

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇAY ATIKLARININ BAZI ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN ERİTROSİTLERDE İNCELENMESİ**

MERVE HÜNER

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HÜSEYİN AVNİ UYDU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2015




T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

ÇAY ATIKLARININ BAZI ANTIÖKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN ERİTROSİTLERDE İNCELENMESİ

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU danışmanlığında, Merve HÜNER tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11 /12 /2015 tarihinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU	
Üye :	Prof. Dr. Hasan EFE	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Özlem SARAL	

Doç. Dr. Hüseyin YILMAZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma ile akademik hayatıma attığım ilk adımı tamamlarken, zaman zaman zorlandığım bazen oldukça keyif aldığım ve her zaman hayata ve bilime dair bilgi edindiğim iki yılın sonuna geldim. Bu yolda bendenilgi ve desteğini esirgemeyen, tecrübelerinden istifade ettiğim, hem akademik kimliği hem de hayat görüşü ve duruşunu her daim kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU'ya emeklerinden dolayı teşekkür ederim.


Tez çalışmamın deney aşaması ve literatür taraması sırasında bana büyük katkıda bulunan sayın Uzman Adem DEMİR'e, çalışmalarım boyunca bana her türlü desteği sağlayan, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Hasan Efe, Doç. Dr. Adnan YILMAZ, Doç. Dr. Aynur KIRBAŞ ve Doç. Dr. Medine CUMHUR CÜRE'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, biran olsun bilgisini ve desteğini esirgemeyen, minettar olduğum ve çok sevdiğim ablam ve hocam Mehtap ATAK'a, tez çalışmamda çok büyük emeği olan, çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım arkadaşım Esra PINARBAŞ'a, laboratuvar deneyimi kazanmamda bana yardımcı olan, güler yüzü ve yardımını hiç esirgemeyen sevgili hocam Sibel KARAKAŞ'a, tez yazımı esnasındaki yardımları için sevgili hocalarım Erva ESMER, Nebahat EJDER ve Kaan KARAOĞLU'na ve yine dönem arkadaşım Hilal Ebru HOTAMAN'a, çalışmalarım sırasında manevi desteğiyle yanımda olan ev arkadaşlarım Sadiye ASLANYÜREK ve Raziye LALE'ye teşekkür ederim.

Son olarak her zaman sevgi ve destekleriyle bana güç veren sevgili annem Nazengül HÜNER ve babam Ünal HÜNER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Merve HÜNER

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan ay Atıklarının Bazı Antioksidan Enzimler Üzerine Olan Etkisinin Eritrositlerde İncelenmesi başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
11/12/15


Merve HÜNER

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

ÇAY ATIKLARININ BAZI ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ERİTROSİTLERDE İNCELENMESİ

Merve HÜNER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Bu çalışmada, Rize’ de üretilen yeşil ve siyah çay ile çayların işlenmesi sırasında açığa çıkan çay atıkları kullanıldı. Mevcut çalışmada, çay ve atıklarının fenolik bileşenlerine bakmak ve eritrosit hücre modelinde antioksidan enzim aktivitesi ölçülerek çay örneklerinin enzimatik aktivite üzerine etkilerini araştırmak amaçlandı. Çay ve atıkların toplam polifenol içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi ile gr kuru ağırlık başına düşen mg kateşin eşdeğer olarak, DPPH radikal temizleme aktivitesi ise Cuendet metodu ile eşdeğer kateşin standardıyla karşılaştırmalı olarak belirlendi. Eritrositlerdeki oksidatif stres (lipit peroksidasyonu) üzerine olan etkisi MDA Stock metoduna göre, toplam tiyol düzeyleri ise Sedlack metoduna göre belirlendi. Eritrositlerde antioksidan enzimler, SOD, CAT, GR, GSH-Px aktiviteleri sırasıyla Fitzgerald, Aebi, Bergmeyer ve Beutler’in çalışmalarından yararlanılarak belirlendi. En yüksek fenolik içeren özüt, yeşil çayda en düşüğü ise siyah çay lif atığında bulundu. Buna bağlı olarak en yüksek radikal temizleme etkisi en düşük MDA değeri en yüksek hücre içi toplam tiyol düzeyi yeşil çayda tespit edildi. SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktiviteleri yeşil çay özütünün bulunduğu ortamda saptandı. Sonuç olarak çay ve atıklarının antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve yeşil çay ile onun yaprak atığının siyah çaydan daha yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu belirlendi. Böyle bir biyolojik değere sahip çay atıklarının başta kozmetik alanda olmak üzere birçok koruyucu sağlık ürünlerinde değerlendirilebileceği ve böylelikle kullanım alanı bulunmayan yan ürünlerin ekonomik bir değer haline gelebileceği öngörülmektedir.

2015,91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çay atıkları, Antioksidan Enzimler, DPPH, MDA, Toplam Tiyol Seviyeleri.

ABSTRACT

INVESTIGATION of EFFECT of TEA WASTES OVER SOME ANTIOXIDANT ENZYMES on ERYTHROCYTES

Merve HÜNER

Recep Tayyip Erdoğan University

Graduate School of Health Sciences

Department of Medical Biochemistry

Master's Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

In this study, tea and its wastes come from green and black tea production process were used. The main target of this study is to determinate the phenolic content and the radical scavenging activities of tea and its wastes, and measurement of their effects on antioxidant enzyme activities in erythrocyte cell model. Total polyphenol contents of tea and its wastes were determined as mg catechine per dry mass by using Folin-Ciocalteu reactive and DPPH radical scavenging activity was estimated by Cuendet method as equivalent catechine standard. As measured of oxidative stress in erythrocyte, MDA and total thiol levels were measured by Stock and Sedlak methods, respectively. The activities of antioxidant enzymes in erythrocyte were determined by using SOD, CAT, GR and GSH-Px activities (with Fitzgerald, Aebi, Bergmeyer and Beutler' studies, respectively). The extracts with the highest and lowest phenolic contents were determined green tea and black fiber waste. Therefore, the highest radical scavenging activity and total thiol level, and the lowest MDA concentration were detected in green tea. Also, all enzyme activities in erythrocyte were higher in sample with green tea to compared to other tea extracts. As a result, it was decided that tea and its wastes have antioxidant activity, and green tea and its leaf wastes have higher antioxidant activity than black tea. We think that the tea wastes such having a biological effect might be evaluated as many of protective health products particularly in cosmetic fields, thus, these by-products, no application for any area is expected to become an economical value.

2015, 91 page

Keywords: Tea wastes, Antioxidant enzymes, DPPH, MDA, Total Thiol Levels.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	2
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.....	8
1.3. Lipit Oksidasyonu Hakkında Genel Bilgi.....	11
1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	12
1.4.1. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	14
1.4.2. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar.....	15
1.4.2.1. Endojen Kaynaklı Enzimatik Antioksidanlar	15

1.4.2.2.	Endojen Kaynaklı Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	18
1.4.3.	Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler.....	20
1.5.	Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	24
1.5.1.	Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi	25
1.5.2.	MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi	25
1.5.3.	DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi.....	25
1.6.	Eritrosit ve Oksidatif Stres.....	26
1.7.	Çay Bitkisinin Özellikleri	27
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1.	Kullanılan Cihazlar	31
2.2.	Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	32
2.3.	Numunelerin Toplanması ve Özütlemlerin Hazırlanması	34
2.3.1.	Çay Numunelerinin Eldesi.....	34
2.3.2.	Çay Özütlemlerinin Hazırlanması	35
2.4.	Özütlemlerde Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi	35
2.5.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi.....	36
2.6.	Eritrositlerde MDA Tayini.....	37
2.6.1.	Eritrosit Paketinin Hazırlanması.....	37
2.6.2.	Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması ve Çay Özütlemleriyle Preinkübasyon... 37	
2.6.3.	MDA Tayini.....	38
2.7.	Eritrosit Toplam Tiyol Düzeylerinin Belirlenmesi.....	38
2.8.	Eritrosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini	39
2.8.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	39
2.8.2.	Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	41
2.8.3.	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	42
2.8.4.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü.....	43

2.9.	İstatistiksel Analiz.....	44
3.	BULGULAR.....	45
3.1.	Çay ve Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri	45
3.2.	Çay ve Atıklarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi	46
3.3.	Çay ve Atıklarının Oksidatif Stres Altındaki Eritrositlerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri	49
3.4.	Eritrosit Toplam Glutasyon Düzeyleri	50
3.5.	Çay ve Atıklarının Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Olan Etkileri	52
3.5.1.	Katalaz Aktivitesi	55
3.5.2.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi	57
3.5.3.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi.....	58
3.5.4.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	60
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	63
5.	ÖNERİLER.....	69
	KAYNAKLAR	70
	ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Moleküler oksijenden reaktiflerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin bunlara etkileri.....	3
Şekil 2.	Serbest radikallerin oluşumu.	5
Şekil 3.	Reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hücre hasarı mekanizması.....	10
Şekil 4.	Glutatyonun yapısı.	19
Şekil 5.	Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b).	21
Şekil 6.	Çayda yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları.	22
Şekil 7.	DPPH radikalinin molekül yapısı.....	26
Şekil 8.	Çay bitkisinin resimleri.	28
Şekil 9.	Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 10.	MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon.	38
Şekil 11.	Glutatyon standart grafiği.....	39
Şekil 12.	SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği ...	41
Şekil 13.	Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları.	46
Şekil 14.	Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri.	48
Şekil 15.	Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik.....	48
Şekil 16.	Numunelerin MDA değerlerinin gösterimi.	50
Şekil 17.	Standart ve farklı çay özütlerinin eritrosit glutatyon düzeyleri.	52
Şekil 18.	Kateşin ve farklı çay özütlerinin eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri.	54
Şekil 19.	Çay Örneklerinin Katalaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	56
Şekil 20.	Çay Örneklerinin GR Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	58
Şekil 21.	Çay Örneklerinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	60
Şekil 22.	Çay Örneklerinin SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	62

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	Radikal ve radikal olmayan oksijen türevleri.	4
Tablo 2.	Serbest radikal kaynakları.	4
Tablo 3.	Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri.	11
Tablo 4.	Ekzojen ve Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması.	14
Tablo 5.	Çay yaprağının bileşimi.	28
Tablo 6.	Farklı çay tiplerinin fenolik madde kompozisyonu.	29
Tablo 7.	Denemelerde kullanılan cihazlar.	31
Tablo 8.	Çözeltiler ve hazırlanışları.	32
Tablo 9.	Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.	34
Tablo 10.	Numune Kodları.	35
Tablo 11.	Polifenol tayini için pipetleme miktarları.	36
Tablo 12.	SOD enzim aktivite tayini için pipetleme miktarları.	40
Tablo 13.	Katalaz aktivitesi için pipetleme miktarları.	42
Tablo 14.	GSH-Px aktivitesi için pipetleme miktarları.	43
Tablo 15.	GR aktivitesi için pipetleme miktarları.	44
Tablo 16.	Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları.	45
Tablo 17.	Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri.	47
Tablo 18.	H ₂ O ₂ aracılı oksidatif strese maruz bırakılan ve çay örnekleriyle (100µM) preinkübe edilen eritrositlerde TBARS değerleri.	49
Tablo 19.	Çay örneklerinin eritrosit glutasyon düzeylerine olan etkisi.	51
Tablo 20.	Numunelerin antioksidan enzim aktiviteleri.	53
Tablo 21.	Çay Örneklerinin Katalaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	55
Tablo 22.	Çay Örneklerinin GR Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	57
Tablo 23.	Çay Örneklerinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	59
Tablo 24.	Çay Örneklerinin SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	61

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CAPS	: [3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit]
CAT	: Katalaz
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asidi
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşingallat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokataşingallat
ETS	: Elektron Transfer Sistemi
FAD	: Flavinadenindinükleotit
Fe	: Demir
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Kuvveti
GSH	: İndirgenmiş glutatyon

GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HOCl	: Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HO ₂ ·	: Perhidroksil radikali
IC ₅₀	: % 50 İnhibisyon konsantrasyonu
INT	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	: Monopotasyum fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	: Lipit
LOO·	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
M	: Molarite
MDA	: Malondialdehit
mmol	: Milimol
mL	: Mililitre

mM	: Milimolar
N	: Normalite
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	: Sodyum Monohidrojen Fosfat Dihidrat
NaN ₃	: Sodyum azid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NO·	: Nitrik Oksit
NO ₂	: Azot Dioksit
¹ O ₂	: Singlet Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit Radikali
OH ⁻	: Hidroksil Radikali
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PBS	: Tuzlu Fosfat Tamponu
PG	: Propil galat
pH	: Hidrojenin İyonu Aktivitesi
PLGSH-Px	: Fosfolipit Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz
PSH	: Protein Tiyolleri
PSSG	: Protein-Glutatyon Bağlayıcı
PUFA	: Poliansature yağ asitleri
RBC	: Eritrosit

RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SD	: Standart Sapma
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: “Statistical Package for the Social Sciences”
TAR	: Toplam Antioksidan Cevap
TBA	: 2-Tiyobarbütirik asit
TBARS	: “Tiobarbutiric acide reaktive substance”
TBHQ	: Tersiyer butil hidrokinon
TCA	: Trikloro asetik asit
TEAC	: Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
U	: Ünite
X	: Aritmetik Ortalama
v/w	: Hacim/Kütle
w/w	: Kütle/Kütle
XOD	: Ksantin oksidaz
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
%	: Yüzde
•	: Radikal

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çay, *Camellia sinensis* olarak bilinen bitkinin yapraklarından elde edilen ve dünyada sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecektir (Henning vd., 2004; Chen vd., 2009). Çay, yaprağını dökmeyen her zaman yeşil olan bir bitkidir ve her yıl yaklaşık olarak 2,5 milyon ton kuru çay üretilmektedir (Çekil, 2006). Çay, yeşil, siyah ve oolong çay olarak üç ana kategoriye ayrılır ve her biri farklı yöntemlerle üretilmektedir (Çekil, 2006; Zhu vd., 2002). Yeşil çay fermente edilmemiş, siyah çay tam fermente edilmiş ve oolong çay ise, yarı fermente edilmiş şekildedir (Henning vd., 2004; Balentine vd., 1997). Dünyada üretilen ve tüketilen çayın % 78'sini siyah çay, % 20'sini yeşil çay ve % 2'sini ise oolong çay oluşturur.

Eski çağlardan beri yüzyıllardır çay bitkisinin tıbbi özellikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 2009). Çay, üzüm, elma ve nar gibi tabiatta bulunan birçok bitki, serbest radikal toplayıcı özelliğine sahip antioksidan bileşikler bulundurlar. Birçok *in vitro* çalışma çayda bulunan flavonoidlerin güçlü antioksidan ve metal-şelat özelliklere sahip olduğunu, bu sayede de farklı hücre ve dokuları serbest oksijen radikallerine karşı koruduğunu göstermiştir. Farklı bitkiler farklı oran ve çeşitlerde flavonoid ihtiva eder. Buna göre o bitkinin bahsedilen etkisi de değişkenlik arz eder (Santosh vd., 2001).

Yapılan birçok epidomiyolojik çalışmalarla da diyetle alınan flavonoidlerin koroner kalp hastalığı ve kansere bağlı ölüm risklerini azaltabileceği görüşü desteklenmektedir (Wang vd., 2000). Çalışmaların büyük bir kısmı; DNA, lipitler ve proteinlerdeki oksidatif hasarın kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine sebep olabileceği hipotezini desteklemektedir (Rietveld ve Wiseman, 2003).

Normalde vücutta oksidan-antioksidan dengesi mevcuttur (Akkuş, 1995). Endojen antioksidan savunma sistemi, insan vücudunda oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türlerine tamamen karşı koymak için her zaman yeterli değildir ve antioksidan savunmanın yetersiz olduğu durumlarda serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır (Rietveld ve Wiseman, 2003; Vendemiale vd., 1999). Bu zararlı etkileri

azaltmak için dışarıdan alınan sentetik yapıdaki antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlanmasıyla; besin kimyası ve koruyucu tıbbın, bitkisel kaynaklı ve insan organizması için genellikle zararsız olup, yan etkileri bulunmayan doğal antioksidanlara karşı ilgi artmıştır. Artan bu ilgi, tüm dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesine de zemin oluşturmuştur (Rice-Evans, 1997). Doğal antioksidanlar; flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddelerdir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Harborne, 1994). Çayın yapısında bulundurduğu flavonoidlerden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Ana flavonoidlerden epigallokateşin-3-gallatın (EGCG), epikateşin (EC), epikateşingallat (ECG) ve epigallokateşin (EGC) yeşil çayda ve az miktarda da siyah çayda bulunduğu bilinmektedir. EGCG en bol ve en yaygın bulunan çay polifenolüdür (Chen vd., 2009).

Yapılan değişik denemelerde, tüketilen yeşil ve siyah çayın plazma düzeyindeki antioksidan kapasite değerleri birbirinden farklı bulunmuştur.

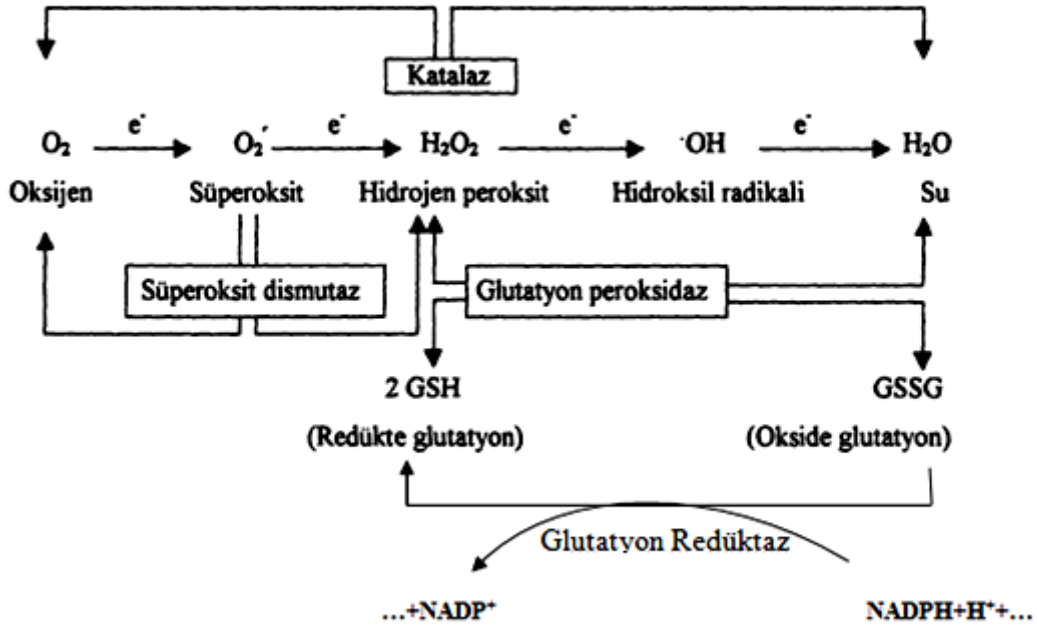
Yapılan literatür taramaları ve değerlendirmeleri sonucunda, çayın iyi bir antioksidan olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda çay üretimi esnasında meydana gelen çay atıklarının da kayda değer bir antioksidan potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir (Demir, 2011; Keleşoğlu, 2012). Fakat çay ve atıklarının antioksidan enzimler üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmadığı fark edilmiştir. Buradan yola çıkılarak çay atıklarının antioksidan enzim aktivitesinin hücre modelinde tespit edilmesinin çay atıklarının daha verimli bir şekilde değerlendirilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, üzerinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron bulunan, serbest hareket edebilen, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller katyonik, anyonik ya da nötral karakteristikli olabilirler. NO (nitrik oksit), Nitrik dioksit (NO₂) gibi bileşiklerde dış orbitalde tek elektron bulunduğundan bu bileşikler de radikal yapıdadırlar (Seitz vd., 2002).

Biyolojik sistemlerde, aerobik metabolizmanın normal ürünü olarak serbest radikaller ve diğer güçlü oksidanlar açığa çıkar. Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve

bunların meydana getireceği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri devreye girmektedir (Mc Cord, 1993). Şekil 1’de moleküler oksijenden reaktiflerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin bunlara etkileri gösterilmiştir.



Şekil 1. Moleküler oksijenden reaktiflerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin bunlara etkileri.

Vücudumuzda oksidan ve antioksidan sistemler dengededir ve bu dengenin oksidan sistem lehine bozulmasına “oksidatif stres” denilmektedir.

Normal koşullarda hücreler tarafından tüketilen moleküler oksijenin % 95-98’i dört elektron ilavesi ile suya, geri kalan % 2-5’i ise günlük homeostatik oksidan stres esnasında reaktif serbest radikallere dönüşür (Gate vd., 1999). Tablo 1’de biyolojik sistemlerde en çok ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinden gösterilmiştir.

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan oksijen türevleri.

Radikal oksijen türevleri		Radikal olmayan oksijen türevleri	
Adı	Sembolü	Adı	Sembolü
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$\cdot OH$	Lipid peroksit	ROOH
Nitrik oksit	$NO\cdot$	Hipoklorik asit	HOCl
Peroksil	$ROO\cdot$	Ozon	O_3
Alkoksil	$RO\cdot$	Aldehit	HCOR

Fizyolojik metabolizma ve patolojik değişiklikler, serbest radikal oluşumuna etki etmektedir. Tablo 2’de serbest radikal kaynakları verilmiştir (Sinatra ve De Marco, 1995).

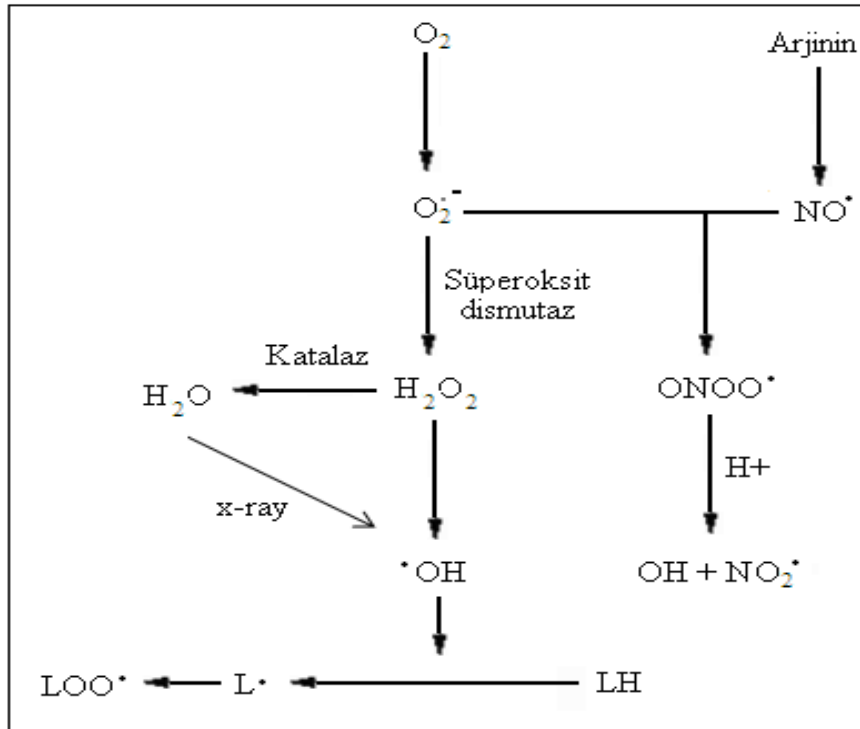
Tablo 2. Serbest radikal kaynakları.

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Elektron tranport ziciri (sit P₄₅₀ ve sit b₅)	Redoks döngüsü bileşenleri
Endoplazmik retikulum	Paraquat
Kloroplast	Diquat
Mikrozom	Alloksan
Mitokondri	Doksorubisin
Nükleer membran	
Fagositik hücreler	İlaç oksidasyonları
Endotel hücreleri	Parasetamol
Eozinofiller	CCl ₄ (Karbon tetraklorür)
Monosit ve makrofaj hücreleri	
Nötrofiller	
Oksidan enzimler ve proteinler	Çevresel ajanlar
Aldehit oksidaz	Azot dioksit (NO ₂)
Amino asit oksidaz	Hiperoksi
Dihidroorotat dehidrogenaz	Pestisitler
Flavoprotein dehidrogenaz	Sigara dumanı
Galaktoz oksidaz	Anestezikler
Hemoglobin	Aromatik hidrokarbonlar
Flavoproteinler	

İndolamin dioksidaz	İyonize radyasyon
Ksantin oksidaz	
Lipooksijenaz	
Monoamin oksidaz	Güneş ışığı
NADPH oksidaz	
Prostaglandin sentetaz	Isı şoku
Triptofan dioksidaz	
Ürat oksidaz	Glutasyon oksitleyici bileşikler

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. Ayrıca enzimatik reaksiyonlarda reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna neden olmaktadır. Şekil 2’de serbest oksijen radikallerinin oluşumu gösterilmiştir (Altınışık, 2000).



Şekil 2. Serbest radikallerin oluşumu.

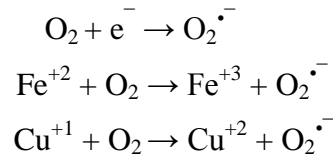
1.2.1.1. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), 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 (Altınışık, 2000).

1.2.1.2. Süperoksit Radikali

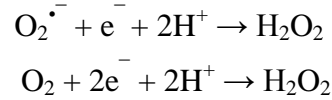
Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Tüm aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur fakat daha çok elektron transfer sisteminde meydana gelir. Elektron transfer sisteminin dışında da pek çok enzimatik ve non-enzimatik yollarla meydana gelebilir (Mc Cord ve Mobile, 1983; Fridovich, 1975).

Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Özellikle hem grupları, Fe-S grupları ile ve prostatik grup olarak geçiş metalleri (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir.

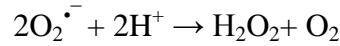


1.2.1.3. Hidrojen Peroksit

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 (H₂O₂) meydana getirir (Akkuş, 1995).

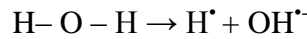


Biyolojik sistemlerde süperoksit radikalinin enzimatik ya da non enzimatik dismutasyonu sonucu veya elektron transfer sisteminde (ETS) oksijen molekülünün eksik indirgenmesi sonucu meydana gelebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Niki,1987).

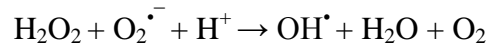


1.2.1.4. Hidroksil Radikali

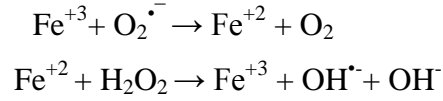
Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyona girer. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir (Başaga, 1990).



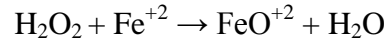
Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. “Haber-Weiss” adı verilen bu reaksiyon bakır ve demir iyonları tarafından katalizlenir (Akkuş, 1995).



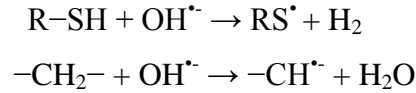
Çeşitli metal tuzlarının hidrojen peroksit ile etkileşmesiyle hidroksil radikali oluşur, çoğu zaman bu metal iyonu demirdir. Bu reaksiyonu bakır da verebilir. Fe⁺² tuzlarının hidrojen peroksit ile etkileşerek hidroksil radikalini oluşturması “Fenton Reaksiyonu” olarak adlandırılır (Akkuş, 1995).



Bazen de H₂O₂ ile Fe⁺²'nin etkileşimi hidroksil radikalinin oluşumu ile sonuçlanmayıp FeO⁺² (ferro demir) molekülüne dönüşüm ile sonuçlanabilmektedir. Buna “Alternatif Reaksiyon” adı verilir.

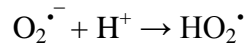


Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşumuna sebep olur.



1.2.1.5. Perhidroksil Radikali

Perhidroksil radikali (HO₂[•]), süperoksit radikalinin protonlanmasıyla meydana gelir (Aikens ve Dix, 1991).



1.2.2. Nitrik Oksit Radikali

Nitrik Oksit(NO), hücrenin patofizyolojisinde önemli rol oynayan gaz halinde ve çözünebilir bir serbest radikaldir. İleri derecede lipofilik olmasından dolayı lipidperoksidasyonu başlatıcısıdır. Endotel türevi gevşetici faktörle eşdeğerdir ve damar düzkas hücrelerinin gevşemesi için temel sinyal oluşturur (Bicker, 2007).

1.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

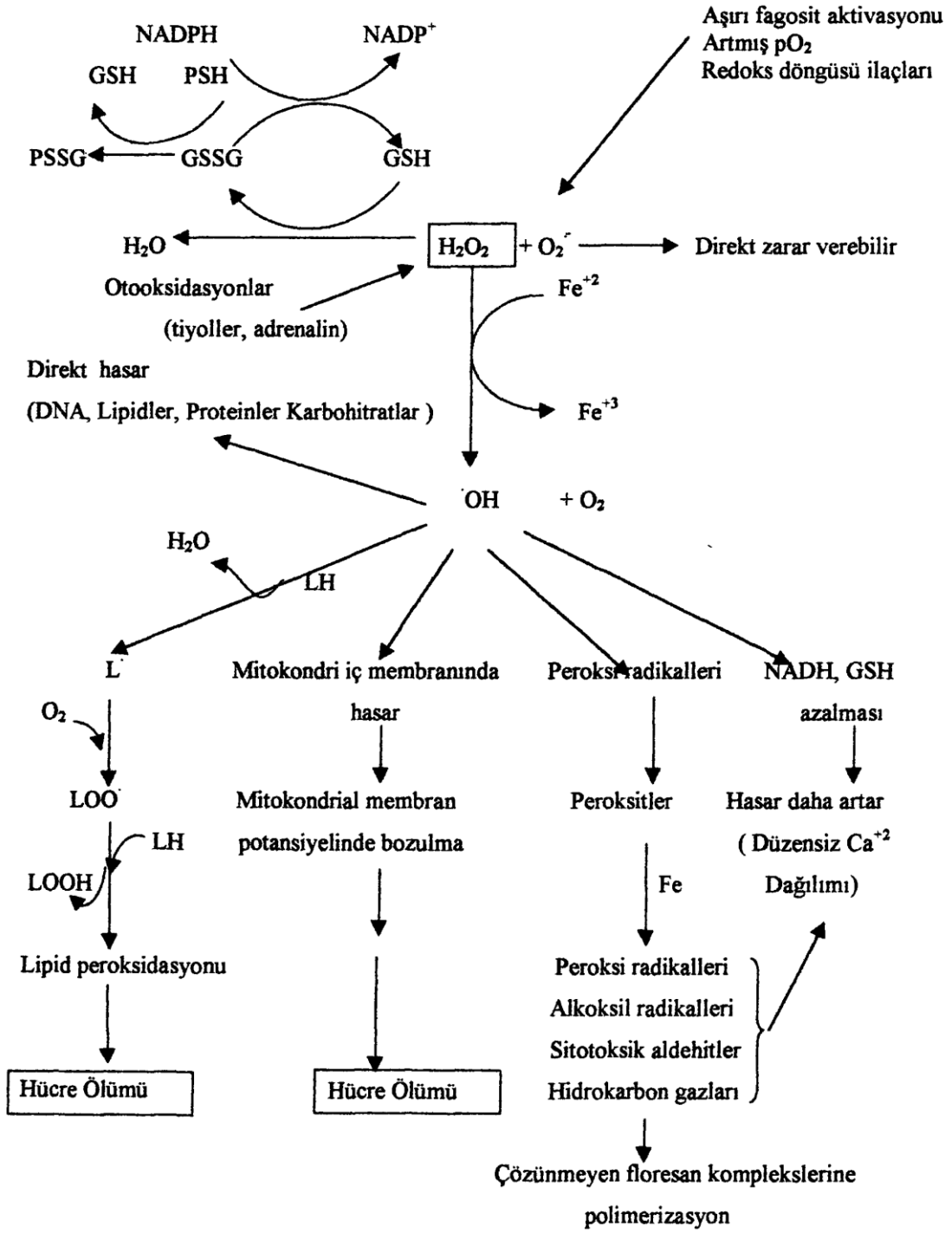
Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi fonksiyonel bileşiklerine etki ederler. Bu biyomoleküller içinde ise en hassas olan

lipitlerdir. Serbest radikaller, membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolaylıkla reaksiyona girerek çeşitli peroksidasyon ürünleri meydana getirirken, membranların yapısını, permeabilitesini ve fonksiyonunu bozarlar, membranlardaki enzimleri ise inaktif hale getirirler.

Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri, amino asit bileşimine bağlıdır. Yapılarında sistein, metiyonin, histidin, triptofan, tirozin gibi amino asitleri fazlaca bulunduran proteinler radikallerin oksitleyici etkisine daha fazla duyarlıdır. Oksijen radikalleri, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid bağı teşekkülü ve çapraz bağlanmalara yol açabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1985; Knight, 1999).

Hidroksil radikali özellikle DNA'da deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek bazların modifikasyonuna ve zincir kısalmasına yol açar. Ayrıca DNA polimerazı inhibe eder, bu yüzden hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatır, hücre yaşlanmasını hızlandırır ve karsinogenezise yol açabilir (Akkuş, 1995; Farber vd., 1990).

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu 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 (Kargın ve Fidancı, 2001). Şekil 3'te reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hücre hasarı mekanizması ve Tablo 3'te hücrelerdeki serbest radikal hedefleri gösterilmiştir.



Şekil 3. Reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hücre hasarı mekanizması.

Tablo 3. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri.

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

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 (Halifeoğlu vd., 2000).

Lipit oksidasyonu, serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar (Canoruç vd., 2001). 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 (Murray vd., 1996).

Çoklu doymamış yağ asitleri oksidasyona kolaylıkla maruz kalabilen yapılardır. Lipit oksidasyonu tepkimeleri serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asidi zincirinin α -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır ve lipit peroksil radikalinin 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. Hidroperoksitler oldukça stabil moleküller olup yapıları ancak yüksek sıcaklıkla veya demir, bakır gibi geçiş metallere maruz kalmakla bozulabilir (Halliwell ve Chirico, 1993).

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 (Uchida, 2000). MDA uzun ömrü ve yüksek reaktivitesi ile 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 (Esterbauer vd., 1993). Dokularda MDA seviyesinin artması koroner arter hastalığına akciğer kanseri ile diğer akciğer hastalıklarına, DNA'ya bağlanarak mutasyonlara ve iltihaplanmalara yol açtığı bildirilmektedir (Uzun vd., 2000).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidan savunma sistemleri, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller ve/veya reaktif oksijen türlerini (serbest radikalleri) toksik olmayan bileşiklere döndürürler. Başlıca hücrenin sitoplazmasında ve membranında bulunurlar (Mc Cord, 1993).

Hücrede oluşan radikallerin, detoksifikasyon işlemi genellikle enzimlerle gerçekleştirilir. Bunlar; SOD, Cat ve GSH-Px gibi $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 temizleyen enzimlerdir. GSH-Px düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında aktif iken, katalaz daha çok yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında aktiftir (Gaetani vd., 1989).

Antioksidan savunma sisteminin nonenzimatik bölümü, bazı bileşikler ve vitaminlerden oluşur. Enzimatik ve nonenzimatik tüm antioksidanlar etki şekilleri bakımından dört gruba ayrılırlar:

1. Toplayıcı (Scavenging) Etki
2. Bastırıcı (Quencher) Etki
3. Onarıcı (Repair) Etki
4. Zincir kırıcı (Chain-breaking) Etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştüren etkiye ise bastırıcı etki adı verilir. Çeşitli vitaminler, flavanoidler, antosiyaninler bu tür etkiye sahiptir (Akkuş, 1995; Helmut, 1991).

Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyeci etki zincir kırıcı etkidir. Seruloplazmin, hemoglobin ve mineraller bu etkiye sahiptir

Antioksidanlar kaynaklarına göre ekzojen ve endojen antioksidanlar olarak gruplandırılabilir ve bunlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Ekzojen ve Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması.

Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	Endojen Kaynaklı Antioksidanlar
Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar	Enzimler
Vitamin A,E,C ve β -karoten	Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
	Süperoksit dismutaz
	Glutasyon peroksidaz
	Glutasyon-S-transferaz
	Katalaz
	Hidroperoksidaz
Antioksidan yiyecek katkı maddeleri	Non-enzimatik antioksidanlar
Bütile hidroksitoluen (BHT)	a) Lipit fazda bulunanlar:
	β -karoten, α -tokoferol
Bütile hidroksianizol (BHA)	b) Sıvı fazda bulunanlar (kan plazması veya hücre sitozolü):
Etoksikin	Glutasyon, melatonin, sitokinler, ürat, sistein,
Sodyum benzoat	serüloplazmin, transferrin, miyogloblin,
Propil galat (PG)	hemoglobin, ferritin, metionin, albumin,
Tersiyer butil hidrokinon (TBHQ)	bilirubin.
Tokoferoller	
Fe-süperoksitdismutaz (bakteriyel)	

1.4.1. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. Vitamin yapısında olan eksojen antioksidanlar; α -tokoferol (vitamin E), β -karoten (vitamin A), askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (folat) tir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri ve Troloks örnek olarak verilebilir. Gıdalardaki yapay antioksidanlar ise; butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), sodyum benzoat, etoksikuin ve propilgallattır.

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 lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir (Gözükara, 1997).

C vitamini bir ketolaktondur ve organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (Horton ve Fairhurst, 1987).

E vitamini yağda çözünebilir zincir kırıcı özelliği olan önemli bir antioksidandır. Lipit peroksi radikalının (LOO[•]) lipit hidroperokside dönüşmesini sağlayarak (LOOH) lipit peroksidasyonunda zincir reaksiyonlarının başlama ve uzama adımlarını durdurur.

1.4.2. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

1.4.2.1. Endojen Kaynaklı Enzimatik Antioksidanlar

Endojen kaynaklı enzimatik antioksidanlara Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT), Glutasyon Redüktaz (GR) ve Glutasyon S-Transferaz (GST) gibi enzimler başlıca antioksidan enzimlerdir.

Süper Oksit Dismutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1), süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Daha önce bulunduğu dokuya göre bakır içeren protein manasına gelen eritrokuprein, serebro kuprein gibi isimlerle anılan enzim ilk kez 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından adlandırılmıştır. SOD enziminin asıl fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkisinden korumaktır. Metabolik substrat olarak enzim süperoksit radikallerini kullanır ve onu daha az zararlı bir bileşik olan hidrojen perokside dönüştürür.

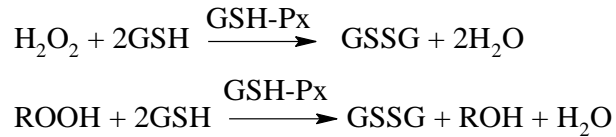


Süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen bu dismutasyon reaksiyonu enzimatik olmayan (spontan) dismutasyona göre yaklaşık 4000 kat daha hızlı olur. Enzimatik aktivitesi oksijeni fazla kullanan dokularda çok daha fazla bulunmuştur. Süperoksit dismutaz oldukça bol bulunan bir enzim olup, iki tane izoenzimi vardır: Sitoplazmik Cu-Zn SOD ve Mitokondriyal Mn-SOD. Sitozolde bulunan SOD dimerik iken mitokondride bulunan tetrameriktir. Genel olarak hücrelerde en bol bulunan

sitozolik form olan CuZn-SOD'dır. CuZn-SOD enziminin başlıca fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücrelerde meydana gelen süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

SOD izoenzimlerinin doku ve organellerdeki dağılışı buralarda oksijenin kısmi basıncındaki artışa bağlıdır. Mitokondrielerde bulunan Mn-SOD bakterilerde de bulunmaktadır ve aralarında yapısal benzerlik vardır. Bakterilerde ayrıca Fe ihtiva eden SOD da tespit edilmiştir (Marklund, 1984).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9), ilk defa 1975'de Milk ve Redle tarafından eritrositlerden saflaştırılmıştır. Sığır eritrositlerinden saflaştırılmış GSH-peroksidaz 85 kdal molekül ağırlığında tetramerik bir yapıya sahiptir. Her biri özdeş bu dört alt birim bir selenyum atomu içerir. Fare karaciğerinden saflaştırılmış bir başka GSH-peroksidaz ise molekül ağırlığı 20 kdal olan monomerik yapıda ve bir tek selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Bu sitozolik glutasyon peroksidaz daha çok fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz diye adlandırılmaktadır. Bu enzim daha çok fosfolipitlerin korunmasında rol alır (Donald Massaro ve Lee Frank, 1980; Ursini ve Bindoli, 1987; Meister ve Anderson, 1983).GSH-Px aşağıdaki reaksiyonlarla hidrojen peroksidi suya indirgerken hidroperoksitlerin de daha etkisiz bileşiklere dönüşümünü katalizler.

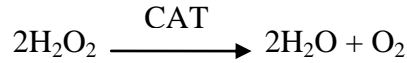


Hidrojen peroksit, kümenhidroperoksit, t-bütil hidroperoksit ve lipid peroksitler enzimin substratıdır. Selenyum GSH-Px enziminin esansiyel bir bileşenidir. Suda çözünen lipid peroksitler bu Glutasyon peroksidaz tarafından suya parçalanırken membrana bağlı fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi membran içinde oluşan hidroperoksitlerin yıkımında rol oynar. Membrana bağlı önemli antioksidan olan Vit E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membran peroksidasyona karşı korunmasında rol oynar.

GSH-Px lökositlerde de önemli fonksiyona sahiptir. Özellikle fagositik hücrelerde oksidatif yıkım sonucu oluşan hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesinde rol oynar. GSH-Px aktivitesi düşük fagositlerde ortama H₂O₂ salınımını artırmaktadır.

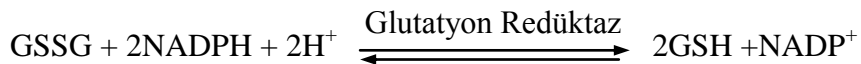
Eritrositlerde de GSH-Px hücreyi H₂O₂'nin tesirinden koruyan en önemli antioksidan enzimdir. GSH-Px'in yaşlılarda ve Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek olduğu ileri sürülmektedir (Costello ve Webber, 1990). Glutasyon peroksidaz ayrıca prostaglandinlerin biyosentezinde ve prostasiklin oluşumunun regülasyonunda görev alır.

Katalaz (CAT) (H₂O₂ oksiredüktaz, E.C.1.11.1.6) tetramerik yapıya sahip olup dört tane hem grubu içeren ve her bir alt birimin molekül ağırlığı 60 kdal olan bir enzimdir. Bir hemoprotein olan katalaz tüm aerobik mikroorganizmalarda bitki ve hayvan hücrelerinde oldukça yaygın olarak bulunur. Memeli dokularındaki katalaz oldukça değişiklik gösterir. Örneğin, karaciğer ve böbrekte en yüksek, bağ dokusunda ise düşük aktivitede bulunur. Bu hücrelerde daha çok mitokondriler ve peroksisomlarda lokalize olmuştur. Oysa, eritrositlerde çözülmüş halde bulunur. İnsan eritrositleri katalazca oldukça zengindir fakat ghostlarda katalaz aktivitesi yoktur (Hugo, 1983; Deisseroth ve Dounce, 1970).



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 peroksidasyonu başladığında lipit hidroperoksitler meydana geldikten sonra CAT antioksidan aktivitede etkisiz kalır. Katalaz insan eritrositlerinininsitozolünde yüksek konsantrasyonda çözülmüş halde bulunur (Gaetani vd., 1989).

Glutasyon Redüktaz (NADPH: okside glutasyon oksiredüktaz) (E.C.1.6.4.2), ilk olarak 1930 yılında bulunmuştur ve daha sonraki yıllarda çeşitli kaynaklardan izole edilerek yapısı aydınlatılmıştır. Enzim molekül ağırlığı 104 kdal olan iki özdeş alt birimden oluşur. Her bir alt birim dört domaine sahiptir. X-ışını kristalografisinde NADPH ve GSSG bağlama pozisyonları birbirine zıt alt birimlerde bulunmuştur. Her alt birim merkezine bir FAD yerleşmiş olup aktif bölgesinde sistein kalıntısı bulunur (Meister ve Anderson, 1983; Goldberg ve Spoones, 1983).

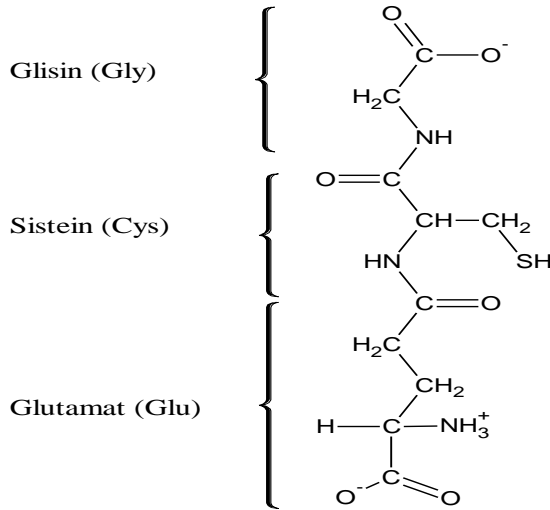


GR, reaksiyonuyla redükte glutatyon rejenerasyonunu sağlar. Fizyolojik şartlarda reaksiyon tek yönlüdür ve bu şekilde GSH/GSSG oranı (1/500) yüksek tutulur. GSH ise tüm hücrelerde en bol bulunan protein dışı tiyoldür ve hücre metabolizmasında, bazı bileşiklerin transportunda hücre korunmasında rol alır. Enzimin NADPH'a olan ilgisi NADH'e göre 60 kat daha 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, glutatyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde glutatyon 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, glutatyon redüktazın spesifik inhibitörüdür (Efe, 1996).

1.4.2.2. Endojen Kaynaklı Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Endojen kaynaklı olup da enzimatik olmayan antioksidanlara glutatyon, askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin örnek verilebilir.

Glutatyon (GSH), tüm canlı hücrelerde bulunan düşük molekül ağırlığına sahip intraselüler bir tioldür. δ -L-glutamil-L-sisteinil-glisinden oluşan bir tripeptittir. Diğer proteinlerin yapısında bulunmayan δ -glutamil bağı onu çeşitli proteaz ve peptidazlara karşı korur. Şekil 4'te glutatyon gösterilmiştir.



Şekil 4. Glutatyonun yapısı.

GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (0,1 – 10 mM). Glutatyon 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. GSH'deki en aktif grup tiyol grubudur. GSH'daki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder.

Melatonin ($C_{13}H_{16}N_2O_2$), HO^{\cdot} 'ni temizleyen güçlü bir antioksidandır. Melatonin, HO^{\cdot} ile reaksiyona girdikten sonra bir indolilkatyon radikaline dönüşür ki, bu da ortamdaki O_2^{\cdot} tutarak antioksidan etki gösterir. Klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğuna inanılmaktadır (Gözükara, 1997). Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından benzerlerine göre çok daha üstün bir özellik kazandırır.

Ürik asit, 1O_2 , peroksil radikalleri, HO^{\cdot} , O_3 ve $HOCl$ için güçlü bir temizleyicidir ve *in vivo* antioksidan olarak kabul edilmektedir. Japon araştırmacılar lipit oksidasyonunun ürik asitle önlendiğini bildirmişlerdir.

Seruloplazmin, ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu böylece hidroksil radikali oluşumunu önler (Gözükara, 1997).

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 (Gözükara, 1997).

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

1.4.3. Bitkisel Antioksidan Olan Fenolik Bileşikler

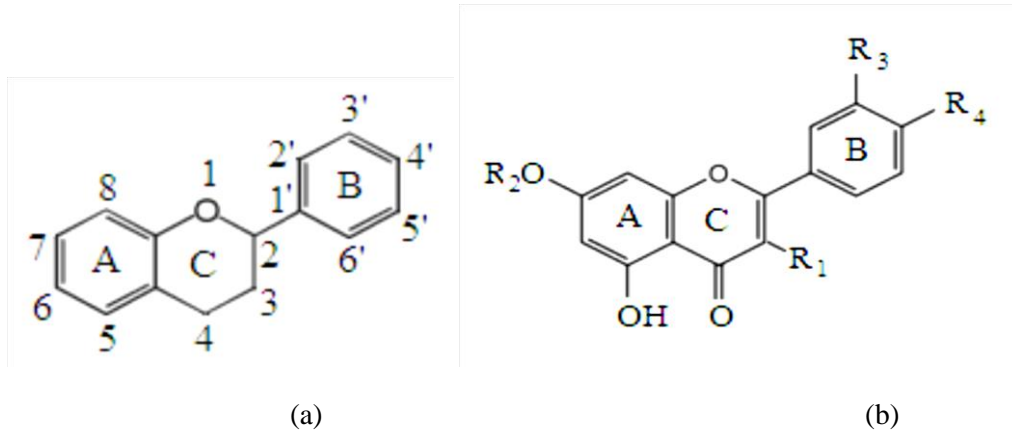
Bitkiler tarafından sentezlenen bazı moleküller, biyomoleküllerin sentezinden sonra ikincil metabolizma ürünleri olup mikroorganizmalara karşı insektisit ve herbisit olarak serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar. Bunlar "fitokimyasallar" diye de isimlendirilirler. Fitokimyasallar, özellikle sebze ve meyvelerdeki fenolikleri, flavonoidleri ve karotenoidleri kapsarlar.

Fenolik bileşikler diğer ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. 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 (Cemeroğlu vd., 2001). Fenolik bileşikler, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahip antioksidan maddelerdir. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlamave otooksidasyonu önleme konusunda da oldukça etkilidirler. Fenolik bileşikler, çeşitli reaktif oksijen türlerini (serbest oksijen, peroksinitrit ve hidrojen peroksiti) hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutardenedilebilir. Fenolik bileşikler veya polifenoller, en fazla bitkilerde bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Fenolik maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tosun ve Karadeniz, 2005). Bu bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılabilir. Bunlar çok önemli antioksidanlardır ve bitkisel gıdaların tüketilmesiyle sağlığa olan olumlu etkileri artırılabilir.

Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Başlıca fenolik asitler gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit ve

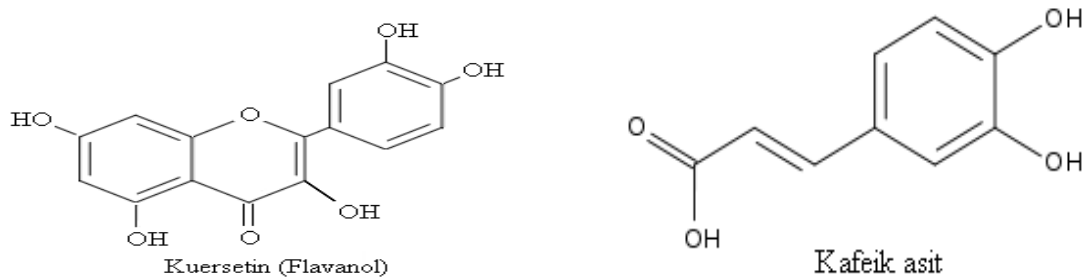
vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içerir.

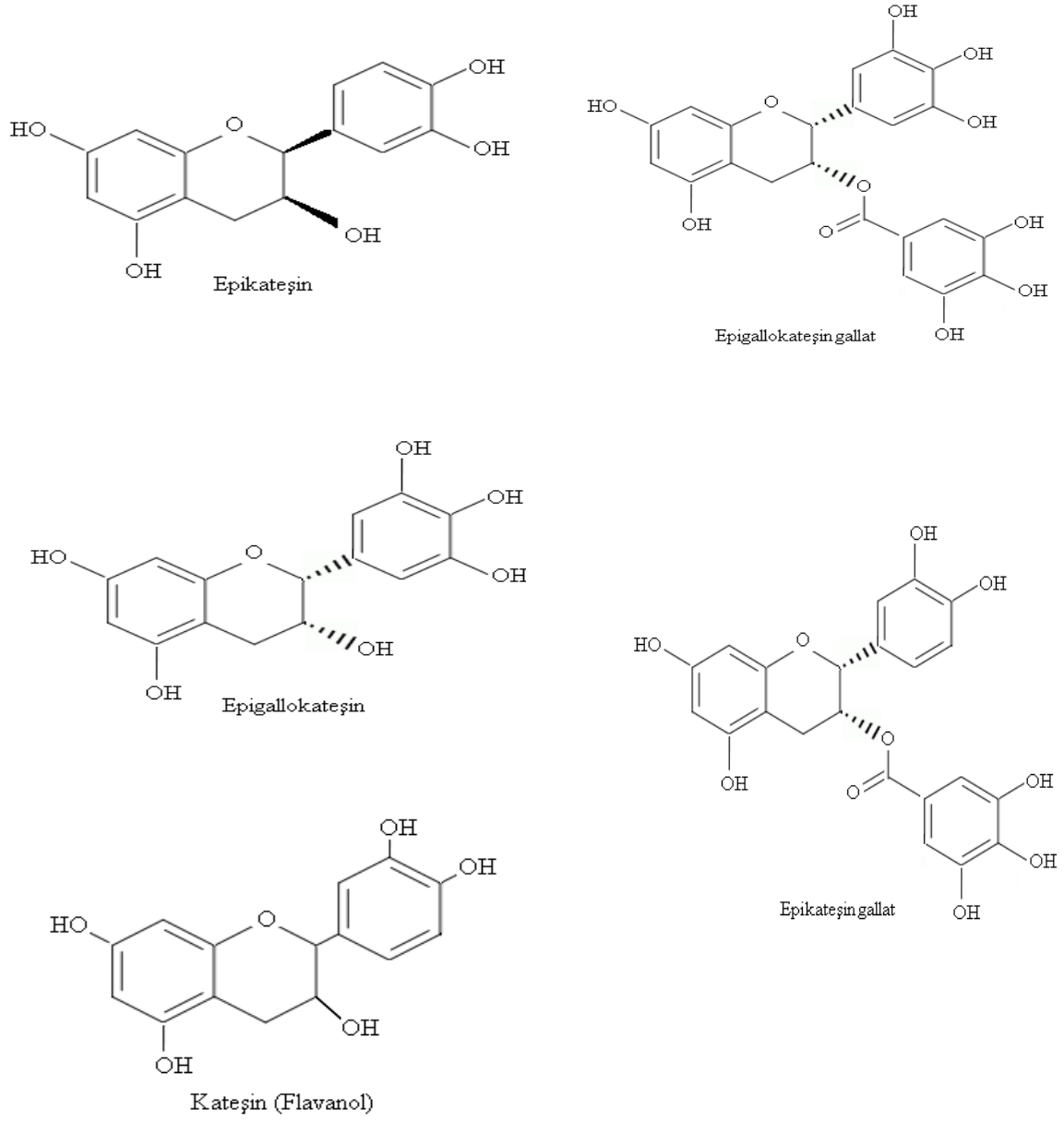
Bitki fitokimyasalları olan flavonoidler, insanlar tarafından sentezlenemezler. Flavonoidler, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddelerin (renk maddelerinin) C6-C3-C6 çatısına sahip olanlarına verilen addır. Flavonoidlerin tümü C6-C3-C6 yapısındadır, ancak moleküldeki hidroksil (OH) grubu sayısı ve dağılımı açısından farklılık gösterirler. A halkası üç 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 5'te flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituentleri gösterilmiştir.



Şekil 5. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituentleri (b).

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





Şekil 6.Çayda yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları.

Flavanonlar renksizdirler ve özellikle; taksifolin, naringin, naringenin, eriodiktol ve hesperitinle temsil edilirler.

Flavonlar, meyvelerde pek bulunmamasına rağmen tahıl (arpa, buğday, mısır vb.) ve baharatlarda (nane vb.) bulunan soluk-sarı renkli bir flavonoid sınıfıdır. Esas flavonlar; apigenin ve luteolinlerdir.

Kuersetin ve kaempferol en çok bilinen flavonollerdir. Kuersetin, luteolin ve galangin yapılarındaki farklılığa rağmen kuvvetli antioksidan olarak bilinirler. Kaempferol, genellikle meyve ve lifli sebzelerde bulunur. İzohamnetin ve miresitin de flavonoller arasında yer alır.

İzoflavonoidler, 'B' halkası oryantasyonuyla yapısal olarak genel flavonoidlerden ayrılır. Bunlar: İzoflavanonlar, İzoflavonlar ve İzoflavonollerdir. En iyi bilinen izoflavonoidler daidzein ve genisteindir.

Antosiyaninler, taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde, kiraz ve erikte, patlıcan, kırmızı lahana ve turpta kırmızı ve mavi rengi üretir. Test edilen antosiyaninlerin çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Horton ve Fairhurst, 1987).

Flavanlar, yapıları ve adlandırılmaları kompleksflavonoidlerdir. Bunlar: kateşinler, leukoantosiyaninler, proantosiyaninler ve tanninlerdir. Flavanlar renksizdirler. Flavan ve onun özel şekli olan kateşinler (flavan-3-ol), çayda bolca bulunur. Monoflavanlar, olgun meyvelerde ve taze yapraklarda bulunur. Turunçgil kabuklarında bulunan flavonoidlere, 'bioflavonoidler' denir.

Geleneksel tıpta, son yıllarda 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 (Guliyev ve Harmandar, 2000; Hausteen, 2002).

Flavonoidlerden kumarinler, kan pıhtılaşmasını önler, düz kasların kasılmasını azaltır ve ağrı kesici, yatıştırıcı ve idrar söktürücü özelliklere sahiptir. 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 ortaya koymuştur. Kuersetin ve rutin lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek, hücreyi okside LDL'den gelen zarara karşı korur. Son yıllarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin oksidatif DNA hasarını serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önlediğini göstermektedir (Meydani vd., 1990). Yapılan bazı araştırmalar ise göstermiştir ki kuersetin ve türevleri doğal antioksidan olan α -tokoferole göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir.

Flavonoidler serbest radikalleri temizleme, güçlü antioksidan olma özelliklerinin yanı sıra hidrolitik ve oksidatif enzimler olan fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenazın inhibisyonu ile antienflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur (Çimen ve Burak, 1999).

Biyoyararlı içeriklerinden dolayı bitkilerin sağlık üzerine olumlu etkileri açıktır. Bu yüzden dünyada tedavi amaçlı olarak kullanılan bitki sayısının 20.000 civarına ulaştığı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir (Kalaycıoğlu ve Öner, 1994).

1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

‘Oksidatif stres’ koşullarında serbest radikaller biyolojik makromoleküllerle etkileşerek çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir bu nedenle özellikle risk grubundaki bireylerin aldığı gıdalarda, bu serbest radikalleri gideren, organizma tarafından sentezlenen ya da dışarıdan besinlerle alınan, antioksidanların toplamsal tayini önemlidir. Bu amaçla antioksidan tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- Eritrosit Membranında Protein Karbonil Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- Eritrositlerde Toplam Glutatyon Düzeyinin Belirlenmesi Yöntemi
- Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi Yöntemi
- Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi
- Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi
- Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi
- Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi
- DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi
- Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi
- Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi(CUPRAC) Yöntemi

Bu yöntemlerden bazıları burada özetlenecektir.

1.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

Suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanan yöntemdir. 700 nm'de ölçüm yapıldığında, mor-menekşe renkli bu kompleks maksimum absorbans oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Bu yöntem numunenin indirgeme kapasitesini ölçtüğünden bir antioksidan tayin yöntemidir.

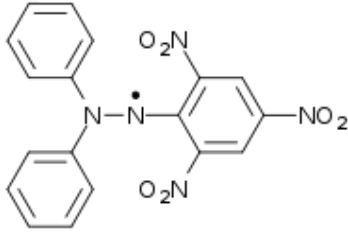
1.5.2. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

MDA, hücre duvarı hasarının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılabilen, lipit oksidasyonunun ikincil ürünlerinden en iyi bilinenidir. Lipit oksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için kullanılan birçok yöntem vardır fakat son yıllarda, Ohkawa vd., (1979)'nin ortaya koyduğu yöntemlerden birinin modifiye şekli uygulanmaktadır. Yöntem; karaciğer doku homojenatı, Fe⁺² ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında ortaya çıkan ve bir lipit 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 verir.

1.5.3. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm'de maksimum absorbans veren ve ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikaldir. Antioksidanlarla muamele, DPPH'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH'nin 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. Radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılan bu yöntemde, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir (Cuendet vd.,1997). Şekil 7’de DPPH molekülünün molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 7. DPPH radikalinin molekül yapısı.

1.6. Eritrosit ve Oksidatif Stres

Oksijen radikalleri hemen hemen bütün hücrelerde belirli düzeylerde üretilir ve membran lipitleri radikaller tarafından hücresel hasarın oluşmasında ana hedef moleküldür. Hücrelerin oksijen radikallerine maruz kalması hücre zarındaki lipit peroksidasyonuna yol açtığı, bunun sonucunda da hücre proteinlerinin degradasyonuna sebep olarak membranın fonksiyonel özelliklerini değiştirdiği bildirilmiştir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Yıkım sonucu başta malondialdehit (MDA) olmak üzere 4-hidroksinonenal, lipit hidroperoksitler gibi oldukça toksik ve zararlı yan ürünler ortaya çıkar.

Eritrositlerde yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri, moleküler oksijen ve ferroz demir bulunmaktadır (Clemens ve Waller, 1987). Hemoglobinin otooksidasyonundan dolayı eritrositlerde sürekli oksijen radikali üretilir. Eritrositler oksidatif strese maruz bırakıldığında bozulmuş bir membran geçirgenliği ve hemoliz oluşumu gözlenmiştir (Van Der Zee vd., 1985).

Dolaşımdaki eritrositlerin yaşam süresi, mekanik özelliklerini etkileyen faktörlerle (hücresel deformabilite) ilgili gözükmektedir. Hücre şekli ve yüzey alanı veya hücre hacmi oranı gibi ekstrinsik özellikler, internal viskozite ve membran mekanik davranışı gibi intrinsik özellikler hücresel deformabiliteyi oluşturmaktadır. Serbest radikallerin başlattığı eritrosit membran lipid peroksidasyonu sonucu eritrosit

deformabilitesinin bozulmasının ve splenik sekestrasyonun, eritrosit yaşam süresinde azalmaya neden olan en önemli faktörler olduğu bildirilmiştir (Ersoy ve Dilek, 1999).

1.7. Çay Bitkisinin Özellikleri

Çay, *Camellia sinensis* adındaki bitkinin yapraklarından elde edilir. 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 üç ana kategoriye ayrılmaktadır. Yeşil çay fermente edilmemiş, siyah çay tam fermente edilmiş ve oolong çay ise, yarı fermente edilmiş özelliktedir (Vinson vd., 2004). Dünya’da üretilen ve tüketilen çayın % 78’si siyah çay, % 20’si yeşil çay ve % 2 oranında ise oolong çaydır. Çay yaprağının çok karmaşık olan kimyasal ve biyokimyasal kapsamı üzerindeki çalışmalar bir yüzyıldan fazla zamandan beri sürdürülmektedir (Kacar, 1987). Çay, aynı zamanda tıbbi olarak da çok eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Çayın bu özelliği kimyasal bileşeni ile ilişkilidir. Çayın kimyasal bileşenlerinde proteinler, polifenoller, polisakkaritler, klorofil, mineraller ve eser elementler, uçucu bileşikler, amino ve organik asitler, ligninlerin ve alkaloidler (kafein, teofilin, ve teobromin) bulunmaktadır (Çekil, 2006).

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 (Chen vd., 2009). Çay yaprağının kimyasal bileşimi Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Çay yaprağının bileşimi.

Bileşen	% Kuru Madde	Bileşen	% Kuru Madde
Flavanoller	17-30	Kafein	3-4
Epigallokateşingallat (EGKG)	9-13		
Epikateşingalat(EKG)	3-6	Aminoasit ve protein	15-19
Epigallokateşin(EGK)	3-6	Basit karbohidratlar	4
Gallokateşin (GK)	3-4	Polisakkaritler	13
Epikateşin (EK)	1-3	Kül	5
Kateşin	1-2	Selüloz	7
		Lignin	6
Flavanoller, flavanol glikozitleri	3-4	Lipitler	2-3
Polifenolik asitler	2-3	Pigmentler	0,5
Leukoantosiyeninler	5	Organik asitler	0.5-1.5
Toplam polifenoller	30-36		

Çayın aranan bir içecek olmasının önemli bir nedeni de içerdiği alkaloid maddelerdir. Alkaloid madde olarak bilinen kafein, teobromin ve teofilin pürin türevleridir. Çayın insanlarda yorgunluk giderici, canlılık verici etkisi, içerdiği kafein ile ilişkilidir. Ülkemizde yoğun bir şekilde tüketilen çay içeceğinin katı ekstresinde bileşenlerin yaklaşık olarak ortalama yüzde oranları; kateşinler (% 3-10), theaflavinler (% 3-6), thearubiginler (% 12-18), flavanoller (% 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 (Graham, 1992). Şekil 8’de çay bitkisinin resimleri verilmiştir.



Şekil 8. Çay bitkisinin resimleri.

Tablo 6. 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 engeller,
- H.pylori'nin (bir bakteri türü) neden olduğu gastrik hastalıkları kontrol eder,
- Human papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu cervical lezyonların (rahim yolunda oluşan anormal değişiklik) tedavisinde kullanılır,

- Normal hücreleri, kanserli hücrelerin yayılımından korur,
- Serbest radikal baskılanmasına aracılık eder,
- Cilt için bir anti-inflamatuar (enfeksiyon sonucu oluşan iltahaplanmalara karşı) etkisine sahiptir,
- Meme kanseri, akciğer kanseri, kolon (kalın bağırsak) kanseri riskini düşürür,
- Alkol kullananlarda, sigara içenlerde oluşabilecek kanser riskini azaltır,
- PCP (pentaklorofenol) kirleticilerinin sebep olduğu kanser riskini düşürür,
- Rahim yolu kanseri tedavisinde kullanılır,
- Tümör gelişimine karşı prostatı, mesaneyi korur,
- Beyinde lipit oksidasyonunu azaltır,
- Kemik iliği lösemili hücrelerinin büyümesini kontrol altında tutar,
- Aterosklerosis'i (damar tıkanıklığı) önler,
- Parkinson ve Alzheimer hastalığını önler,
- Cilt tümörü, periodontal hastalıklar ve kellik tedavisinde etkilidir,
- Meme kanseri tümörlerinin gelişimini durdurur,
- Kataraktı önlemeye yardımcı olur,
- Bozulmaya uğramış sinir hücreleri hastalıklarının tedavisinde etkili olur,
- Diyabet tedavisinde yararlıdır,
- Alkolün karaciğere verdiği zararları önleyebilir,
- Gırtlak kanserini önleyebilir,
- Romatizmal iltihaplanmaları 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 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ile ilgili bilgiler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Denemelerde kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Markası
Öğütücü (Blender)	Straume
Elisa okuyucusu	Thermo Multiskan™ FC Microplate Photometer
Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı)	Heidolph Laborota 4000
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert
Isıtıcı magnetik karıştırıcı	Wisestir-MSH-20A
Isıtıcı çalkalayıcı	Memmert
Santrifüj	Thermo scientific Heraeus multifuge 3SR+
Etiv	Memmert
pH metre	Hanna HI 2210
Mikroplaka yıkayıcısı	BioTek Elx50
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu	Bosh
Hassas Terazi	Acculab sartrius group
Vorteks	Velp scientica

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. 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	0.1 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim 25 mL’ye tamamlanır.
0.154 M NaCl (Serum Fizyolojik) 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.
2- Tiyobarbütirik Asit (TBA) Çözeltisi	0.1 g NaOH ve 0.1 g 2-tiyobarbütirik asit (TBA) alınır ve son 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 metonelle 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 çözeltiyle son hacim 100 mL’ye tamamlanır.
% 0.02’lik DTNB Çözeltisi (w/v)	20 mg DTNB bir miktar % 1’lik sodyum sitrat çözeltisiyle çözümlenip son hacim aynı çözeltiyle 100 mL’ye tamamlanır.
1 mM Stok İndirgenmiş Glutasyon Çözeltisi	30 mg GSH bir miktar saf suda çözümlenerek son hacim 100 mL’ye tamamlanır.
0.01 M, Fosfat Tamponu (pH 7,0)	1.56 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, yaklaşık 800 mL deiyonize suda çözümlenerek 1 N NaOH ile pH’sı 7’ye ayarlandı ve hacim 1 L’ye tamamlandı.

80 U/L, Ksantin oksidaz, (XOD)	25 µL orijinal XOD (50 U, 20.000 U/L) süspansiyonundan alınarak hacim, 10 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. Günlük hazırlandı.
50 mM, CAPS [3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit] (pH 10,2)	5.5 g CAPS, 450 mL deiyonize suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 10.2'ye ayarlandıktan sonra hacim 500 mL'ye tamamlandı.
Substrat Karışımı	Ksantin, 0.05 mM: 1.9 mg ksantin tartılarak 250 mL CAPS tamponunda çözüldü (+4 °C'de 10 gün kararlıdır). INT, 0.025 mM: 3.16 mg INT tartılarak 250 mL CAPS tamponunda çözüldü (+4 °C'de 10 gün saklanabilmektedir).
SOD standartları, Orijinal SOD (30000 U/L)	Orijinal SOD'dan fosfat tamponu ile seyreltmeler yapılarak 10 U/mL 8 U/mL, 4 U/mL, 2U/mL, 1 U/mL ve 0.5 U/mL'lik standartlar günlük hazırlandı.
50 mmol/L, Fosfat tamponu (pH=7,0)	a) 6.81 g KH ₂ PO ₄ deiyonize suda çözüldü. Hacim 1000 mL'ye tamamlandı. b) 8.90 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O deiyonize suda çözüldü. Hacim 1000 mL'ye tamamlandı. a ve b çözeltileri 1:1,5 oranında birbiri ile karıştırılarak fosfat tamponu hazırlandı. Gerektiğinde pH asit-baz ilavesiyle ayarlandı.
Hidrojen peroksit (30 mmol/L)	0.34'lük H ₂ O ₂ alınarak hacim fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).
0.1 M, Fosfat tamponu (pH: 7.0)	13.61 g KH ₂ PO ₄ tartıldı. 800 mL deiyonize suda çözüldü. pH, 1N KOH ile 7'ye ayarlandıktan sonra hacim 1 L'ye tamamlandı.
0.1 M, Glutasyon, redükte form (GSH)	60 mg tartılarak 2 mL deiyonize suda çözüldü.
EDTA, 0.2 M	0.74 g EDTA tartılarak 10 mL deiyonize suda çözüldü.
Glutasyon redüktaz, 10 U/mL	8 µL orijinal şişeden alınarak hacim deiyonize su ile 5 mL'ye tamamlandı.
NaN ₃ , 0.4 M Çözeltisi	0.26 g sodyum azid tartıldı, deiyonize suda çözümlenerek, hacim 10 mL'ye tamamlandı.
NADPH, 2 mM	17 mg tartılarak hacim deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlandı.
H ₂ O ₂ % 30 (w/w), 10 mM Çözeltisi	11.4 µL orijinal (% 30 w/w) şişeden alınarak 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.
Fosfat tamponu 0.12 M, pH 7.2 (37°C)	16.33 g KH ₂ PO ₄ yaklaşık 800 mL suda çözüldü, pH 1 M NaOH ile 7.2'ye getirildi ve hacim 1 litreye suyla tamamlandı.
EDTA (15 mM)	0.56 g EDTA-Na ₂ .2H ₂ O 100 mL suda çözüldü.

Flavin adenin dinükleotid, FAD (155 M)

12.5 mg FAD (disodyum tuzu) 100 mL suda
çözüldü.

Okside glutatyon GSSG (65.3 mM)

40 mg GSSG 1 mL suda çözüldü.

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları
Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. 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	GSH	Sigma
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma	INT	Sigma
HCl	Merck	Ksantin	Sigma
Kateşin	Sigma	CAPS	Sigma
Metanol	Merck	NaCl	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck	Ksantin Oksidaz	Sigma
NaOH	Merck	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Merck
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Merck
SOD	Sigma	K ₂ HPO ₄	Merck
H ₂ O ₂	Merck	İndirgenmiş Glutatyon	Sigma
DMSO	Merck	TBA	Merck
GSSG	Sigma	NaN ₃	Merck
Glutatyon redüktaz	Merck	NADPH	Merck
FAD	Sigma	KH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Sigma	KOH	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 10’da şu şekilde kodlanmıştır.

Tablo 10. 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 (Henning vd., 2004). 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 liyofilizatör yardımıyla yoğunlaştırıldı. Özütler DMSO’da çözülerek sonraki tayinlerde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.4. Özütlerde Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

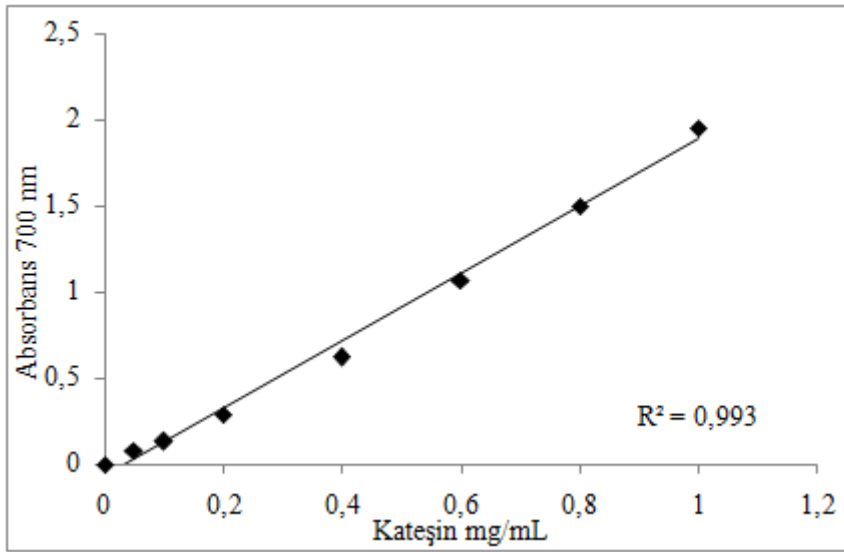
Yöntem, metanol ve etil asetat çözücülerinde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifli ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 700 nm’de maksimum absorbans verir (Slinkard ve Singleton, 1977). Özütler içindeki toplam fenol miktarları, 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 11’deki gibi pipetleme yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı

ve bu zaman sonunda 700 nm’de köre karşı okuma yapıldı ve Şekil 9’da verilen kalibrasyon grafiği elde edildi.

Oluşturulan bu grafikten numunelerin absorbansları standart grafik aralığında olacak şekilde seyreltmeleri yapılarak toplam fenolik içerikleri hesaplandı.

Tablo 11. Polifenol tayini için pipetleme miktarları.

	Kör (mL)	Numune (mL)	Standart (mL)
Numune	-	0.05	-
Standart	-	-	0.05
Deiyonize su	2.55	2.50	2.50
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 9. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği.

2.5. 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 (Cuendet vd., 1997). 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 mikropilaya 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 absorbanı verdiği 517 nm'de absorbanlar okundu (Cuendet vd., 1997). Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC_{50} değerleri μM cinsinden hesaplandı.

2.6. Eritrositlerde MDA Tayini

2.6.1. Eritrosit Paketinin Hazırlanması

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden alınan tam kanlar öncelikle 3000 rpm'de 15 dakika 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 hemoglobini değeri ölçüldü.

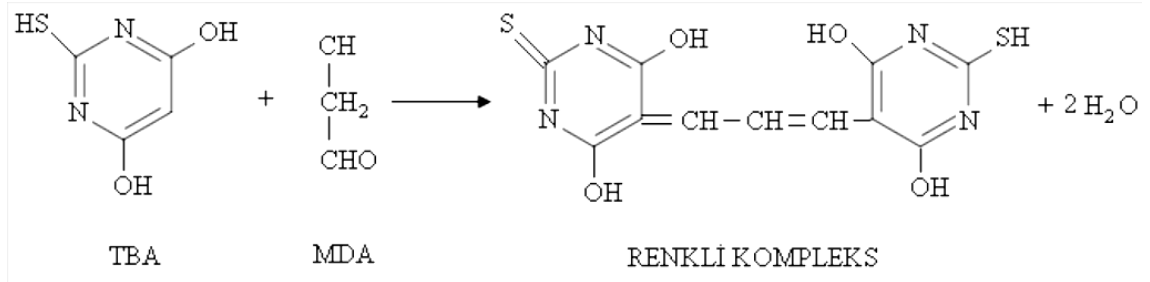
2.6.2. Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması ve Çay Özütleriyle Preinkübasyon

Reaksiyon ortamının hazırlanmasında Stocks ve Dormandy metodu kullanıldı (Stocks ve Dormandy, 1971). Hazırlanan eritrosit paketi hastanede okunan hemoglobini değeri göre son konsantrasyonu 3 g/dL olacak şekilde PBS'li 0.02 M NaN_3 ile seyreltilip, 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılarak stok çözelti hazırlanmış oldu. Hazırlanan çalışma tüplerine 2 mL stok, üzerine çalışma ortamında 100 μM konsantrasyonda çay özütlerinin bulunduğu numune grubu, kateşin içeren standart grubu ve sadece PBS ihtiva eden kör tüpü olmak üzere 3 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 MDA tayini yapıldı.

2.6.3. MDA Tayini

TBARS, lipidlerin peroksidasyonu sonucunda oluşan ve büyük bir kısmı malondialdehit (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. Meydana gelen reaksiyon Şekil 10'da gösterildi.



Şekil 10. MDA ile TBA'nın tepkimeye girdiği reaksiyon.

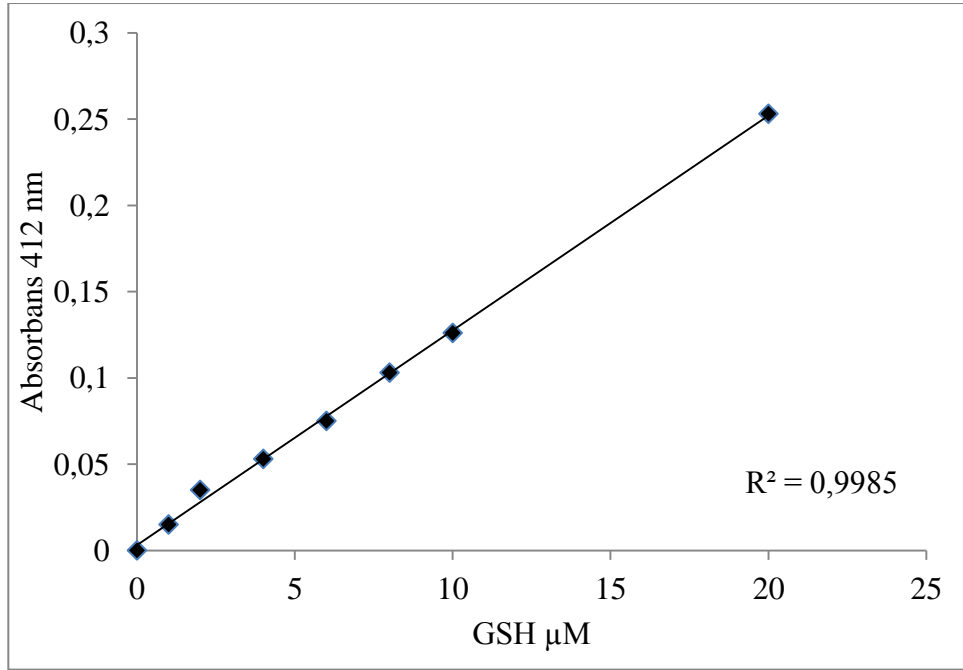
İnkübasyon sonrası çalışma tüplerinden 900 µL alınarak üzerine 600µL TCA çözeltisi ilave edildi ve 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından 800 µL süpernatant alınarak üzerine 400 µL günlük taze olarak hazırlanan TBA çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okundu ve MDA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Stocks ve Dormandy, 1971).

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

2.7. Eritrosit Toplam Tiyol Düzeylerinin Belirlenmesi

Eritrosit toplam tiyol miktarı Sedlak ve Lindsay protokolü modifiye edilerek belirlendi (Sedlak ve Lindsay, 1968). Önce 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 20 µM

konsantrasyonlarında indirgenmiş glutatyon kullanılarak standart grafiği oluşturuldu ve Şekil 11'deki grafikten faydalanarak toplam tiyol miktarı 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 özütsüz çalışma grupları hazırlandı ve 1 saat 37 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonunda tüm çalışma gruplarına % 5'lik TCA eklendi ve karışım 5.000 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 11'de verilen standart grafiği üzerinden 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.



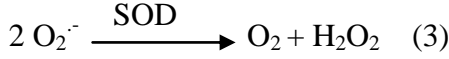
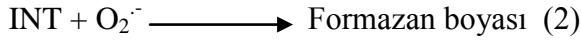
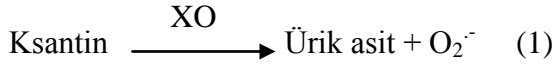
Şekil 11. Glutatyon standart grafiği.

2.8. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini

2.8.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi toksik süperoksit radikalının (O₂⁻) dismutasyon reaksiyonunu katalizler. Tayin için kullanılan metodda ksantin ve ksantin oksidaz (XO) ile süperoksit radikali oluşturulup, oluşan bu radikal 2-(4-iodofenil)-3-(4-

nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorür (INT) boyası ile kırmızı renkli formazon boyası oluşturması esasına dayanır. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyonu ile ölçülür.



Standart grafiğın çizilebilmesi için konsantrasyonu 50 U/mL olan stok SOD kullanıldı. Bu SOD standardı 0.01 M'lık pH'sı 7 olan fosfat tamponu ile dilüe edilmek suretiyle sırasıyla 10 U/mL, 8 U/mL, 6 U/mL, 4 U/mL, 2 U/mL, 1 U/mL, 0,5 U/mL ve 0,25 U/mL'lik standartlar hazırlandı. Her bir standart için ksantin oksidaz metoduna göre % inhibisyon değeri bulundu. SOD tayininde kullanılan eritrosit hemolizatından 50 µL alınıp 0,01 M'lık pH'sı 7 olan fosfat tamponu ile 3 mL'ye tamamlandı. SOD tayini için pipetlemeler Tablo 12'deki gibi yapıldı.

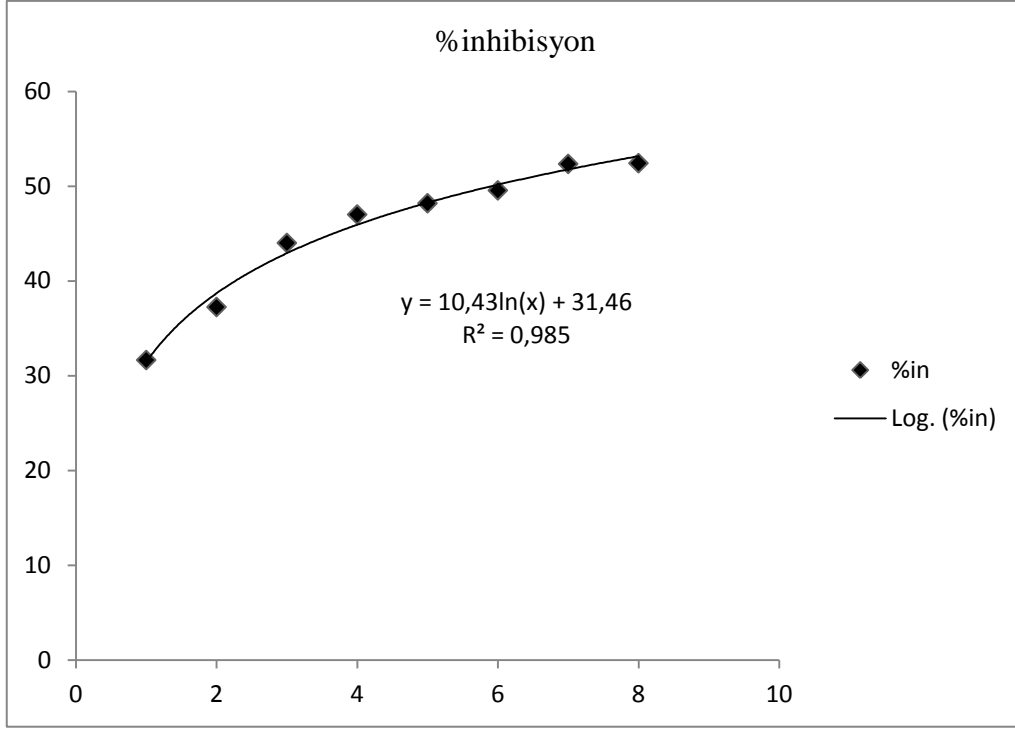
Tablo 12. SOD enzim aktivite tayini için pipetleme miktarları.

Reaktifler	Reaktif körü (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Dilüe edilmiş numune	-	-	50
Standart	-	50	-
Fosfat tamponu	50	-	-
Substrat karışımı	1700	1700	1700
İyice karıştırılır 37 °C'de 10 dak. İnkübe edilir			
Ksantin oksidaz	250	250	250

Küvetler tekrar karıştırılarak 30 s'lik bir gecikme fazından sonra 505 nm'de ve 37 °C'de başlangıç absorbansı (A₁), 3 dakika sonra son absorban okundu (A₂) ve aşağıdaki denklemle % inhibisyon bulundu.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(\Delta A_{\text{numune}} (\text{standart})) / (\Delta A_{\text{çalışma körü}})] \times 100$$

Şekil 12'de standart SOD değerleri kullanılarak % inhibisyona karşı konsantrasyon grafiğı çizildi.

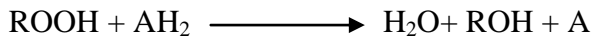
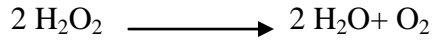


Şekil 12. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği.

SOD % inhibisyonu standart grafiğinden elde edilen; $y = 10,43 \ln(x) + 31,46$ doğru denklemi kullanarak numunelerin SOD konsantrasyonu U/mL olarak belirlendi. Aktiviteler eritrositlerde g Hb başına ifade edildi.

2.8.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

240 nm'de H_2O_2 absorbans verir. H_2O_2 'nin katalaz tarafından parçalanmasından dolayı absorbanstaki azalma takip edilerek aktivite tayini yapıldı.



Tablo 13. Katalaz aktivitesi için pipetleme miktarları.

Reaktifler	Kör (µL)	Numune (µL)
Fosfat tamponu	500	-
Eritrosit paketi	1000	1000
H ₂ O ₂	-	500

Hidrojen peroksit ilave edilir edilmez küvet altüst edildi ve 30 sn süreyle her 10 sn'de bir kaydedilmek suretiyle 240 nm'de absorbanstaki düşüş izlendi. Başlangıç absorbansı yaklaşık 0.500 olması gerekir. Eğer bu değer in altında ya da üstünde ise H₂O₂'nin konsantrasyonu yeniden ayarlandı. Reaksiyon sırasında küvette kabarcıklar oluşmamasına dikkat edildi. Deneyde kuvartz küvet kullanıldı.

$$\Delta A_{240}/\Delta t = 15s^{-1} \cdot 0.100' \text{ den büyük olmamalı, } 0.020' \text{ den de küçük olmamalıdır.}$$

Sonuçların Hesaplanması

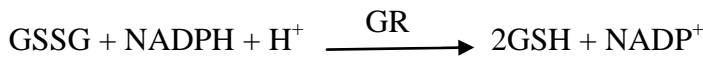
Katalaz aktivitesini belirtmede kabul edilen herhangi bir birim olmamasına rağmen birinci derecede reaksiyon hız sabitinin (k) kullanılması tavsiye edilmektedir. Buna göre 15 s'lik zaman aralığı için aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak aktivite hesaplaması yapıldı.

$$k = (2.3/15) \times \log(A_1/A_2) = 0.153 \times \log(A_1/A_2) \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

Burada; A₁: Başlangıç absorbansı, A₂: 15 s sonraki absorbans gram hemoglobin başına düşen k hesaplandı (k/g Hb).

2.8.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon peroksidaz GSH'nın H₂O₂ tarafından GSSG'ye oksidasyon reaksiyonunu katalizler. GSSG'nin oluşum hızı GR reaksiyonu ile ölçüldü.

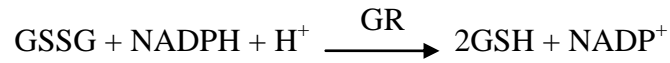


NADPH'in oksidasyonu 340 nm'de izlendi. Reaksiyon karışımına katalazı inhibe etmek için sodyum azidür ilave edildi. Aksi halde H₂O₂, katalaz tarafından parçalanır. Glutasyon, glutasyon redüktaz, NADPH ve H₂O₂ çözeltileri günlük hazırlandı. Çalışma süresince tüm reaktifleri +4 °C'de saklandı. Tablo 14'e göre pipetlemeler yapıldı.

Tablo 14. GSH-Px aktivitesi için pipetleme miktarları.

Reaktifler	Kör (µL)	Numune (µL)
Fosfat tamponu	500	500
GSH	50	50
EDTA	50	50
GR	100	100
NaN ₃	20	20
NADPH	100	100
Hemolizat	-	20
Distile su	160	140
Karışım 37 °C'de 10 dak. inkübe edildi		
H ₂ O ₂	20	20

2.8.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü



Yukarıdaki reaksiyon gereği NADPH'in oksidasyonu ile absorbanstaki azalma izlenerek katalitik aktivite tayin edildi. Bu reaksiyon çift yönlü olup, GSH oluşumu lehinedir. NADPH'daki azalma 340 nm'de takip edilmesiyle kinetik olarak ölçüldü.

Tablo 15. GR aktivitesi için pipetleme miktarları.

Reaktifler	Kör (μL)	Numune (μL)
Fosfat tamponu	2.700	2600
EDTA	100	100
FAD	100	100
GSSG	100	100
Numune	-	100
Küvet hızlıca karıştırılır 5 dak. 37 °C'de inkübe edilir		
NADPH	50	50

2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar aritmetik ortalama (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-Simirnow testi ile değerlendirildi. Çalışma gruplarına ait ilgili parametreler normal dağılıma uyduğu için anlamlılık 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. Çay ve Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri

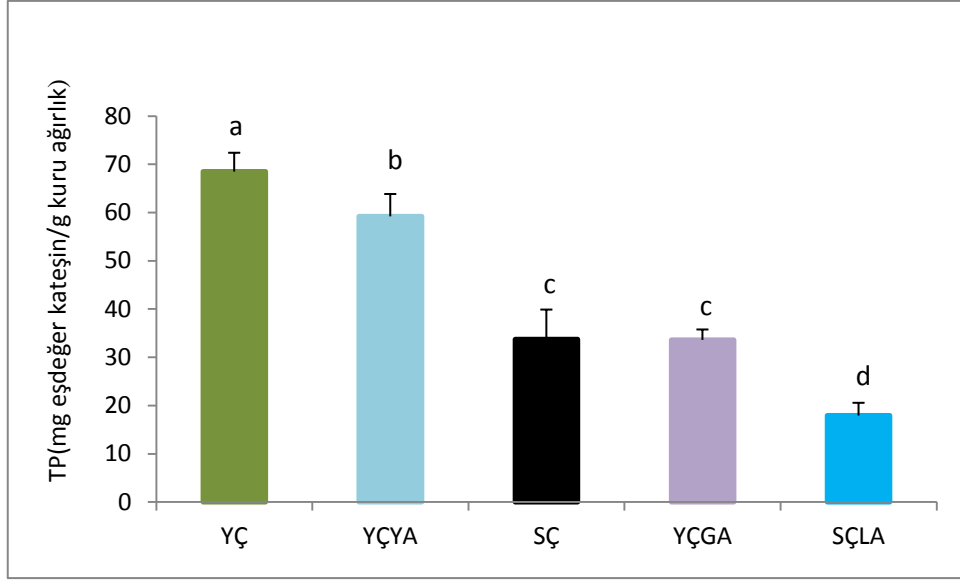
Gram kuru ağırlık başına düşen mg kateşin eşdeğer olarak belirlenen fenolik madde miktarları Tablo 16’da verilmiştir. En yüksek fenolik madde muhtevası yeşil çayda gözlenirken siyah çayın lif atığında bu içerik en düşük seviyededir.

Tablo 16. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları.

Çalışma Grupları (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 miktarı hem siyah çayın toplam fenolik madde miktarından hem de çay atıklarındaki toplam fenolik madde miktarından daha yüksek bulunmuştur. Siyah çay numunesinin de kendi atığı ile karşılaştırıldığında da daha yüksek fenolik madde içerdiğine sahip olduğu ortaya konuldu. Sadece çay atıklarının toplam fenolik düzeyleri değerlendirildiğinde YÇYA’nda en yüksek fenolik muhtevası belirlenmiş (p<0,001) hatta siyah çaydan çok daha yüksek düzeyde fenolik içeriği bulunmuştur (p<0,001). Çay ve atıklarının toplam fenolik madde miktarları Şekil 13’te grafiksel olarak verilmiştir.



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

Şekil 13. 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. Çay ve Atıklarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

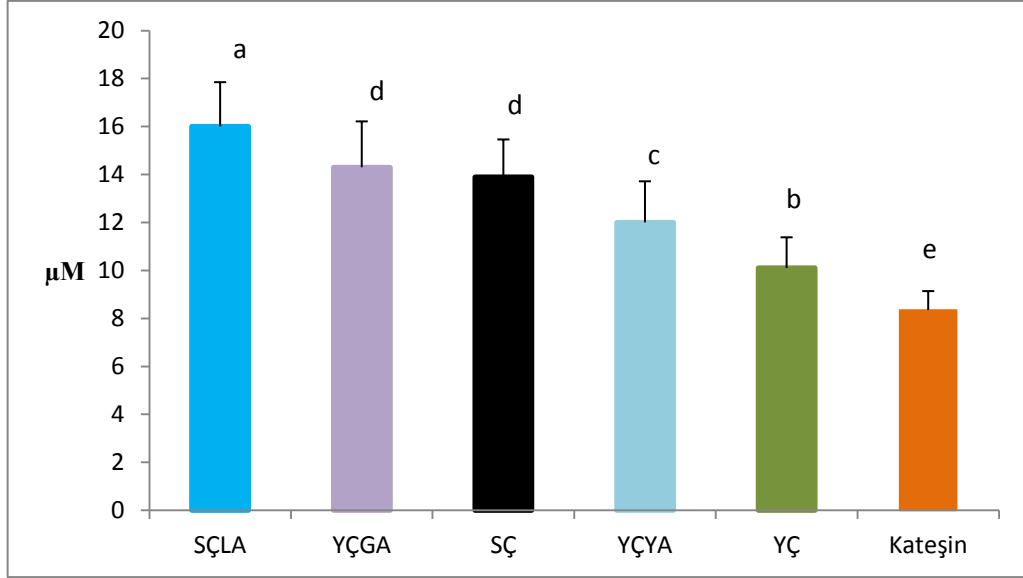
Numunelerde DPPH radikali temizleme yöntemiyle belirlenen örneklerin antioksidan kapasiteleri Tablo 17'de gösterilmiştir. Antioksidan aktiviteler, numunelerin farklı konsantrasyonları kullanılarak IC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Tablo 17. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri.

Çalışma Grupları (n=15)	DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi (IC₅₀ µM eşdeğer kateşin)
Kateşin	8 ± 0.8 ^a
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.

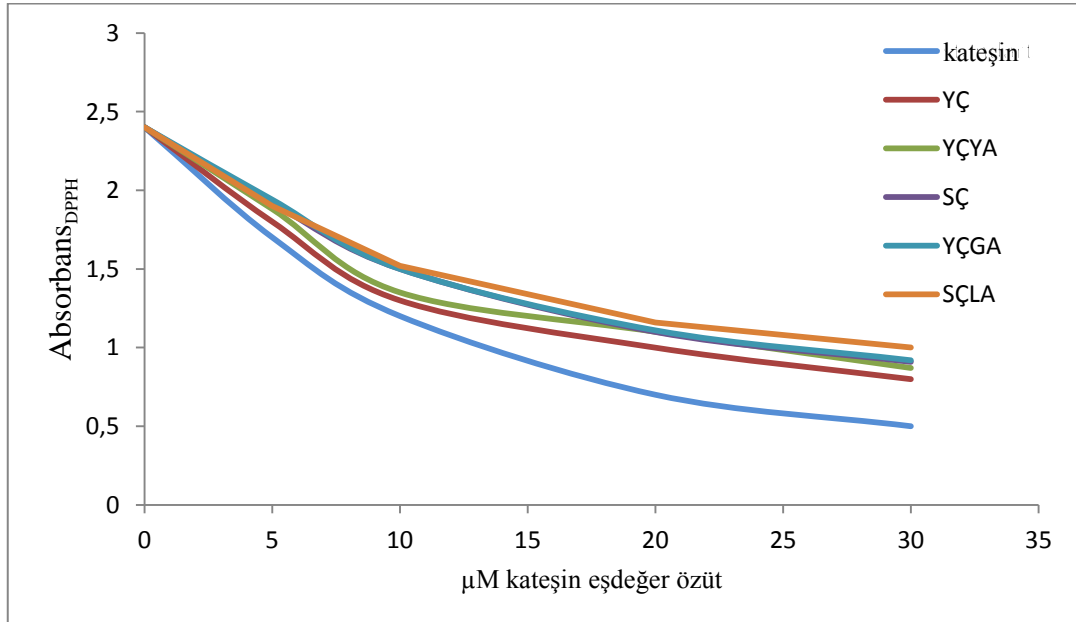
Ayrıca standart olarak kateşin kullanılarak numuneler arasında kıyaslama yapılmıştır. IC₅₀ değeri en düşük olan numunenin DPPH radikali temizleme aktivitesinin en yüksek olduğu göz önünde bulundurulduğunda yeşil çayın siyah çay ve diğer çay atıklarına göre radikal temizleme aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Siyah çay ve yeşil çay gövde yaprağının IC₅₀ değerlerinin ise birbirine istatistiksel olarak fark teşkil etmeyecek kadar yakın olduğu Şekil 14’te gösterilmiştir. Bu değerlerin numunelerin fenolik içerikleriyle paralellik göstermesi ilgi çekicidir. Numunelerin DPPH radikal temizleme aktivitelerini şu şekilde sıralanmaktadır: kateşin > YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA.



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

Şekil 14. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri.

Numunelerin ve standart olarak kullanılan kateşinin DPPH radikal temizleme aktivitelerinin kinetiğini gösteren ve IC_{50} değerlerini veren grafik Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15. Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik.

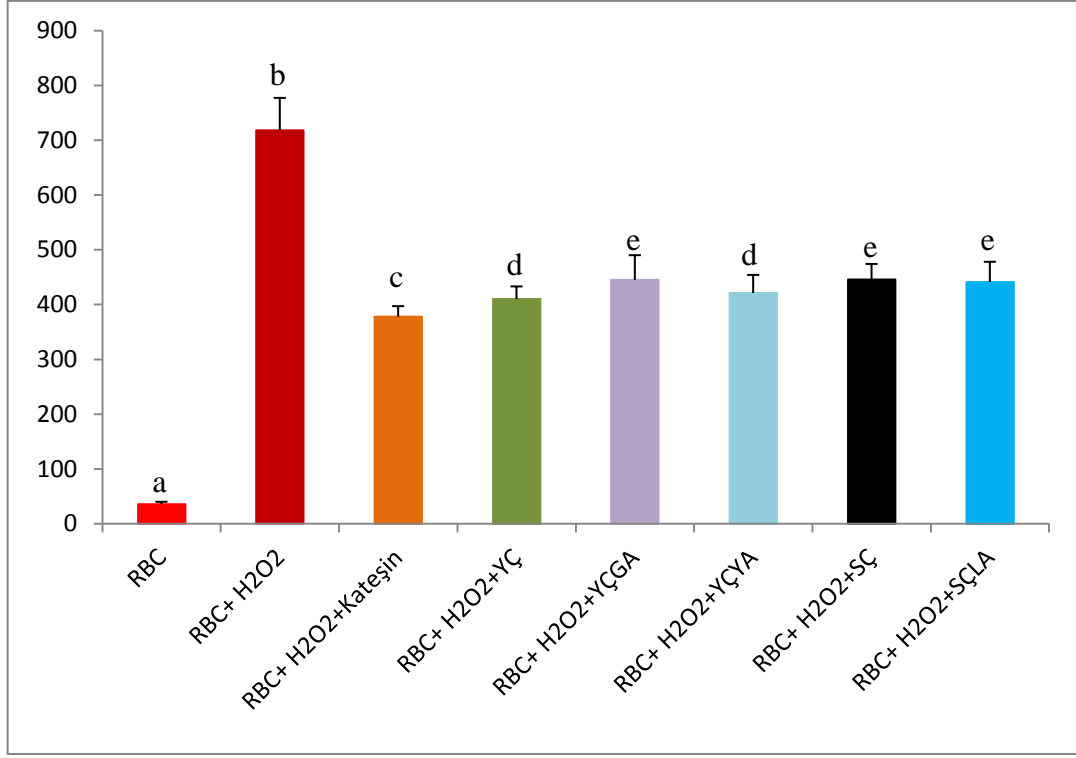
3.3. ay ve Atıklarının Oksidatif Stres Altındaki Eritrositlerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri

Numuneler ile preinkübe edilen eritrositlerdeki MDA'ların değerlendirilmeleri Tablo 18'de gösterilmiştir. Yeşil ay ve yeşil çay yaprak atığının diğer özütlerle oranla daha etkili olduğu fakat anlamlı bir fark olmayacak kadar MDA değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca siyah çay, siyah çay lif atığı ve yeşil çay yaprak atığının MDA değerleri birbirine istatistiksel anlamda bir fark yaratmayacak kadar yakın olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 18. H₂O₂ aracılı oksidatif strese maruz bırakılan ve çay örnekleriyle (100µM) preinkübe edilen eritrositlerde MDA değerleri.

Çalışma Grupları (n=12)	MDA (µM/gHb)
RBC	36 ± 4 ^a
RBC+ H ₂ O ₂	718 ± 59 ^b
RBC+ H ₂ O ₂ +Kateşin	378 ± 19 ^c
RBC+ H ₂ O ₂ +Y	410 ± 23 ^d
RBC+ H ₂ O ₂ +YGA	445 ± 45 ^e
RBC+ H ₂ O ₂ +YYA	421 ± 33 ^d
RBC+ H ₂ O ₂ +S	441 ± 28 ^e
RBC+ H ₂ O ₂ +SCLA	446 ± 37 ^e

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



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

Şekil 16. Numunelerin MDA değerlerinin gösterimi.

Şekil 16'da değerlerine göre numunelerin lipid oksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri şu şekilde sıralanabilir: Kateşin > YÇ = YÇYA > SÇ = YÇGA = SÇLA.

3.4. Eritrosit Toplam Tiyol Düzeyleri

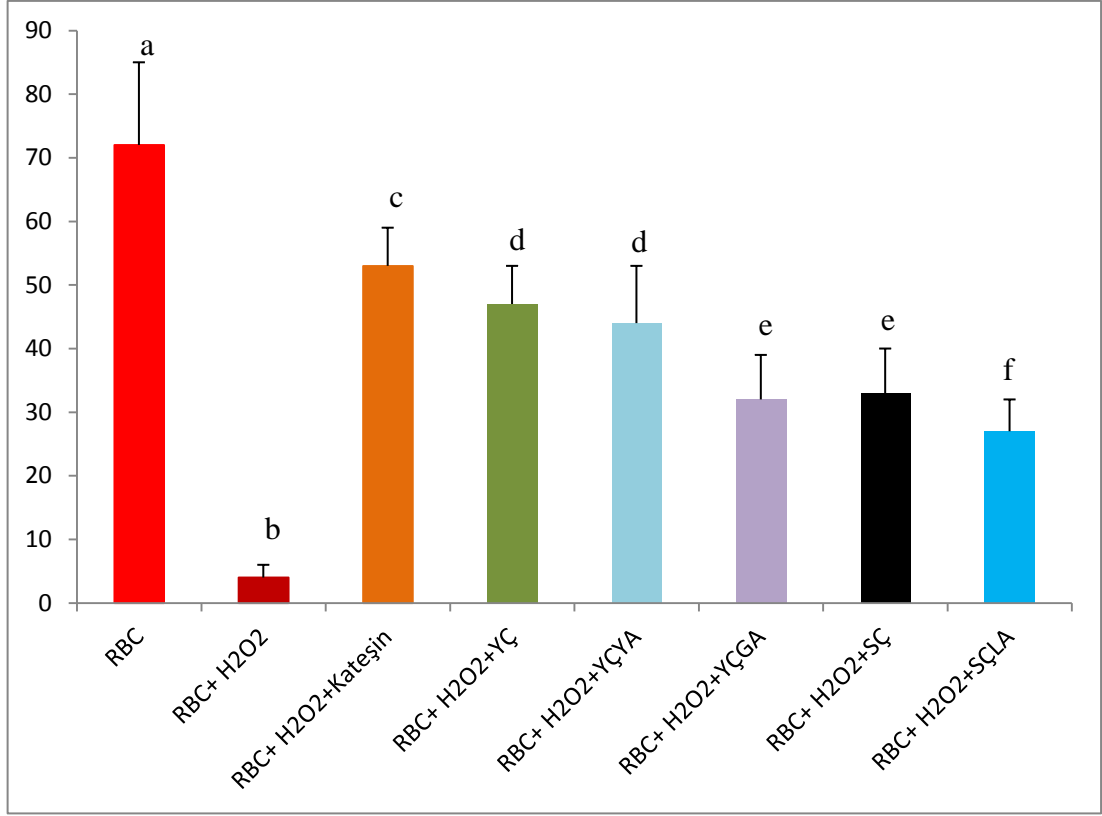
Eritrositlerde toplam tiyol miktarları, H_2O_2 ile oksidatif strese maruz bırakılan hücrelere $500 \mu M$ özüt ilave edilerek değerlendirilmiştir. Örneklerin eritrosit toplam tiyol düzeylerine olan etkisi Tablo 19'da verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda beklenildiği gibi intraselüler indirgenmiş potansiyelin en etkili koruması kateşin ilavesi ile görülmüştür. Çay örneklerinde ise diğer parametrelerde gözlenen değişimlere paralel şekilde yeşil çay ve yaprak atığının toplam tiyol düzeyine koruyucu etkisi belirlenmiştir. Bu değişimin $p < 0.01$ düzeyinde olduğu görülmüştür.

Tablo 19. Çay örneklerinin eritrosit toplam tiyol düzeylerine olan etkisi.

Çalışma Grupları (n=8)	Toplam Tiyol Düzeyleri (µM GSH)
RBC	72 ± 13 ^a
RBC+H ₂ O ₂	4 ± 2 ^b
RBC+ H ₂ O ₂ +Kateşin	53 ± 6 ^c
RBC+H ₂ O ₂ +YÇ	47 ± 6 ^d
RBC+ H ₂ O ₂ +YÇYA	44 ± 9 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇGA	32 ± 7 ^e
RBC+H ₂ O ₂ +SÇ	33 ± 7 ^e
RBC+H ₂ O ₂ +SÇLA	27 ± 5 ^f

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

Eritrosit toplam toplam tiyol düzeylerine bakıldığında ortamdaki indirgenmiş glutatyonun varlığına sebep olan numune antioksidan kapasitesi en yüksek olarak değerlendirilmektedir. Buna göre, numunelerin antioksidan kapasiteleri Kateşin > YÇ = YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA şeklinde sıralanabilir. Ayrıca numunelerin eritrosit toplam tiyol düzeylerine olan etkisi Şekil 17’de verilmiştir.



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

Şekil 17. Standart ve farklı çay özütlerinin eritrosit toplam tiyol düzeyleri.

3.5. Çay ve Atıklarının Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Olan Etkileri

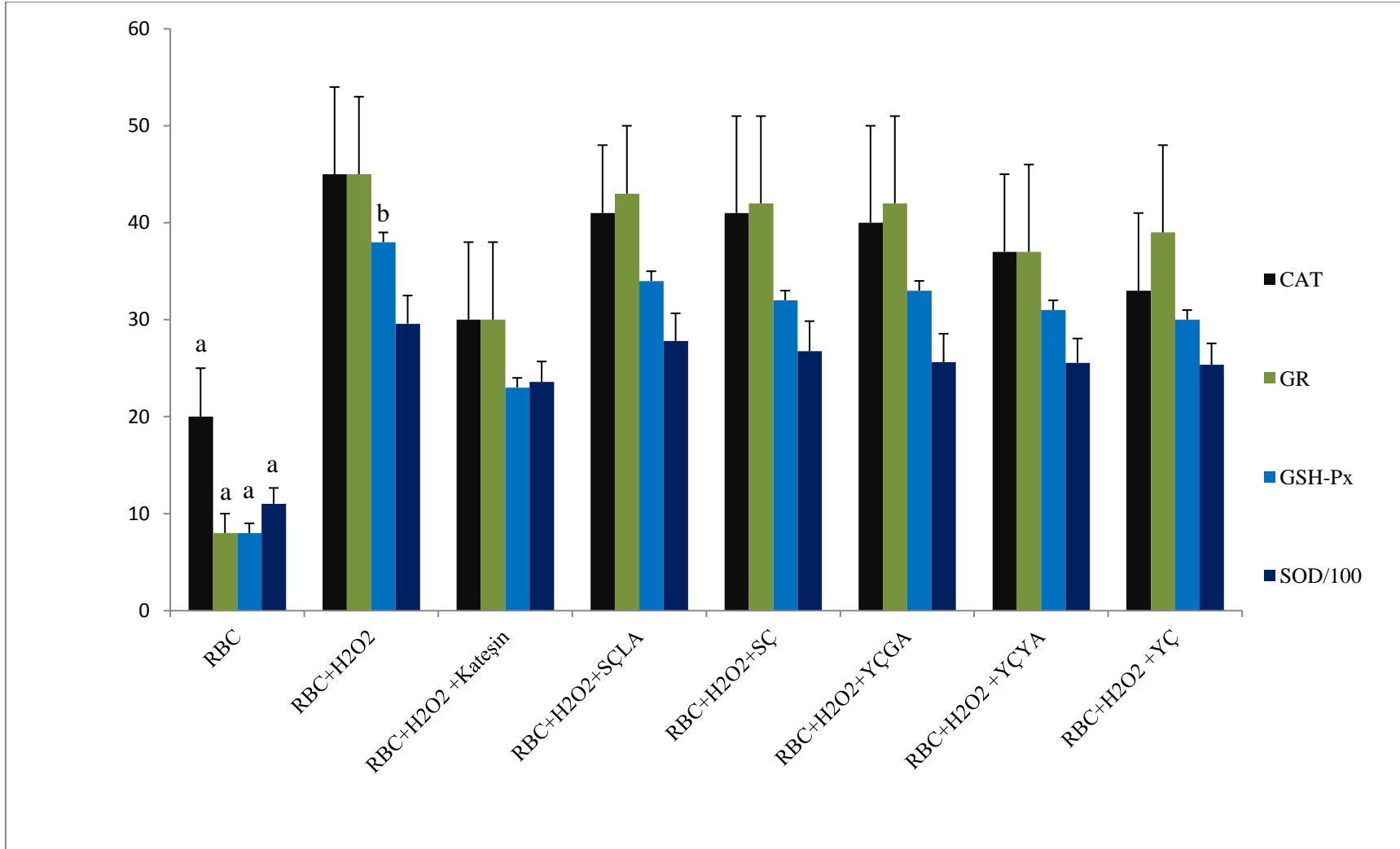
Oksidatif stres altındaki eritrositlerde antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiş ve gruplar arası bu değerler Tablo 20’de verilmektedir.

Tablo 20. Numunelerin antioksidan enzim aktiviteleri.

Çalışma Grupları (n=8)	CAT (U/g Hb)	GR (U/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)	SOD (U/g Hb)/100
RBC	20 ± 5 ^a	8 ± 2 ^a	8 ± 2 ^a	10 ± 2 ^a
RBC+H ₂ O ₂	45 ± 9	45 ± 8	38 ± 7 ^b	30 ± 3
RBC+H ₂ O ₂ +Kateşin	30 ± 8	30 ± 7	23 ± 5	24 ± 2
RBC+H ₂ O ₂ +SÇLA	41 ± 7	43 ± 7	34 ± 5	28 ± 3
RBC+H ₂ O ₂ +SÇ	41 ± 10	42 ± 9	32 ± 5	27 ± 3
RBC+H ₂ O ₂ +YÇGA	40 ± 10	42 ± 9	33 ± 6	26 ± 3
RBC+H ₂ O ₂ +YÇYA	37 ± 8	37 ± 9	31 ± 6	26 ± 3
RBC+H ₂ O ₂ +YÇ	33 ± 8	36 ± 9	30 ± 6	25 ± 2

^{a,b}: ilgili çalışma grubu ile diğer gruplararası en az p < 0,05 düzeyinde anlamlı farklılık vardır.

RBC'deki bütün enzimlerdeki aktivitesinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak p<0,001 düzeyinde farklılık göstermektedir. Aynı şekilde bütün enzim gruplarında aktivite Standart > YÇ > YÇYA >YÇGA > SÇ > SÇLA şeklinde sıralanmaktadır. Bu değişim Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Kateşin ve farklı çay özütlelerinin eritrosit antioksidan enzim aktiviteler üzerine etkileri.

3.5.1. Katalaz Aktivitesi

Eritrositlerde katalaz aktivitesi H_2O_2 ile oksidatif strese maruz bırakılan hücrelere 100 μM özüt ilave edilerek değerlendirilmiştir. Örneklerin eritrosit katalaz aktivitesi düzeyleri Tablo 21’de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda beklenildiği gibi intraselüler indirgenmiş potansiyelin en etkili koruması kateşin ilavesi ile görülmüştür. Çay örneklerinde yeşil çay katalaz aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu değişimin $p < 0.05$ düzeyinde olduğu görülmüştür.

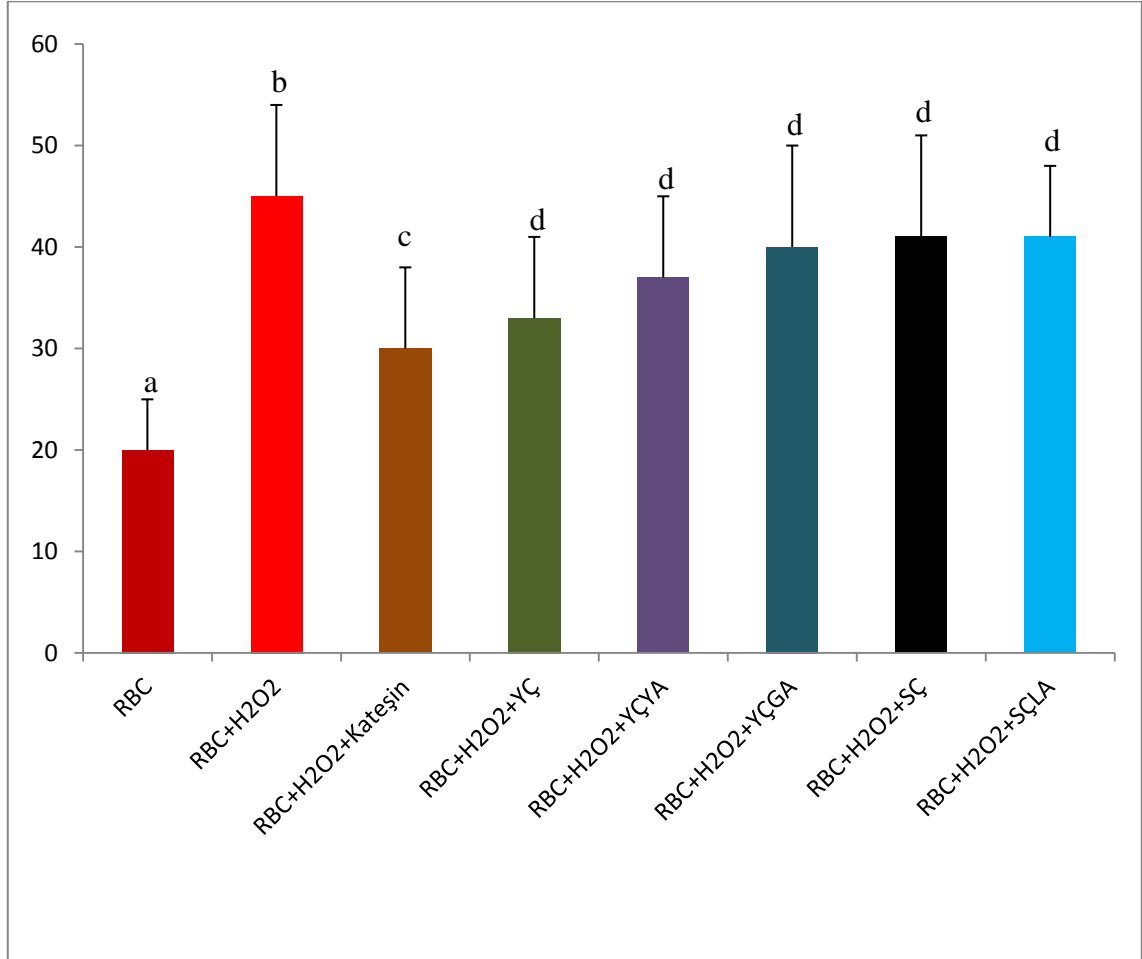
Tablo 21. Çay Örneklerinin Katalaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

Çalışma Grupları (n=8)	CAT Düzeyleri (U/g Hb)
RBC	20 ± 5^a
RBC+ H_2O_2	45 ± 9^b
RBC+ H_2O_2 +Kateşin	30 ± 8^c
RBC+ H_2O_2 +YÇ	33 ± 8^d
RBC+ H_2O_2 +YÇYA	37 ± 8^d
RBC+ H_2O_2 +YÇGA	40 ± 10^d
RBC+ H_2O_2 +SÇ	41 ± 10^d
RBC+ H_2O_2 +SÇLA	41 ± 7^d

^{a,b,c,d}; Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0.01$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Numuneler katalaz aktivitesi açısından karşılaştırıldığında RBC ile diğer bütün gruplar arasında istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde farklılık ortaya konuldu. Numuneler arasında ise en yüksek etki yeşil çayda gözlemlendi. Katalaz enzim aktivitesindeki değişimlerin gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı yükseklik sıralaması şu şekildedir; RBC+ H_2O_2 > RBC+ H_2O_2 +YÇ = YÇYA = YÇGA = SÇ = SÇLA > RBC+ H_2O_2 + Kateşin > RBC. Numunelerin, standartın ve sadece oksitatis

strese maruz kalmış olan hücrelerin katalaz enzim aktivitelerindeki değişimler grafiksel olarak Şekil 19’da verilmiştir.



Şekil 19. Çay Örneklerinin Katalaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

Aynı zaman da RBC+H₂O₂ ile kıyaslandığında yeşil çayla aralarında p <0,05 düzeyinde bir farklılık mevcut olduğu ortaya konuldu. Standardın enzim aktivitesi çay ve atıkları ile karşılaştırıldığında yeşil çay ve yeşil çay yaprak atığı ile bir fark mevcut fakat anlamlı değil iken siyah çay, siyah çay lif atığı ve yeşil çay gövde atığı arasında anlamlı bir ilişkisi olduğu belirlendi. Yeşil çay ve atıklarının enzim aktivitesi siyah çayınkinden daha yüksek tespit edildi.

3.5.2. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Eritrositlerde GR aktivitesi H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakılan hücrelere 250 µM özüt ilave edilerek değerlendirildi. Örneklerin eritrosit GR aktivitesi düzeylerine etkileri Tablo 22’de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en iyi GR aktivitesi kateşinle muamele edilen eritrositlerde tespit edilmiştir. Çay örneklerinde ise kateşine en yakın GR aktivitesi yeşil çayda belirlenmiştir. GR aktivitesi bakımında RBC ile diğer çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin mevcut olduğu belirtilmiştir. Bu değişim p < 0.001 anlamlılık düzeyindedir.

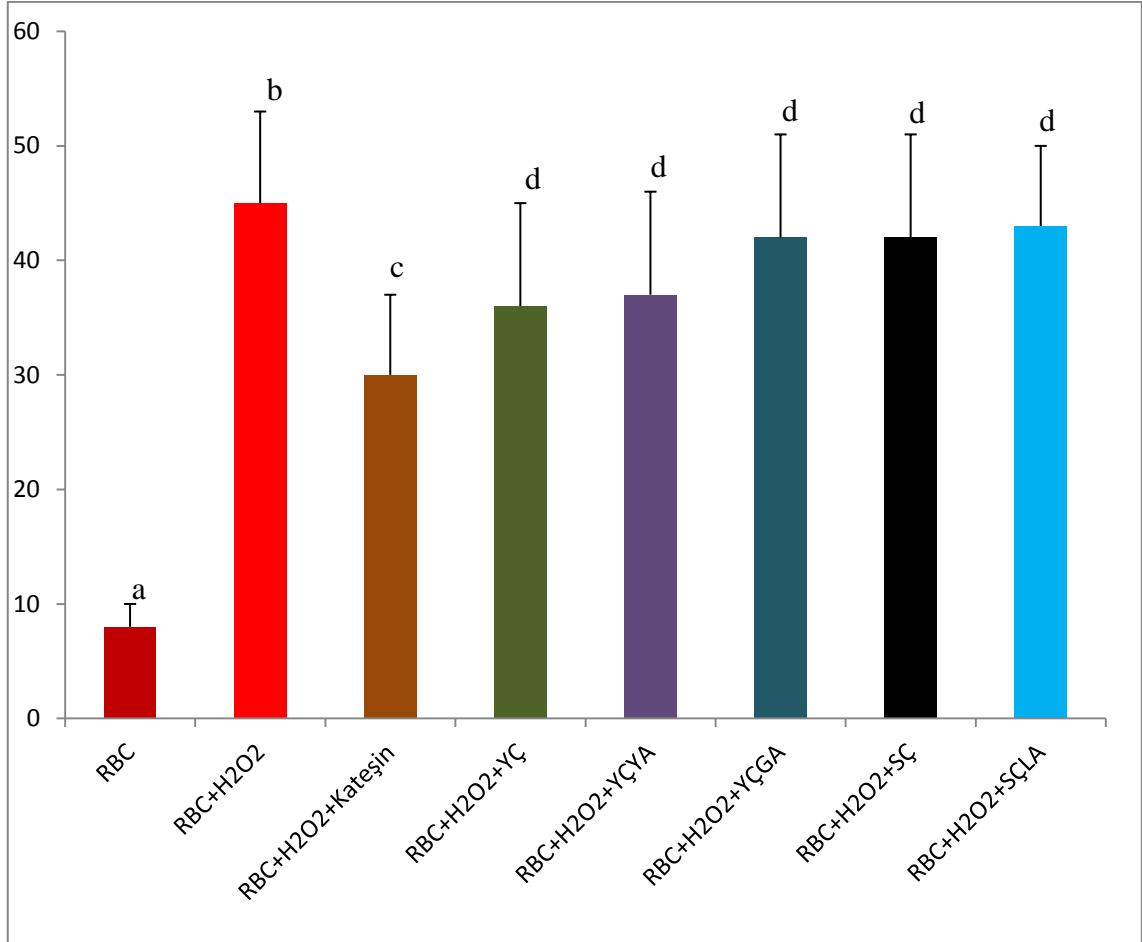
Tablo 22. Çay Örneklerinin GR Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

Çalışma Grupları (n=8)	GR Düzeyleri (U/g Hb)
RBC	8 ± 2 ^a
RBC+H ₂ O ₂	45 ± 8 ^b
RBC+H ₂ O ₂ +Kateşin	30 ± 7 ^c
RBC+H ₂ O ₂ +SÇLA	43 ± 7 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +SÇ	42 ± 9 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇGA	42 ± 9 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇYA	37 ± 9 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇ	36 ± 9 ^d

^{a,b,c,d}; Numuneler arasındaki farklılığın p < 0.01 düzeyinde olduğunu gösterir.

Yeşil çay ve yaprak atıklarının GR aktivitesi üzerine etkisi diğer çay örnekleri ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu tespit edildi. GR enzim aktivitesindeki değişimlerin gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı yükseklik sıralaması şu şekildedir; RBC+H₂O₂ > RBC+H₂O₂+YÇ = YÇYA = YÇGA = SÇ = SÇLA >

RBC+H₂O₂ +Kateşin > RBC. Çalışma gruplarındaki GR aktivitesi bakımından gösterdikleri değişimler grafiksel olarak Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 20. Çay Örneklerinin GR Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

3.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi

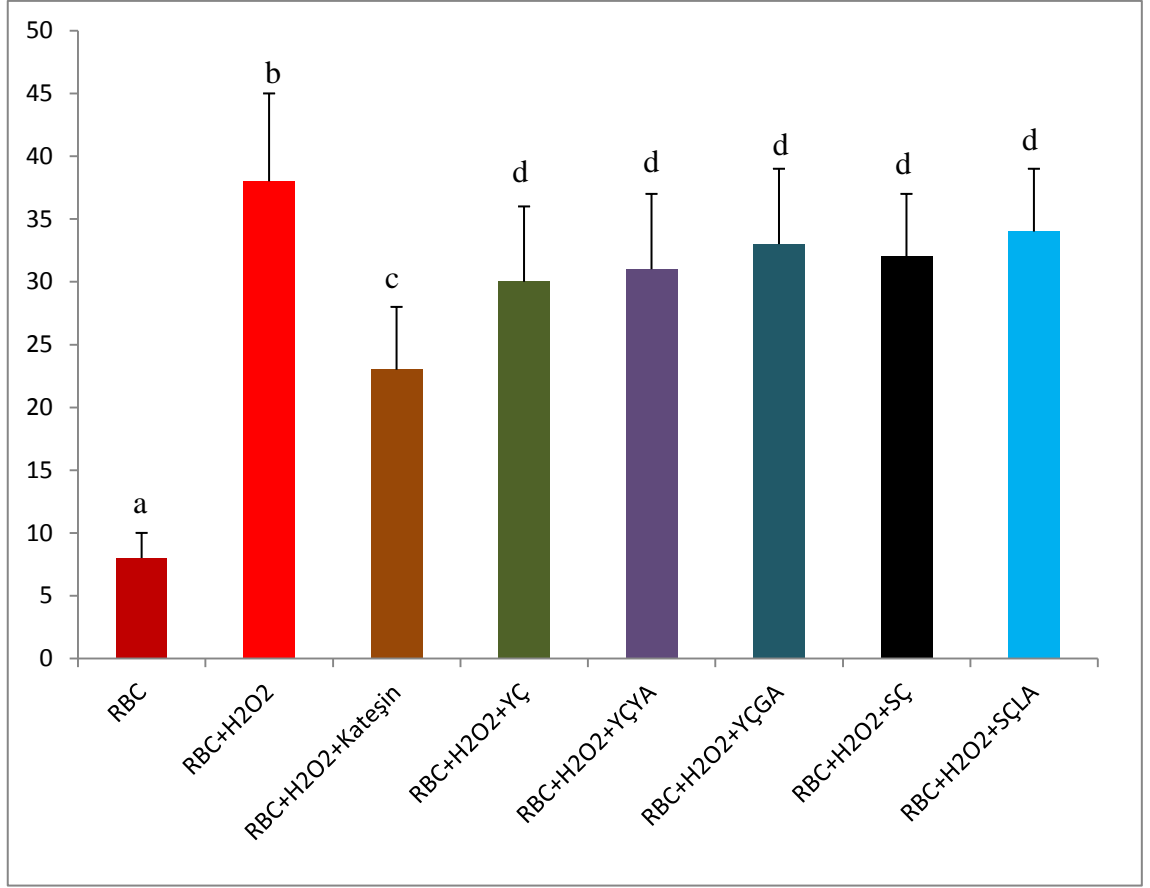
Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakılan hücrelere 50 µM özüt ilave edilerek belirlendi. Örneklerin eritrosit GSH-Px aktivitesi düzeyleri Tablo 23’te verildi.

Tablo 23. Çay Örneklerinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

Çalışma Grupları (n=8)	GSH-Px Düzeyleri (U/g Hb)
RBC	8 ± 2 ^a
RBC+H ₂ O ₂	38 ± 7 ^b
RBC+H ₂ O ₂ +Kateşin	23 ± 5 ^c
RBC+H ₂ O ₂ +SÇLA	34 ± 5 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +SÇ	32 ± 5 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇGA	33 ± 6 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇYA	31 ± 6 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇ	30 ± 6 ^d

^{a,b,c,d}; Numuneler arasındaki farklılığın p < 0.01 düzeyinde olduğunu gösterir.

İstatistiksel analiz sonucunda tıpkı diğer antioksidan enzimlerde olduğu gibi GSH-Px aktivitesi bakımından RBC ile diğer çalışma grupları arasında p < 0,001 düzeyinde anlamlı bir farklılık olduğu saptandı. H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakılan grupta en yüksek enzim aktivitesi kateşinli grupta tespit edilirken en düşük enzim aktivitesi ise RBC + H₂O₂'nin olduğu grupta tespit edildi. Çay ve atıkları bakımından da en yüksek aktivite yeşil çayda tespit edildi. GSH-Px aktivitesi bakımından örnekler arasında yapılan sıralama; RBC+H₂O₂ > RBC+H₂O₂+YÇ = YÇYA = YÇGA = SÇ = SÇLA > RBC+H₂O₂ +Kateşin > RBC şeklinde olduğu ortaya konuldu. Çalışma grupları arasında farklılık grafiksel olarak Şekil 21'de verildi.



Şekil 21. Çay Örneklerinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

3.5.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

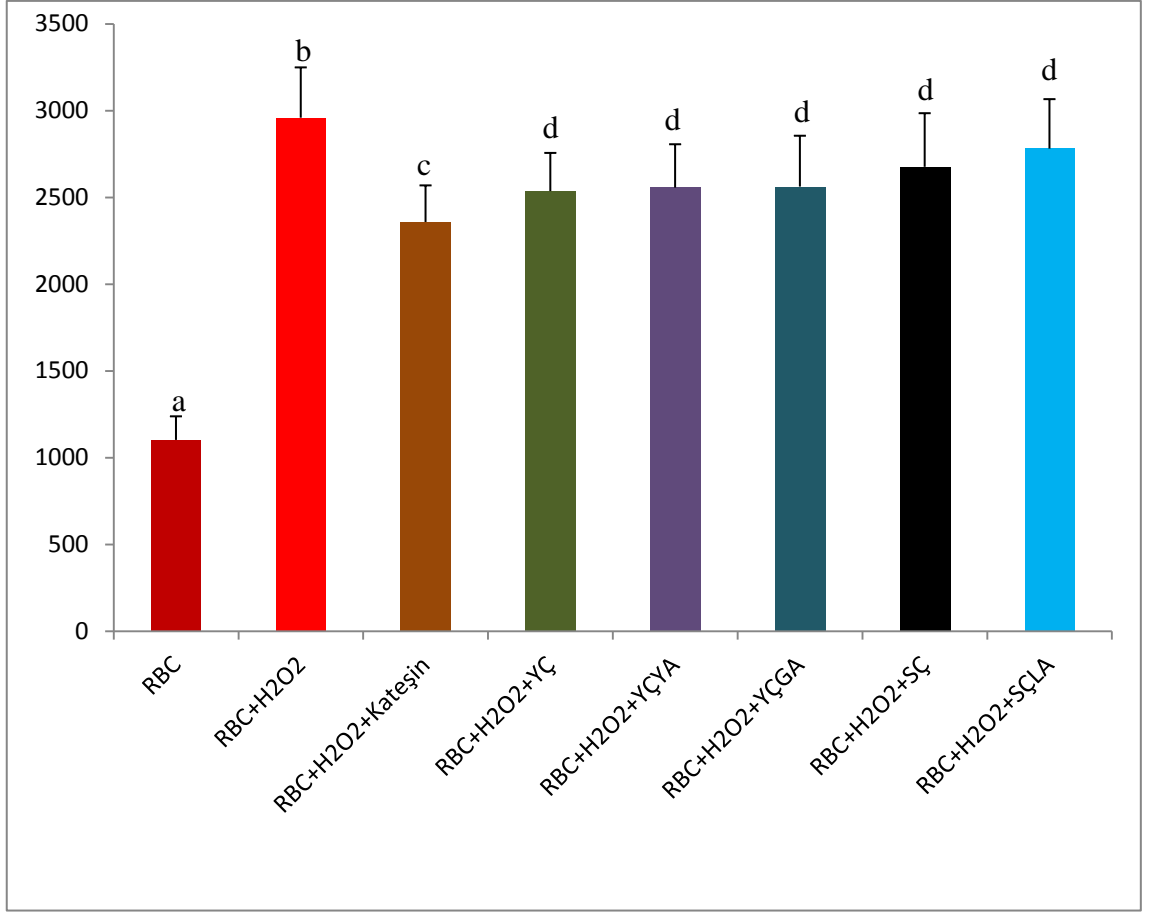
Eritrositlerde SOD aktivitesi H_2O_2 ile oksidatif strese maruz bırakılan hücelere 500 μM özüt ilave edilerek belirlendi. Örneklerin eritrosit SOD aktivitesi düzeyleri üzerine olan etkisi Tablo 24’te verilmiştir.

Tablo 24. Çay Örneklerinin SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

Çalışma Grupları (n=8)	SOD Düzeyleri (U/g Hb)
RBC	1102 ± 136 ^a
RBC+H ₂ O ₂	2959 ± 290 ^b
RBC+H ₂ O ₂ +Kateşin	2358 ± 211 ^c
RBC+H ₂ O ₂ +SÇLA	2781 ± 285 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +SÇ	2676 ± 309 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇGA	2562 ± 293 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇYA	2556 ± 250 ^d
RBC+H ₂ O ₂ +YÇ	2536 ± 220 ^d

^{a,b,c,d}; Numuneler arasındaki farklılığın p < 0.01 düzeyinde olduğunu gösterir.

Yapılan istatistik analiz sonucunda RBC'deki SOD aktivitesi ilgili çalışma grupları arasında p < 0,001 düzeyinde anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi. Aynı zamanda H₂O₂ muamelesinden sonrada en yüksek enzim aktivitesi kateşinle preinkübe edilen grupta tespit edildi. Çay örneklerinde ise kateşinli gruba en yakın aktivite yeşil çayda gözlemlendi. Çalışma grubunda yer alan SOD aktivitesi Şekil 22'de grafiksel olarak verilmektedir.



Şekil 22. Çay Örneklerinin SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.

SOD aktivitesi $RBC > RBC+H_2O_2+Kateşin > RBC+H_2O_2 + YÇ = YÇYA = YÇGA = SÇ = SÇLA > RBC+H_2O_2$ şeklindedir. SÇLA'nın hem yeşil çay hem de yeşil çay atıkları ile arasında istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bir farklılık ortaya kondu.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Uzun ve kısa süreli anaerobik egzersizlerin hücreler tarafından oksijen reaktif türlerinin üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, hücrelerde oksidatif strese ve dolayısıyla DNA hasarına, kansere, hücre yaşlanmasına, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ile kardiyovasküler olaylara sebep olmaktadır (Leba vd., 2014). Bu reaktif oksijen ve nitrojen türleri serbest radikaller olarak adlandırılır. Serbest radikallere karşı organizmada enzimatik ve non-enzimatik savunma sistemi bulunmaktadır (Demir, 2011). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sebze ve meyve ile zengin diyetler ile beslenmenin bu hastalıkların görülme sıklığındaki azalmayla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Sebze ve meyveler bol miktarda polifenol ve karotenoidler gibi fitokimyasalları, lif, folat, antioksidan ve vitaminleri içermektedir (Chong vd., 2010). Serbest radikalleri uzaklaştırıcı etkisi olan bu antioksidan bileşikler günümüzde son derece önem kazanmıştır. Hücrelerde enzimatik savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda devreye antioksidanlar girer. Son yıllarda, serbest radikallere karşı koruyucu önlem olarak doğal ürünler ve antioksidan maddelerin kullanımı giderek önem kazanmaya başlamıştır. Ülkemizde de halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan ve bitkisel aktivitesi pek de bilinmeyen pek çok bitki bulunmaktadır. Çay, üzüm, nar, elma, yaban mersini gibi doğada bulunan birçok bitki serbest radikal toplayıcı özelliğe sahip birçok antioksidan bileşikleri ihtiva eder (Perez-Vizcaino ve Duarte, 2010).

Çay, sudan sonra dünya üzerinde popülasyonların birçoğunda tüketilen içecektir. Yeşil çay, siyah çay, oolong çay olmak üzere 3 çeşit çay üretilmektedir. Çayın antioksidan özelliği yapısındaki kateşin türevlerinden kaynaklanmaktadır. Kateşinler, antioksidan, prooksidan ve enzim inhibitörleri olarak antikanser aktivitesine sahiptir. Çayın yapısında yer alan kateşinlerden özellikle epigallokateşingallatin kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği ve çeşitli tümör hücrelerinin apoptozisini tetiklediği gösterilmiştir (Pal vd., 2014).

Yapılan literatür taramaları ve değerlendirmeleri sonucunda yeşil çayın siyah çay ile mukayese edildiğinde % 30-40 daha fazla polifenol içerdiği bulunmuş ve yeşil ve siyah çayın birer antioksidan olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Yuda vd., 2012). Çay işlenmesi sırasında işlenen ürünün yaklaşık % 5'i atık olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu atıkların büyük bir kısmı çay üreticileri tarafından doğal gübre olarak kullanılmaktadır. Kalan kısmı çevre kirliliğine sebep olmaması için buhar kazanlarında yakılmaktadır. Bu şekilde çay atıkları ekonomik olarak yeterince değerlendirilmemektedir. Son zamanlarda çay atıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda çay atıklarının da kayda değer ölçüde polifenol içerdiği ve bu atıkların antioksidan kapasiteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Demir, 2010; Keleşoğlu, 2012).

Mevcut çalışmada; yeşil ve siyah çay ile atıklarına ait özütlerin eşdeğer kateşinli polifenol içeriğinin belirlenmesinin yanında özütlerin radikal temizleme aktivitesi, lipit oksidasyonu inhibe etme kapasitesi, hücre (eritrosit) içi indirgeme potansiyeli ve antioksidan enzim aktivitesi incelenmiştir. İlk olarak çay ve atıklarının özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Özütleme işleminde çaylar ve atıkları 37 °C'de karanlık ortamda kurutulup, değirmende öğütüldü. Beevi ve ark.'larının yaptığı çalışmalarda metanol, etil asetat, su, aseton, kloroform ve hekzan gibi bitki özütlemeye kullanılan çözücüler arasından en verimli çözücünün metanol ve etil asetat olduğu tespit edilmiştir (Beevi vd., 2010). Bu çalışmada da özütleme işleminde çözücü olarak metanol ve etil asetat çözücülerinin çay polifenolleri açısından en uygun çözücüler olabileceğine karar verildi. Özütleme işlemi yapıldıktan sonra numunelerin polifenol muhtevalarının spektrofotometrik olarak kateşin eş değeri cinsinden incelenmesiyle yeşil çayın siyah çaya oranla daha fazla fenolik madde ihtiva ettiği saptanmıştır ve bu sonuçlar Henning ve ark.'larının yeşil ve siyah çay fenolik madde içeriği araştırmasında bulunduğu sonuçlarla uyumludur (Hennig vd., 2004). Yeşil çayın daha yüksek polifenol bulundurması siyah çayın işlenmesi esnasında yapısında bulunan flavanollerden tiaflavin ve tiarubugin gibi sekonder polifenollerin oluşmasıyla flovanol miktarının azalması şeklinde açıklanmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda çay işleme yöntemine bağlı olarak fenolik madde içeriğininde değiştiği ortaya konmuştur (Vinson, 1998). Mevcut çalışmada hem yeşil hem de siyah çayın kendi atıklarından daha fazla etken madde içerdiği gözlenmiştir. Aynı zamanda yeşil çayın yaprak atığının da siyah çaydan daha fazla miktarda polifenol bulundurduğunun ortaya konması oldukça ilgi çekici bir bulgudur.

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 da ilgi çekicidir. Yine siyah çay özütünün de diğer atık özütlerinden daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra özütleme işleminde kullanılan çözücünün farklılığının DPPH radikal temizleme aktivitesine etkisi de görülmüştür. Bu bağlamda Lee ve ark.'larının yaptığı çalışmada metanollü özütün radikal temizleme kapasitesinin sulu, bütanollü ve hekzanlı özütlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Vinson ve Dabbagh, 1998; Benzie ve Szeto, 1999; Lee vd., 2001).

Serbest radikallerin biyomolekülleri oksidasyona uğratarak oluşturduğu hasarları hücresel seviyede incelemek için model hücre olarak eritrosit hücreleri kullanıldı. Basit hücre yapısına sahip olması, yüksek yoğunlukta oksijen taşıması, zar yapısında bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) bulundurması, özellikle hemoglobinin yapısındaki demir gibi geçiş metallerine sahip olması ve hasara uğrayan bileşenlerini telafi edememesi gibi özellikler eritrositlerin sıklıkla hücre modeli olarak seçilmesinin başlıca nedenleridir. Mevcut çalışmada eritrositlere oksidatif stres kaynağı olarak H₂O₂ kullanıldı. 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'nın zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Malondialdehit (MDA) lipit peroksidasyonunun en stabil majör ürünüdür ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren peroksidatif ürünün (TBARS) büyük bir yekününü oluşturur. Bu yüzden 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 100 µM'lık konsantrasyonda özütlerle preinkübasyona bırakılarak bu özütlerin lipit oksidasyonuna koruyucu etkisi izlendi. Buna göre elde edilen sonuçlarda yeşil çayın özütlerinin oksidasyon önleme kapasitesi

diğer özütlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum diğer parametrelerde elde edilen sonuçlarla uyumludur. Chen ve ark.'larının yaptığı çalışmada çayda bulunan ana flavonoidler; EGCG, EC, ECG ve EGC olarak tespit edilmiştir. EGCG en bol ve en yaygın bulunan çay polifenolüdür (Chen vd., 2009). 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. Mevcut çalışmada da bütün özütlerde, tek bir dozda anti-lipit peroksidatif aktivite tayin edilmiştir ve elde edilen bu sonuç Gokulakrishnan ve Liyakath'ın yaptığı çalışma ile uyumludur.

İndirgenmiş glutatyon, hücre içi ortamın indirgen tutulmasını ve kararlı bir intraselüler ortamın sürdürülmesini sağlayan en önemli tiyol grubu kaynağıdır ve antioksidan etkiye sahiptir, ölçümü patogenezinde oksidatif stresin bulunduğu çeşitli hastalıkların antioksidan savunma mekanizmasının durumu hakkında bilgi edinilmesi açısından iyi bir belirteçdir. Biz çalışmamızda toplam tiyol grubu düzeyini glutatyon standardı kullanarak belirledik. Bu nedenle bu çalışmada, çay ve atık özütlerinin hücre içi indirgeyici güç potansiyelinin korunması üzerine etkisi olabileceği öngörülmektedir. Çalışma esnasında reaksiyonun gerçekleşmesinin pH artışı ile doğru orantılı olduğu ve bahsedilen diğer çalışmalarda kullanılan tampon çözeltilerinden daha konsantre tampon çözelti kullanılması gereği tespit edilmiştir. Glutatyon seviyelerini belirlemek için de 100 µM'lık özüt konsantrasyonları kullanıldı. Sonuç olarak diğer parametrelerde olduğu gibi yeşil çayın diğer numunelerden daha etkin olduğu ortaya konulmuştur. Sonuçlar Gokulakrishnan ve Liyakath'ın çayın en etkili flavanoid olan EGCG'in sigara içenlerin eritrosit hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada bulunan sonuçlarla uyumludur. Ayrıca Konyalıoğlu ve Karamenderes'in civanperçemi (*Achillea*) ve onun farklı dokuları üzerinde yaptıkları çalışmada tespit ettiği, flavanoid yönünden zengin özütlerin hücre içi indirgeyici gücün korunmasına katkı sağladığı sonucu ile uyumludur.

Antioksidan enzimler vücudun en önemli endojen antioksidan sistemidir. Bu enzimlerden en önemlileri SOD, CAT, GR, GSH-Px ve GST'dir. Jo'wko ve ark.'larının yaptığı çalışmada, yeşil çay ekstraktının eritrositlerdeki SOD ve GSH-Px üzerine etkisi incelenmiştir (Jo'wko vd., 2015). SOD aktivitesinde bir artış belirlemiş fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koymuşlardır. GSH-Px aktivitesinde ise hiçbir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Yapılan literatür taraması sonucunda, çay ekstraktının diyet ile alımını takiben eritrosit hücrelerinde GSH-Px aktivitesi ile ilgili

birbirleriyle çelişkili birçok çalışma belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda, bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir değişim olmadığı (Karin vd., 1997), bazılarında çok az artış olduğu (Young vd., 2000) ve bazılarında ise önemli ölçüde artış olduğu belirlenmiştir (Young vd., 1999). Agarwal ve ark.'larının yeşil çay ekstraktları ile yapmış olduğu çalışmada SOD aktivitesinin önemli ölçüde arttığını, katalazın çok yüksek H₂O₂ konsantrasyonunda arttığını ve GSH-Px aktivitesinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Ancak yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda çay atıklarının antioksidan enzimler üzerine olan etkisinin daha önce çalışılmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda özütlerle preinkübe edilen ve oksidatif strese bırakılan eritrositlerdeki enzim (SOD, CAT, GR, GSH-Px) aktivitelerinin oksidatif stres uygulanan eritrosit ortamına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak, aktivitedeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Beklendiği üzere en bariz azalma yeşil çay özütü ortamında görülmüştür. Bu sonuçlar oksidatif stresör olarak kullanılan hidrojen peroksidin konsantrasyonunun yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı meydana getirdiği hasarın özütlerin indirgeyemeyeceği kadar büyük ölçüde olduğunu bize düşündürmektedir. Çay ve atık ekstraktları karşılaştırıldığında çalışılan bütün enzimlerde en düşük aktivite yeşil çayda ve yeşil çayın yaprak atığında tespit edildi. Bu sonuç polifenol içeriği en yüksek ekstraktlar onlar olduğu için şaşırtıcı değildi. Sonuçları aşağıdaki şekilde maddeler halinde özetleyebiliriz:

- Numuneler arasında polifenol miktarı en fazla olan yeşil çay, en düşük olan ise siyah çay lif atığıdır.
- Yeşil çay ve atıklarının yüksek radikal toplama aktivitesine sahipken siyah çay ve onunun lif atığı daha düşük aktiviteye sahiptir.
- MDA değerleri karşılaştırıldığında da yeşil çay ve yeşil çay yaprak atığında düşük fakat yeşil çay gövde atığının siyah çayda yüksek olduğu ve siyah çay lif atığı ile de çok yakın değere sahip olduğu belirlendi.
- Eritrosit hücre içi indirgeme potansiyelinin göstergesi olan glutatyon düzeyleri çalışma ortamına göre Kateşin > YÇ = YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA şeklindedir.
- Çay ve atıklarının eritrositlerdeki antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisinde ise; Katalaz enzim bütün özütlerde bir aktivitenin var olduğu tespit edildi. Fakat katalaz aktivitesi bakımından çay ve atıkları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ortaya konuldu. Ayrıca yeşil çayın RBC+H₂O₂ ortamla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı.

- Glutasyon redüktaz aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında katalaz aktivitesine benzer durum söz konusudur.
- Çay örneklerinin GSH-Px aktivitesi üzerine olan etkisine bakıldığında en düşük aktivite yeşil çayda tespit edildi. Ayrıca yeşil çay ve yeşil çay yaprak atığının RBC+H₂O₂ ortamla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ortaya konuldu.
- SOD aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında kateşine en yakın aktivite yeşil çayda tespit edildi. Çay ve atıklarının SOD aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ortaya konulmuştur.

Bütün bu çalışma sonuçları, çay üretimi esnasında fabrikalarda biriken çay atıklarının antioksidan aktiviteleri ve biyoyararlılıkları üretildiği çay ürününe (siyah ve yeşil çay) bağlı olduğu dolayısıyla böyle bir biyolojik değere sahip çay atıklarının başta kozmetik alanda olmak üzere birçok koruyucu sağlık ürünlerinde değerlendirilebileceği ve böylelikle atıl halde kullanım alanı bulunmayan yan ürünlerin ekonomik bir değer haline gelebileceği öngörülmektedir.

5. ÖNERİLER

- Numunelerin hücrede vitamin düzeylerine olan etkisi araştırılarak özütlerin antioksidan etkinliği mukayese edilebilir.
- Mevcut çalışmada özütlerin lipit ve protein oksidasyonunu inhibe kapasiteleri incelenmiştir, bunların yanında oksidatif strese uğratılan karbohidratlar üzerinde oluşan hasarı inhibe kapasiteleri incelenebilir.
- Aynı çalışma ratlar üzerinde gerçekleştirilebilir ve böylece *in vivo* şartlarda elde edilecek bulgular sayesinde mevcut sonuçların geçerliliği daha sağlıklı sorgulanabilir.
- Hücre kültürü çalışmaları ile antikansorejen aktiviteye sahip olup olmadıkları araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H.E., 1987.** Catalase, In Bergmeyer HU, Method Enzymatic Analysis. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 3, 273-286.
- Aikens, J., Dix, T., 1991.** Perhydroxyl Radical Initiated Lipid Peroxidation. The Role Of Fatty Acid Hydroperoxides. J. Biol. Chem., 266(23), 15091-8.
- Akkuş, İ., 1995.** Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza yayınları, Konya, 1-28.
- Akkuş, İ., 1995.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1-73.
- Altınışik, M., 2000.** Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Aydın.
- Başağa, H.S., 1990.** Biochemical aspects of free radicals. Biochem. Cell Biol, 68, 989-998.
- Beevi, S.S., Narasu, M.L., Govda, B.B., 2010.** Polyphenolics Profile, Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Leaves and Stem of Raphanus sativus L.. PlantFood Hum. Nutr., 65, 8-17.
- Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., 1999.** Total Antioxidant Capacity of Teas By The Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. J. Agric .Food Chem., 64, 633-636.
- Beutler, E., 1975.** Red Cell Metabolism 'Manual of Biochemical Methods'. Grune and Stratton, 68-75.
- Bicker, G., 2007.** Nitric oxide. An unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. Arch. Insect Biochem., 48, 100-110.
- Bravo, L., 1998.** Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F., 2001.** Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stress-induced ulcer formation in rats. Turk J. Med. Sci., 31, 199-203.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2001.** Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları, 76-78.
- Chen, H., Qu, Z., Fu, L., Dong, P., Zhang, X., 2009.** Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3-polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea. J. Food Sci., 74(6), C469-74.
- Chong, F., Macdonald, R., Lovegrove, A., 2010.** Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. British Journal of Nutrition, 104, 28-39.

- Clemens, M.R., Waller, H.D., 1987.** Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45, 251-268.
- Costello, F.G., Webber, A., 1990.** White cell function in Down's syndrome: Increased enzymatic antioxidative defense is accompanied by decreased superoxide anion generation in blood. *Hereditas.*, 113, 73-75.
- Cuendet, M., Hostettmann, P., Potterat, O., 1997.** Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.*, 80, 1144-1152.
- Çekil, F., 2006.** Çay (*Camellia sinensis*); içeriği, sağlık üzerindeki koruyucu etkisi ve önerilen tüketimi. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 26, 642-648.
- Çimen, Y., Burak, M., 1999.** Flavonoids and Their Antioxidant Properties. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 19, 296-304.
- Deisseroth, A., Dounce, A.L., 1970.** Catalase. Physical and chemical properties, Mechanism of catalysis and physiological role. *Physiological Reviews*, 50(3), 319-369.
- Demir, A., 2011.** Siyah ve Yeşil Çay İle Atıklarının Antioksidan Özelliklerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 92s.
- Dillard, C.J., German, J.B., 2000.** Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1744-1756.
- Donald Massaro, M.D., Lee Frank, M.D., 1980.** Oxygen toxicity. *The American Journal of Medicine*, 69, 117-126.
- Efe, H., 1996.** Hiperlipoproteinemilerde Plazma, Eritrosit, Lenfosit ve Nötrofil Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Lipid Peroksidasyonu ve Çeşitli Lipid Parametreleriyle İlişkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 138s.
- Esterbauer, H., Wag, G., Puhl, H., 1993.** Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.*, 49(3), 566-76.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982.** Biology Of Disease: Free Radicals And Tissue Injury. *Lab. Invest*, 47, 412-426.
- Fridovich, I., 1975.** Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 147-159.
- Gaetani, F.G., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, M.A., Kirkman, N.H., 1989.** Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73, 334-339.
- Gate, L., Paul, J., Nguye, B.G., Tew, K.D., Tagiero, H., 1999.** Oxidative stress induced in pathologies. The role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother*, 53, 169-80.

- Goldberg, D.V., Spoones, R.I., 1983.** Glutathione reductase. Bergmeyer Methods of Enzymatic Analysis , 3. Volume, Third ed. V.C.H. Pub., G.B., 258-265.
- Gözükara, E.M., 1997.** Biyokimya. Evin Matbaası, İstanbul.
- Graham, H.N., 1992.** Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev. Med., 21(3), 334-50.
- Guliyev, V., Harmandar, M., 2000.** Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Halifeoğlu, İ., Canatan, H., Üstündağ, B., İlhan, N., İnanç, F., 2000.** Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. Cell Biochem. Funct., 18(4), 263-267.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993.** Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement, And Significance. Am. J. Clin. Nutr., 57, 715-725.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Methods in Enzymology, 186, 1-80.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985.** The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molec. Aspects Med., 8, 89-93.
- Hausteen, B. H., 2002.** The Biochemistry and Medicalsignificance of the Flavonoids. Pharmacol. Exp. Ther., 96, 67-202.
- Helmut, S.M.D., 1991.** Oxidative stres. From basic research to cilinical application. The American Jour. of Med., 91/3C, 31-37.
- Henning, S. M., Nicolas, H. L., Yantao, N., Rosario, R. M., Hejing ,W., 2004.** Bioavailabilityand antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. Am. J. Clin. Nutr.,80, 1558-64.
- Horton, A.A., Fairhurst, S., 1987.** Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. CRC Cirit. Rev. Tox., 18, 27-69.
- Hof, K.H., Boer, H., Wiseman, S.A., Lien, N., Weststrate, J.A., Tijburg, L.. 1997.** Consumptionof greenor blacktea doesnotincrease resistanceof low densitylipoproteinto oxidation in humans. Am J Clin Nutr, 66. 1125-32.
- Hugo, E.A., 1983.** Catalase. Bergmeyer Methods of Enzymatic Analysis, 3. Volume, Third Ed. V.C.H. Pub., G.B, 273-285.
- Jowko, E., 2015.** The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced
- Kalaycioğlu, A., Öner, C., 1994.** Bazı Bitki Ekstraksiyonlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması. Tr. J. Botany, 18, 117- 122.
- Kargın, F., Fidancı, U.R., 2001.** Böbrek hastalıklı köpeklerde antioksidatif metabolizma. Turk J. Vet. Anim. Sci., 25, 607-613.

- Keleşoğlu, B., 2012.** Siyah ve Yeşil Çay İle Atıklarının Oksidatif DNA Hasarına Yönelik Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 93s.
- Kılınc, K., Kılınc, A., 2002.** Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Med. J., 33(2), 110-118.
- Knight, J.A., 1999.** Free radicals, antioxidants aging and disease. AACC Press. Washington D C, 1-61.
- Kohen, R., 1999.** Skin antioxidants. Their role in aging and in oxidative stress- New approaches for their evaluation. Biomed & Pharmacother, 53, 181- 92.
- Kolaylı, S., 1996.** Tatlı Su ve Deniz Suyunda Yetişen Gökkuşığı (salmo gairdneri) Türü Alabalıklarda Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleriyle Lipit Peroksidasyon Seviyeleri. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 59s.
- Kural, B., 2001.** Psöriasisli Hastalarda Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)'in Oksidasyona Yatkınlığı ve bunun Oksidan-antioksidan denge İle İlişkisi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 144s.
- Leba, L. J., 2014.** Optimization of a DNA Nicking Assay to Evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* Antioxidant Capacity. Int. J. Mol. Sci., 15, 18023-18039.
- Lee, S.E., Ju, M.E. and Kim, J.H., 2001.** Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from Smilax china root. Exp. Mol.Med., 33, 263-268.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, and R.J. Randall, 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Marklund, L.S., 1984.** Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. J. Clin. Invest., 74, 1384-1398.
- Mc Cord, J.M., 1993.** Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin. Biochem., 26, 351-357.
- Mc Cord, J.M., Mobile, A., 1983.** The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. Surgery, 94(3), 412-414.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983.** Glutathione Aun. Rev. Biochem., 52, 711-60.
- Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S., Meydani, M., Mille, R., Cannon, J.G., Morrow, F.D., Rocklin, R., Blumberg, J.B., 1990.** Vitamin E supplementation enhances cell mediated immunity in healthy elderly subjects. A. J. Clin. Nutr., 52, 557-563.

- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W., 1996.** Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper'ın Biyokimyası, 24. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Niki, E., 1987.** Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chemistry and Physics of Lipids, 44, 227-253.
- oxidative stress parameters in male sprinters. Eur J Nutr, 54, 783-791.
- Pal, S., Dey, S. K., Saha, C., 2014.** Inhibition of Catalase by Tea Catechins in Free and Cellular State: A Biophysical Approach. Polas one, 9, 7.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2010.** Flavonols and cardiovascular disease. Molecular Aspects of Medicine, 31, 478-494.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H., 1968.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem., 24;25, 192-205.
- Seitz, R., Ueno, H., Worrall, S., 2002.** Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies. Free radic. Biol. Med., 32(8), 683-687.
- Sinatra, S.T., De Marco, J., 1995.** Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart. Antioxidants and other strageises to limit cardiovascular damage. Connecticut Med., 59, 579-587.
- Slinkard, K., Singleton, V. L., 1977.** Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods. Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.
- Stocks, J., Dormandy, T. L., 1971.** The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide, British J. Hamatol., 20, 95-111.
- Tosun, İ., Karadeniz, B., 2005.** Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20, 1, 78-83.
- Uchida, K., 2000.** Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radical Bio. Med., 28, 1685-1696.
- Ursini, F., Bindoli, A., 1987.** The Role of selenium peroxidases in the prostection against oxidative damage of membranes. Chem. And Phy. of Lipids, 44, 255-276.
- Uydu, H., 2001.** Farklı Plazma Lipit Bileşimlerinin Kan Hücreleri Üzerine Oluşturduğu Yapısal ve Fonksiyonel Değişikliklerin İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 98s.
- Uzun, K., Vural, H., Öztürk, T., Özer, F., 2000.** İmecik, İ. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. East. J. Med., 5(2), 48-51.
- Van Der Zee, J., Dubbelman, T.M., Van Stevininck, J. 1985.** Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta, 818, 38-44.

- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., 1998.** Tea Phenols: Antioxidant Effectiveness of Teas, Tea Components, Tea Fractions and Their Binding With Lipoproteins. *Nutr. Res.*, 18, 1067-1075.
- Young, J.F., Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Lauridsen, S.T., Hansen, M., Sandström, B., 2000.** The effect of grape-skin extract on oxidative status. *British Journal of Nutrition*, 84, 505-513.
- Young, J.F., Nielsen, S.E., Haraldsdottir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S.T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandström, B., Dragsted, L.O., 1999.** Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr*, 69, 87-94.
- Yuda, N., Tanaka, M., Suzuki, M., Asano, Y., Ochi, H., Iwatsuki, K., 2012.** Polyphenols Extracted from Black Tea (*Camellia sinensis*) Residue by Hot-Compressed Water and Their Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase *in vitro*. *Journal of Food Science*, 77, 12, 1750-3841.

ÖZGEÇMİŞ

Merve HÜNER, 24.01.1989 tarihinde Ankara'nın Altındağ ilçesinde doğdu. İlköğretimini 2003 yılında Tevfik İleri İlköğretim Okulu'nda ve ortaöğretimini 2007 yılında 50. Yıl Süper Lisesi'nde Ankara'nın Çankaya ilçesinde tamamladı. 2008 yılında başladığı lisans eğitimini 2013 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.