılı oksidatif stres uygulanarak hücresele model oluşturuldu. Hemolizat halindeki eritrositlere uygulanan H₂O₂ sadece okside hemoglobin oluşumuna yol açmaz aynı zamanda Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonunu başlatarak en zararlı radikal olan hidroksil radikalinin (OH[•]) oluşumuna neden olmaktadır. Reaksiyonlar sonucu oluşan radikallerin öncelikli hedefi en indirgenmiş biyomoleküllerden lipit ve lipitlerin yapı taşı olan yağ asitleridir ve böylelikle ÇDYA'nin zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar [90]. Yağ asitlerinin oksidasyonunu gösteren TBARS düzeyleri tayin edilerek çay ve çay atıklarına ait özütlerin lipit oksidasyonunu inhibe edebilme kapasiteleri incelendi. Oksidatif strese uğratılmadan önce eritrositler farklı konsantrasyonda özütlerle preinkübasyon uygulanarak bu özütlerin lipit oksidasyonuna olumlu etkisi IC₅₀ olarak ifade edildi. En düşük IC₅₀ değerine sahip olan özütün anti-lipit oksidasyonu bakımından en etkili olduğu kabul edilmektedir. Yapılan literatür taramaları sonucunda; bitkisel özütlerin hücresele sistem üzerinde oluşturduğu koruyucu etkilerin karşılaştırılmasında tek bir özüt konsantrasyonundan ziyade farklı konsantrasyonlarla elde edilen reaksiyon kinetiğinin daha hassas sonuçlar verdiği tespit edildi [103]. Çay örneklerinin biyoyararlılığının karşılaştırıldığı mevcut çalışmada; lipit ve protein oksidasyonunun izlendiği deneylerde reaksiyon kinetiğinin göstergesi olan "oksidatif etkiyi yarıya düşüren bitki özüt konsantrasyonu"na karşılık gelen IC₅₀ değeri belirlendi ve bu şekilde karşılaştırma yapıldı. Buna göre elde edilen sonuçlar yeşil ve siyah çayın özütlerinin aynı derecede oksidasyon önleme kapasitelerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durumun diğer parametrelerde edilen sonuçlarda yeşil çayın siyah çaya olan üstünlüğü bakımından çelişkili gibi görünmesine rağmen daha önce bu iki çay arasında yapılan

araştırmalara bakıldığında doğal bir sonuç niteliğindedir. Zeyuan ve arkadaşlarının yaptıkları *in vivo* alışmalarda siyah çayın lipit oksidasyonunu nleme kapasitesinin yeşil çaya göre daha yüksek olduğu görülmektedir [98]. Bunun nedeni olarak da siyah çayın üretim aşamasında teaflavin ve tearubugin gibi yüksek antioksidan kapasiteli yapıların oluşması söylenmektedir. Ayrıca Gokulakrishnan ve Liyakath'ın çayın içerdiği en etkili flavanoid olan EGCG'in eritrositler üzerinde TBARS düzeyleri incelenmiş ve farklı konsantrasyonlardaki EGCG'in lipit oksidasyonunu önlediği sonucuna varılmıştır [99]. Çalışılan diğer atık özütlerinin de çok yüksek düzeyde olmasa da anti-lipit oksidasyon aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

İyonize radyasyon, metal iyon-katalizli reaksiyonlar, fotokimyasal prosesler ve enzim katalizli redoks reaksiyonları tarafından oluşturulan reaktif oksijen türleri ile proteinlerin reaksiyonu sonucu protein oksidasyonu oluşmaktadır. Amino asit yan zincirlerinin hidroksil veya karbonil türevlerine modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu ve polipeptid zincirlerinin fragmentasyonu proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının muhtemel sonuçlarıdır. Bunlar arasında protein karbonil grubu içeriği protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirtecidir. Birçok biyolojik zar gibi eritrosit hücre zarı da protein bakımından oldukça zengindir. Bu eşsiz özelliğinden dolayı zar proteinleri reaktif oksijen türlerinin ana hedefi halindedirler [100]. Mevcut çalışmada da eritrosit hücre zarı oksidatif strese maruz bırakılarak meydana gelen protein oksidasyonunun çay ve bunların atık özütleri etkisiyle giderilmesi incelenmiştir. Pandey ve Rizvi'nin kuersetinin protein karbonil oluşumunu engellemesine yönelik araştırmasında oksidan ajan olarak tert-btil hidrojen peroksit kullanılmıştır [102]. Fakat lipit oksidasyonunda ve diğer antioksidan parametreler incelenirken stresör olarak H₂O₂ kullanıldığı için protein oksidasyonu da bu madde kullanılarak oluşturuldu. Özütlerin farklı konsantrasyonları kullanılarak protein oksidasyonuna olan etkileri IC₅₀ değerlerine göre mukayese edildi. Buna göre yeşil çay ve onun yaprak atığının özütü diğer numunelere göre anti-protein oksidasyon aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlar Gokulakrishnan ve Liyakath'ın çayın içerdiği en etkili flavanoid olan EGCG'in sigara içenlerin eritrosit hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada bulunan sonuçlarla uyumludur [99]. Böylece siyah çay ve yeşil çay ile bunların farklı atıklarının eritrosit hücre zarında protein oksidasyon göstergesi olan protein karbonil oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Redükte glutatyon hücre içi ortamın indirgen tutulmasında ve kararlı bir intraselüler ortamın sürdürülmesini sağlayan en önemli antioksidan moleküllerden biridir ve lcm

patogenezinde oksidatif stresin bulunduğu çeşitli hastalıklarda antioksidan savunma mekanizmasının durumu hakkında bilgi edinilmesi açısından iyi bir belirteçtir. Bu nedenle çay ve atık özütlerinin hücre içi indirgeyici güce olan etkisi onların antioksidan kapasiteleri bakımından önemli olacağı düşünülür. Çalışmada Beutler metodu ile Sedlak ve Lindsay metotları modifiye edilerek özütlerin hücre içi indirgeme kapasiteleri ölçülmüştür [78, 94]. Çalışma esnasında reaksiyonun gerçekleşmesinin pH artışı ile doğru orantılı olduğu ve bahsedilen diğer çalışmalarda kullanılan tampon çözeltilerinden daha konsantre tampon çözelti kullanılması gereği hissedilmiştir. Çalışılan diğer parametrelerde olduğu gibi glutasyon seviyeleri de farklı özüt konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ olarak ifade edilecekti fakat özüt konsantrasyonları arasında herhangi bir düzenli ilişki tespit edilemediği için özütlerin tek bir konsantrasyonunun indirgeme potansiyeline olan etkisi incelendi. Çalışma sonuçlarına bakıldığında sonuçların diğer parametrelerde olduğu gibi yeşil çayın diğer numunelere olan üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Sonuçlar Gokulakrishnan ve Liyakath'ın çayın içerdiği en etkili flavanoid olan EGCG'in sigara içenlerin eritrosit hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada bulunan sonuçlarla uyumludur [99]. Ayrıca Konyalıoğlu ve Karamenderes'in civanperçemi (*Achillea*) ve onun farklı dokuları üzerinde yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir [101].

Yeşil çay ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait antioksidatif kapasite hücresel düzeyde irdelendikten sonra aynı değerlendirmenin ekstraselüler ortamda da yapılması için fraksiyonlaştırılmamış plazma stresör olarak kullanılan Cu⁺² ile muamele edildi ve oksidatif strese en hassas biyomolekül olan lipitlerin oksidasyonu izlendi. Lipit oksidasyonunu izleme belirteci olarak da, anlık izlenebilen fakat kararsız olan konjuge dien ürününün oluşmasıyla ilgili indeksler (t-lag, MDK, DKH) seçildi. Plazmanın oksidasyona hassasiyeti, özellikle bileşiminde bulunan lipoproteinlerden kaynaklanmaktadır. Albümin gibi bazı plazma proteinleri gerek radikal toplayıcı özelliğinden gerekse geçiş metalleri için şelatör olarak iş görmesinden dolayı en etkin antioksidan bileşenlerden biri olarak kabul edilir [91]. Antioksidanların oksidasyona hassasiyeti engellemesini değerlendirmek üzere gerçekleştirilen çalışmalarda; işlenmemiş plazmanın izole edilmiş lipoproteinlere göre bazı avantajlara sahip olduğu bildirilmektedir. Özellikle LDL izolasyonu işlemi; plazmada yer alan ve suda çözünen antioksidatif bileşenlerin (albümin, serüloplazmin, transferin, askorbat, ürat ve bilirubin gibi) uzaklaştırılmasına neden olduğu belirtilmektedir. Yine lipoprotein izolasyonunun bitki ekstraktlarda bulunan bazı glikokonjuge halindeki hidrofilik flavonoidlerin etkilerinin gösterilmesini engelleyeceği

ileri sürülmektedir [91]. Ölçülen diğer parametrelerle uyumlu olarak yeşil çay özütünün plazma oksidasyonunu geciktirmesini gösteren t-lag değeri siyah çay ve diğer özütlere göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Sonuçlar Benzie ve Strain'in içlerinde yeşil ve siyah çayın da bulunduğu birçok bitkisel çay üzerinde plazma oksidasyonunu geciktirici etkisinde bulunduğu sonuçlarla eşdeğerdir [96]. T-lag zamanı çalışma ortamlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen Dien Konsantrasyon Hızı ve Maksimum Dien Konsantrasyon sonuçları arasında bu uyum ve anlamlılık görülmemiştir.

Sonuç olarak, yeşil ve siyah çay ile onların farklı atıklarına ait antioksidan etkisi hem hücre içi ortamda hem de hücre dışı sıvı ortamda incelenmiştir. İndirgeme kapasite gücüne paralel şekilde yeşil çay ve onun yaprak atığına ait antioksidan etkinin piyasada daha çok tüketim yoğunluğuna sahip olan siyah çay kadar hatta çalışılan bazı parametrelerde daha fazla koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çay atıklarının özellikle yeşil çay atığının hücresel sistemlerde benzer biyoyararlı etkiye yol açtığından işlenerek tüketilen ürün haline getirilmesi, bölgemizde atıl halde duran bu atıkların ekonomik değere haline getirebileceğini göstermektedir. Böylelikle, sınırlı ekonomik girdiye sahip mevcut yöre için önemli bir ekonomik değer olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmaya benzer araştırma olmamasının mevcut bulguların orjinalitesini artırdığı söylenebilir.

5. SONUÇLAR

1. Numuneler arasında polifenol miktarı en fazla olan yeşil çay, en düşük olan ise siyah çay lif atığı olduğu görülmüştür.
2. Yeşil çay ve atıkları yüksek radikal toplama aktivitesine sahipken siyah çay ve onunun lif atığı daha düşük radikal temizleme potansiyeline sahiptir.
3. Eritrositlerde lipit oksidasyon seviyesinin göstergesi olan MDA düzeyleri çalışma ortamına ilave edilen özüt konsantrasyonlarıyla anlamlı şekilde değişmiştir. Bu şekilde bulunan yeşil çay ve siyah çayın IC₅₀ değerleri birbirine yakın fakat her iki numune atıklarına göre daha etkili anti-lipit oksidasyon etkisine sahiptir.
4. Eritrosit hücre zarında protein oksidasyon göstergesi olan protein karbonil inhibisyon kapasitesi YÇ = YÇYA > YÇGA = SÇLA > SÇ şeklindedir.
5. Eritrosit hücre içi indirgeme potansiyelinin göstergesi olan glutatyon düzeyleri çalışma ortamlarına göre YÇ = YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA şeklindedir.
6. Çay ve atıklarının fraksiyonlaştırılmamış plazmadaki oksidasyonu engelleyici potansiyelini değerlendirmek için konjugedien oluşumunu geciktiren zaman t-lag değeri belirlendi ve en büyük değer yeşil çay numunesi içeren çalışma ortamında görüldü. Çalışma ortamlarına göre YÇ > YÇYA = YÇGA > SÇ > SÇLA şeklinde sıralanmaktadır.

6. ÖNERİLER

1. Her bir özütün CAT, SOD, GR, GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerine etkisi incelenerek çalışma gruplarının antioksidan kapasiteleri daha sağlıklı karşılaştırılabilir.
2. Numunelerin hücrede vitamin düzeylerine olan etkisi araştırılarak özütlerin antioksidan etkinliği mukayese edilebilir.
3. HPLC kullanılarak çay özütlerinin içerdiği polifenollerin çeşitleri ve bunların miktarları tayin edilebilir.
4. Mevcut çalışmada özütlerin lipit ve protein oksidasyonunu inhibe kapasiteleri incelenmiştir, bunların yanında oksidatif strese uğratılan karbohidratlar ve nükleik asitler üzerinde de oluşan hasarı inhibe kapasiteleri incelenebilir.
5. Aynı çalışma ratlar üzerinde gerçekleştirilebilir ve böylece *in vivo* şartlarda elde edilecek bulgular sayesinde mevcut sonuçların geçerliliği daha sağlıklı sorgulanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Halliwell, B., Grootveld, M. The Measurement of Free Radical Reactions in Humans, Some Thoughts for Future Experimentation. Febs Lett., (1987) 213:9-14.
- [2] Borek, C., Radiation and Chemically Induced Transformation: Free Radicals, Antioxidants and Cancer. Br. J. Cancer, (1987) 55:74-86.
- [3] Kalra, J., Chaudhary, A.K., Massey, K.L., Prasad, K. Effect of Oxygen Free Radicals, Hypoxia and pH on The Release of Liver Lysosomal Enzymes. Mol. Cel. Biochem., (1990); 94:1-8.
- [4] Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Soul, R.L., Mccard, J.M., Harman, D. Oxygen radicals and human disease. Annal. Intern. Med., (1987) 107:526-545.
- [5] Halliwell, B. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. Med. Bio., (1984) 62:71-77.
- [6] Yavuzer, S., Serbest oksijen radikallerinde karşı savunma sistemleri, Hücre-II. Oksijen Stres ve Hücre Hasarı, Tıpta Temel Bilimler Okulu, Kızılcahamam. 1993.
- [7] Cheeseman K.H., Slater, T. F., An introduction to free radical biochemistry, Brit. Med. Bull., (1993) 49, 481-493.
- [8] Kalra, J., Chaudhary, A.K., Massey, K.L., Prasad K. Effect of Oxygen Free Radicals, Hypoxia and pH on The Release of Liver Lysosomal Enzymes. Mol. Cel. Biochem., (1990) 94:1-8.
- [9] Cross, C.E., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mc Cord, J.M. and Harmon, D., Oxygen radicals and human disease, Ann. Intern Med., (1987) 107, 526-545.
- [10] Feeman, B.A., Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest., (1982) 47:412-26.
- [11] Bast, A., Haenen, G.R., Van den Berg, R., Van den Berg, H., Antioxidant effects of carotenoids. Int. J. Vitam. Nutr. Res., (1998) 68:399-40.
- [12] Spallholz Je.Slenium And Glutation Peroxidase: Essential Nutrient And Antioxidant Component Of The Immune Systems. Adv. Exp. Med. Biol., (1990) 262:145-58.
- [13] Ivor E. Dreosti; Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine; Nutrition, Volume 16, Issues 7-8, (2000) 692-694.
- [14] Wollgast, J. and Anklam, E., Rewiew on Polyphenols in Theobroma cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. Int., (2000) 33, 423-347.
- [15] Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H., Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Various Tea Extracts. J. Agric. Food Chem., (1997) 46:3875-3878.

- [16] Zeyuan, D., Bingyin, T., Xiaolin, L., Jinming, H., and Yifeng, C., Effect of Green Tea and Black Tea on the Blood Glucose, the Blood Triglycerids, and Antioxidants in Aged Rats. J. Agric. Food Chem., (1998) 46: 3875-3878.
- [17] Langley, S., Evans, C., Consumption of Black Tea Elicits an Increase in Plasma Antioxidant Potential in Humans. Int. J. Food Sci. Nutr., (2000a). 51: 309-315.
- [18] Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H., Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Various Tea Extracts. J. Agric. Food Chem., (1997) 46:3875-3878.
- [19] Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Tea Phenols: Antioxidant Effectiveness of Teas, Tea Components, Tea Fractions and Their Binding With Lipoproteins. Nutr. Res., (1998) 18: 1067-1075.
- [20] Yang, C.S., Landau, J.M., Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. American Society for Nutritional Sciences, (2000) 130: 2409-2412.
- [21] Langley, S., Evans, C., Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using the Ferric Reducing Power (FRAP) Assay. Int. J. Food Sci. Nutr., (2000b) 51: 181-188.
- [22] Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A. Pesticides and oxidative stress: a review. Med. Sci. Monit., (2004). 10:141-147.
- [23] Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease Free radicals and tissue injury. Lab. Invest., (1982). 47(5): 412-423.
- [24] Halliwell, B., Hoult, J.R., Blake, D.R. Oxidants inflammation and anti inflammatory drugs. Faseb J., (1988) 2:2867-2873.
- [25] Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. Am. J. Med., (1991) 91:14-22.
- [26] Seitz, R., Ueno, H., Worrall, S., Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies. Free radic. Biol. Med., (2002) 32(8): 683-687.
- [27] Janssen, Y.M.W., Houten, B.V., Borm, P.J.A., Mossman, B.T Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. Lab. Invest., (1993) 69:261-274.
- [28] Sinclair, A.J., Barnett, A.H., Junee, J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. British J. Hosp. Med., (1990) 43:334-344.
- [29] Yagi, K. Lipid peroksidase and related radicals in clinical medicine (in) Free Radicals in Diagnostic Medicine. D Armstrong, Plenum Press, New York, (1994) pp. 17-27.
- [30] Seven, A., Candan, G. Radikal ve Lipid Peroksid Düzeyini Artıran Etkenler. Biyokimya Dergisi, (1995) 4:43-56.
- [31] Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya s.45 1995.
- [32] Halliwell, B. Free radicals and antioxidant: Nutr. Rev., (1994). 52:253-265.
- [33] Sodergen, E. Lipid peroxidation *in vivo*. Uppsala University. Uppsala, (2000) s.61.
- [34] Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K., Huang, J.C., Wang, L.H., Wu, S.H., Hou, L.A., Ma, H., Tsai, L.Y. Superoxide anion radical, lipid peroxides

- and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. Clin. Chim. Acta., (2005) 25:175-181.
- [35] Stahl, W., Sies, H. Introduction: Reactive oxygen species. Res. Monogr., (2002) 1-2.
- [36] Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. Am. Heart J., (1998) 135:115.
- [37] Kılınc K, Kılınc A. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Med. J., (2002); 33(2): 110-118.
- [38] Başağa, H.S. Biochemical aspects of free radicals. Biochem. Cell Biol., (1990) 68: 989- 998.
- [39] Liochev, S., Fridovich, I. The Haber-Weiss Cycle 70 Years Later: An Alternative View. Redox Rep., (2002); 7(1): 55-7; Author Reply 59-60.
- [40] Thomas, J.A. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stres. Toxicology, (1999) 53(2-3):269-76.
- [41] Aikens, J., Dix, T. Perhydroxyl Radical İnitiated Lipid Peroxidation. The Role Of Fatty Acid Hydroperoxides. J. Biol. Chem., (1991); 266(23): 15091 -8.
- [42] Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology Of Disease: Free Radicals And Tissue İnjury. Lab. Invest., (1982) 47: 412-426.
- [43] Bicker, G. Nitric oxide: An unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroid insect. Arch. Insect Biochem., (2007) 48:100-110.
- [44] Bredt, D.S., Hwang, P.M., Synder, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. Nature, (1990) 347:768-770.
- [45] McCormick, M., Denning, G.M., Reszka, G.M., Bilski, P., Buettner, G.R., Rasmussen, G.T., Rallsback, M.A., Britigan, B.E. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. Biochem. J., (2000) 350:797-804.
- [46] Kargın, F., Fidancı, U.R. Böbrek hastalıklı köpeklerde antioksidatif metabolizma. Turk J. Vet. Anim. Sci., (2001) 25:607-613.
- [47] Halifeoğlu, İ., Canatan, H., Üstündağ, B., İlhan, N., İnanç, F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. Cell Biochem. Funct., (2000) 18(4):263-267.
- [48] Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats. Turk J. Med. Sci., (2001) 31:199-203.
- [49] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W. Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper'ın Biyokimyası, 24. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul (1996).
- [50] Halliwell, B., Chirico, S., Lipid Peroxidation: İts Mechanism, Masurement, And Significance. Am. J. Clin. Nutr., (1993) 57, 715-725.
- [51] Uchida K.: Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radical Bio. Med., (2000) 28, 1685–1696.

- [52] Esterbauer, H., Wag, G., Puhl, H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br. Med. Bull., (1993) 49(3): 566-76.
- [53] Uzun, K., Vural, H., Öztürk, T., Özer, F., İmecik, İ. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. East. J. Med., (2000) 5(2):48-51.
- [54] Shacter, E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab. Rev., (2000) 32:307-326.
- [55] Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic. Biol. Med., (1999) 27:1151-1163.
- [56] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini D., Milzani, A., Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress . Clin. Chim. Acta., (2003) 329:23-38.
- [57] Stadtman, E.R., Levine, R.L. Protein Oxidation. Ann. N. Y. Acad. Sci., (2000) 899:191-208.
- [58] Bindoli, A., Rigobello, M.P. Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. Meth. Enzymol., (2002) 347:307-316.
- [59] Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. Meth. Enzymol., (2002) 348:260-270.
- [60] Dean R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. Biochem. J., (1997) 324:1-18.
- [61] Alderman, C.J.J., Shah, S., Foreman, J.C., Chain, B.M., Katz, D.R. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. Free Radic. Biol. Med., (2002) 32:377-385.
- [62] Berlett, B.S., Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem., (1997) 272:20313- 20316.
- [63] Requena, B.S., Levine, R.L., Stadtman, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. Amino Acids, (2003) 25: 221-226.
- [64] Seven, A., Candan, G.: Antioksidan Savunma Sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Derg., (1996) 27, 41 -50.
- [65] Marklund, L.S., Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines, J. Clin. Invest., (1984) 74, 1384-1398.
- [66] Costello, F.G. and Webber, A. White cell function in Down's syndrome: Increased enzymatic antioxidative defense is accompanied by decreased superoxide anion generation in blood, Hereditas, (1990) 113, 73-75.
- [67] Gaetani, F.G., Galino, S., Canepa, L., Ferraris, M.A., Kirkman, N.H. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes, Blood, (1989) 73, 334-339.
- [68] Efe, H., Hiperlipoproteinemililerde Plazma, Eritrosit, Lenfosit ve Nötrofil Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Lipid Peroksidasyonu ve Çeşitli Lipid Parametreleriyle ilişkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1996.

- [69] Gözükara, E.M. Biyokimya. Evin Matbaası, İstanbul, 1997.
- [70] Horton, A.A., Fairhurst, S. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. CRC Crit. Rev. Tox., (1987) 18:27-69.
- [71] Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S., Meydani, M., Mille, R., Cannon, J.G., Morrow, F.D., Rocklin, R., Blumberg, J.B. Vitamin E supplementation enhances cell mediated immunity in healthy elderly subjects. A. J. Clin. Nutr., (1990) 52:557-563.
- [72] Cemeroglu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları (2001) 76-78.
- [73] Tosun, İ. ve Karadeniz, B., Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20, 78-83.
- [74] Çimen, Y., ve Burak, M. Flavonoids and Their Antioxidant Properties, T. Klin. J. Med. Sci., (1999) 19, 296-304.
- [75] Dillard, C.J. ve German, J.B., Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health, J. Sci. Food Agric., (2000) 80, 1744-1756.
- [76] Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C. Bazı Bitki Ekstraksiyonlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması, Tr. J. Botany, (1994) 18, 117- 122.
- [77] Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Yagi, K., Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbuturic Acid Reaction, Anal. Biochem., (1979) 95, 351-358.
- [78] Levine, R., Garland, D. And Oliver, C. Determination of carbonyl content of oxidatively modified proteins. Meth. Enzymol., (1990) 186, pp. 464-478.
- [79] Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med., (1963) 61:882-888.
- [80] Oyaizu, M., Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Jap. J. Nutr., (1986) 44, 307-315.
- [81] Slinkard, K. and Singleton, V. L., Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., (1977) 28, 49-55.
- [82] Cuendet, M., Hostettmann, P. ve Potterat, O., Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Acta., (1997) 80, 1144-1152.
- [83] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, (2005) 39, 9, 949-961.
- [84] Çekil, F., Çay (*Camellia sinensis*); içeriği, sağlık üzerindeki koruyucu etkisi ve önerilen tüketimi., Türkiye Klinikleri J. Med. Sci., (2006), 26:642-648.
- [85] Chen, H., Qu, Z., Fu, L., Dong, P., Zhang, X., Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3-polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea, J. Food Sci., (2009) 74(6):C469-74.
- [86] Graham, H.N., Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry., Prev. Med., (1992) 21(3):334-50.

- [87] Henning, S. M., Nicolas, H. L., Yantao, N., Rosario, R. M., Hejing, W. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement, Am. J. Clin. Nutr., (2004) 80: 1558-64.
- [88] Slinkard, K. and Singleton, V. L., Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, Am. J. Enol. Viticult., (1977) 28, 49-55.
- [89] Cuendet, M., Hostettmann, P. and Potterat, O., Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Acta., (1997) 80, 1144-1152.
- [90] Stocks, J., Dormandy, T. L., The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide, British J. Hamatol., (1971) 20, 95-111.
- [91] Spranger, T., Finckh, B., Fingerhut, R., Kohlschütter, B. U. and Kontush, A., How differnt constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper, Chem. Phys. Lipids, (1998) 91, 39-52.
- [92] Marchesi, V.T. and Palade G.E., The Localization of Mg-Na-K-Activated Adenosine Triphosphatase on Red Cell Ghost Membranes, J. Cell Biol.,(1967) 35.
- [93] Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., (1951) 193:265-275.
- [94] Sedlak, J., and Lindsay, R.H., Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, Anal. Biochem., (1968) 24;25(1):192-205.
- [95] Beevi, S.S., Narasu, M.L., Govda, B.B., Polyphenolics Profile, Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Leaves and Stem of *Raphanus sativus* L., Plant Food Hum. Nutr., (2010) 65(1): 8-17.
- [96] Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T. Total Antioxidant Capacity of Teas By The Ferric Reducing/Antioksidant Power Assay. J. Agric .Food Chem., (1999) 64: 633-636.
- [97] Lee, S.E., Ju, M.E. and Kim, J.H., Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root, Exp. Mol.Med., (2001) 33(4), 263-268.
- [98] Zeyuan, D., Bingyin, T., Xiaolin, L., Jinming, H., and Yifeng, C., Effect of Green Tea and Black Tea on the Blood Glucose, the Blood Triglycerids, and Antioxidants in Aged Rats. J. Agric Food Chem., (1998) 46: 3875-3878.
- [99] Gokulakrishnan, A., Liyakath, A. R. A., Cigarette smoke-induced biochemical perturbations in human erythrocytes and attenuation by epigallocatechin-3-gallate tea catechin, Pharmacol. Rep., (2010) 62; 891-899.
- [100] Topcuoğlu A., Uzun H, Balcı, H., Karakuş, M., Çoban, I., Altuğ, T., Aydın, S., Topcuoğlu, D., Çakatay, U. Effects of estrogens on oxidative protein damage in plasma and tissues in ovariectomised rats. Clin. Invest. Med., (2009) 32(2):133–43.
- [101] Konyalioglu, S., Karamenderes, C. The protective effects of *Achillea* L. Species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. J. Ethnopharmacol., (2005) 102: 221-227.
- [102] Pandey, K. B., Rizvi, S. I. Protection of protein carbonyl formation by quercetin in erythrocytes subjected to oxidative stres. Med. Chem. Res., (2010) 19:186-192.

- [103] Cheng, H.Y., Lin, C., Yu, K., Yang, C.M. and Lin C.C. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Terminalia chebula*. Biol. Pharm. Bull., (2003) 26(9) 1331-1335.

ÖZGEÇMİŞ

11.01.1985 tarihinde Afyonkarahisar'ın İhsaniye ilçesinde doğdu. İlköğrenimini İzmir Çiğli Selim Diniz İlköğretim okulunda tamamladı. Ortaöğrenimini ise Afyonkarahisar Çay Endüstri Meslek Lisesi'nde okul birinciliği ile tamamladı. 2004 yılında Kocatepe Üniversitesi Banaz Meslek Yüksekokulu'nu bitirdi. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü birincilikle bitirdi. 2008 yılında Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladı.