

**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİYAH ve YEŞİL ÇAY ile ATIKLARININ OKSİDATİF DNA
HASARINA YÖNELİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Büşra KELEŞOĞLU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE 2012

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANABİLİM DALI

SİYAH ve YEŞİL ÇAY ile ATIKLARININ OKSİDATİF DNA HASARINA
YÖNELİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

BÜŞRA KELEŞOĞLU

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21 /11/2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 19/12/2012

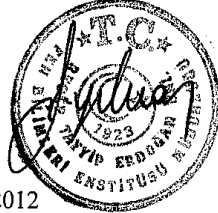
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Enstitü Müdürü: Doç.Dr. Fatih YILMAZ

RİZE, 2012



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve yardımlarından dolayı değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ başta olmak üzere tezimin hazırlanmasında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nın olanaklarını sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, tecrübelerinden istifade ettiğim Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Zihni Açar YAZICI'ya ve Kimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sayın Adem DEMİR' e teşekkür ederim.

Her zaman sevgi ve destekleriyle bana güç veren sevgili annem Şengül KELEŞOĞLU, sevgili babam Hanefi KELEŞOĞLU, kardeşim Burak KELEŞOĞLU ve nişanlım Halil TUTAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Büşra KELEŞOĞLU
Aralık, 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--|-----|
| ÖNSÖZ..... | I |
| İÇİNDEKİLER..... | II |
| ÖZET | V |
| SUMMARY | VI |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | VII |
| TABLolar DİZİNİ..... | IX |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ | X |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş | 1 |
| 1.2. Çayın Genel Özellikleri | 4 |
| 1.2.1. Yeşil ve Siyah Çayın Kimyasal Özelliği ve İçeriği | 5 |
| 1.2.2. Çayın Antioksidan Etki Mekanizmaları | 7 |
| 1.2.3. Yeşil ve Siyah Çayın Bazı Hastalıklara Etkisi | 8 |
| 1.3. Serbest Radikaller..... | 10 |
| 1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri | 10 |
| 1.3.1.1. Singlet Oksijen | 11 |
| 1.3.1.2. Süperoksit Radikali | 11 |
| 1.3.1.3. Hidrojen Peroksit..... | 12 |
| 1.3.1.4. Hidroksil Radikali | 12 |
| 1.3.1.5. Perhidroksil Radikali | 13 |
| 1.3.2. Serbest Radikallerin Oluşum Sebepleri | 13 |
| 1.3.3. Serbest Radikal Türlerinin Biyolojik Etkileri..... | 15 |
| 1.4. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları..... | 17 |
| 1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri | 20 |
| 1.6. DNA Hasarı ve Hasara Neden Olan Etkenler | 21 |
| 1.6.1. DNA | 21 |
| 1.6.2. Reaktif Oksijen Türlerinin DNA'ya Zararları | 23 |
| 1.6.3. Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı | 25 |
| 1.6.3.1. Oksidatif DNA Hasar Oluşumu..... | 25 |
| 1.6.3.2. Oksidatif DNA Hasar Onarım Mekanizmaları..... | 28 |
| 1.7. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 1.7.1. Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)..... | 29 |
| 1.7.1.1. Comet Yönteminin Tarihçesi | 30 |
| 1.7.1.2. Comet Yönteminin Kullanım Alanları | 31 |
| 1.7.1.3. Comet Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları | 31 |
| 1.7.2. Alkali Comet Yönteminin Uygulama Basamakları..... | 32 |
| 1.7.3. Görüntülerin Elde Edilmesi ve Değerlendirme | 34 |
| 1.7.3.1. Görsel Skorlama Yöntemi | 34 |
| 1.7.3.2. Bilgisayar Sistemi ile Görüntü Analizi..... | 35 |
| 1.7.4. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler | 36 |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 37 |
| 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 37 |
| 2.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarflar | 37 |
| 2.3. Çözeltilerin Hazırlanması | 38 |
| 2.4. Çay Numunelerinin Eldesi ve Ekstraktlarının Hazırlanması..... | 40 |
| 2.5. Özütlerde Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi | 41 |
| 2.6. Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Farklı Atıklarından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi..... | 42 |
| 2.7. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi..... | 43 |
| 2.8. IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması | 43 |
| 2.9. Comet Tekniğinin Lenfositlere Uygulanması | 44 |
| 2.9.1. Lam Kaplama | 44 |
| 2.9.2. Lenfosit İzolasyonu | 44 |
| 2.9.3. Örneklerin Hazırlanması ve Lamlara Yüklenmesi | 44 |
| 2.9.4. Lizis. | 45 |
| 2.9.5. Elektroforez | 45 |
| 2.9.6. Nötralizasyon ve EtBr ile Boyama | 46 |
| 2.9.7. Floresan Mikroskop ile Değerlendirme | 47 |
| 2.10. İstatiksel Analiz | 49 |
| 3. BULGULAR | 50 |
| 3.1. Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri.... | 50 |
| 3.2. Yeşil ve Siyah Çay İle Atıklarının DPPH Radikal Temizleme Aktivitesine İlişkin Bulgular | 51 |
| 3.3. Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Farklı Atıklarından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Yeşil ve Siyah Çay ile Atıklarının Farklı Konsantrasyonlarında DNA Hasarı Üzerine Etkileri | 53 |
| 3.4.1. Lenfositlerde H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 1 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi | 54 |
| 3.4.2. Lenfositlerde H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 10 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi | 56 |
| 3.4.3. Lenfositlerde H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 25 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi | 58 |
| 3.4.4. Lenfositlerde H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 50 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi | 59 |
| 3.5. Çay Özütlerine Ait Anti-DNA Hasar AktivitelerininDeğerlendirilmesi..... | 61 |
| 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR | 63 |
| 5. ÖNERİLER | 70 |
| KAYNAKLAR..... | 71 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 78 |

ÖZET

Serbest radikal hasarının ateroskleroz, kanser, yaşlanma gibi pek çok dejeneratif hastalığın gelişmesinde katkısı olduğu bilinmektedir. Son yıllarda antioksidan amaçla fenolik fitokimyasalların ve bitkisel ürünlerin kullanımı artmaktadır. Ancak bitkisel ürünler prooksidan ve antioksidan olarak ikili etkide bulunabilirler. Yeşil ve siyah çayın reaktif oksijen bileşiklerinin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruduğuna dair pek çok çalışma olmasına rağmen bu çaylara ait atıkların etkisine yönelik yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, siyah ve yeşil çay ile bunların farklı atıklarından elde edilen özütlerin fenolik içeriğini belirlemek ve onların insan lenfositlerinde hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini tek hücre jel elektroforez (comet) yöntemiyle karşılaştırmaktır. Çalışmada kullanılan numuneler Rize’de bulunan çay fabrikalarından sağlanmıştır. Çay ve atık ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi ile kateşin standartına eşdeğer olarak belirlenmiştir ve fenolik içerikleri (K, EK, EGK, EGKG, EGK and gallik asit) HPLC-PAD sistemi ile tespit edilmiştir. DPPH radikal temizleme aktivitesi Cuendet metodu ile eşdeğer kateşin standartıyla karşılaştırılmalı olarak tayin edilmiştir. DNA hasarı Comet assay yöntemi ile tespit edilmiştir. Özütlerde en yüksek fenolik bileşim, radikal temizleme etkisi ve anti-DNA hasar aktivitesi yeşil çayda gözlemlenmiştir (1 µM konsantrasyona sahip ekstraktlarda sırasıyla, 68±3.9 mg/g, 10±1.3 µM, 0,49±0,06). Tüm özüt ekstraktlarında fenolik içerik sıralamasının: YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA, DPPH aktivite sıralamasının: YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA ve anti-DNA hasar aktivite sıralamasının: YÇ ≥ SÇ ≥ YÇYA ≥ YÇGA ≥ SÇLA olduğu tespit edilmiştir. Deney ortamında fenolik içeriğin artırılması sonucunda ise çay ve atıklarının prooksidan etki göstermeye başladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, DNA hasarına yönelik koruyuculuğu bakımından çay atıklarının da çayın kendisi kadar etkili olduğu ve değerlendirilerek ekonomik bir katkı sağlayabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Çay, Çay Atıkları, DPPH, Comet

SUMMARY

Investigation of the Effects of Black, Green Teas and Their Wastes on the Oxidative DNA Damage

Free radical damage is known for contributing atherosclerosis, cancer, aging and many other degenerative diseases. Moreover, the last few years have illustrated the increase of using antioxidant phenolic phytochemicals and plant products. However, herbal products could have a bimodal effect such as prooxidant and antioxidant. Many researches show that green and black teas have antioxidant substances, but there is no study enough to show the effect of wastes on cellular systems. The aim of this research is to determine phenolic composition and compare the ability of extracts of black, green teas and their waste extracts to prevent oxidative DNA damage on hydrogen peroxide-induced human lymphocytes by the single cell gel electrophoresis method (Comet assay). The tea and waste samples in present study were provided by two tea factories in Rize, Turkey. Total phenolic contents of all extracts of tea samples were evaluated with Folin-Ciocalteu reagent as catechin equivalent and the phenolic constituents (C, EC, EGC, EGCG, EGC and gallic acid) were determined by HPLC-PAD system. DPPH radical scavenging activities of the extracts were measured by the Cuendet method comparing with catechin standard. DNA damage was measured by Comet assay. The highest total phenolic content, radical scavenging activity and anti-DNA damage activity were observed in the green tea extract (68 ± 3.9 mg/g, 10 ± 1.3 μ M, 0.49 ± 0.06 for 1 μ M extract concentration, respectively). The findings for all of sample extract as follow: YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA for phenolic content, YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA for DPPH activity and YÇ \geq SÇ \geq YÇYA \geq YÇGA \geq SÇLA for anti-DNA damage activity. Wastes of black and green teas as well as their own teas may reduce oxidative DNA damage. That leaf waste of green tea may improve DNA fragmentation as does black tea is an intriguing finding. When phenolic content added into the experimental media was increased, tea and its wastes began to show prooxidant effect, another noteworthy data obtained in this study. As a result, tea waste as tea has protective effect on DNA damage, which may encourage entrepreneurs that can make an economic value.

Key Words: Tea, Tea Wastes, DPPH, Comet assay

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Çaydaki bazı önemli polifenolik kateşinlerin yapıları | 6 |
| Şekil 2. Antioksidan aktivite için önemli fonksiyonel gruplar | 7 |
| Şekil 3. Moleküler oksijenin serbest radikallere dönüşümü | 11 |
| Şekil 4. Reaktif oksijen bileşikleri oluşum nedenleri ve hücresel hasar | 15 |
| Şekil 5. Hücrede radikal aracılı hasar | 16 |
| Şekil 6. Reaktif oksijen ve azot türlerinin vücuttaki genel etkileri | 17 |
| Şekil 7. DNA çift sarmalı | 22 |
| Şekil 8. DNA'da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları | 23 |
| Şekil 9. Oksidatif stres ile ilişkili klinik durumlar | 25 |
| Şekil 10. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı | 26 |
| Şekil 11. Hidroksil radikali ile guanin bazının reaksiyonu | 28 |
| Şekil 12. Alkali comet tekniğinde temel basamakların şematik gösterimi | 34 |
| Şekil 13. Görsel Skorlama tekniği ile hücrelerin sınıflandırılması | 35 |
| Şekil 14. Comet görüntülerinin bilgisayar yardımı ile değerlendirilmesi | 36 |
| Şekil 15. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği | 42 |
| Şekil 16. Örneklerin lamlara yüklenmesi | 45 |
| Şekil 17. Normal ve hasarlı hücrelerde deney uygulanışı ve sonucunun gösterimi | 46 |
| Şekil 18. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları | 51 |
| Şekil 19. Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik | 52 |
| Şekil 20. 1 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları | 55 |
| Şekil 21. a) NK'e ait Comet görüntüsü, b) 1 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 1 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 1 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 1 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 1 µM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 1 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK'e ait Comet görüntüsü | 55 |
| Şekil 22. 10 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları | 57 |
| Şekil 23. a) NK'e ait Comet görüntüsü, b) 1 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 1 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 1 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 1 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 1 µM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 1 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK'e ait Comet görüntüsü | 57 |
| Şekil 24. 25 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları | 58 |

| | |
|---|----|
| Şekil 25. a) NK'e ait Comet görüntüsü, b) 1 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 1 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 1 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 1 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 1 µM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 1 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK'e ait Comet görüntüsü | 59 |
| Şekil 26. 50 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları..... | 60 |
| Şekil 27. a) NK'e ait Comet görüntüsü, b) 1 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 1 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 1 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 1 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 1 µM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 1 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK'e ait Comet görüntüsü..... | 60 |
| Şekil 28. Yeşil ve siyah çay ile atıklarının farklı konsantrasyonlarına ait Comet skor kinetiği..... | 61 |

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Çay yaprağının bileşimi | 6 |
| Tablo 2. Siyah çay içeceğinin başlıca bileşenleri | 7 |
| Tablo 3. Hücredeki serbest radikal hedefleri ve sonuçları | 16 |
| Tablo 4. Ekzojen ve endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması | 19 |
| Tablo 5. SCGE yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri..... | 31 |
| Tablo 6. Numune kodları..... | 40 |
| Tablo 7. Polifenol tayini için pipetleme miktarları | 41 |
| Tablo 8. Gradient şartları..... | 43 |
| Tablo 9. Lenfosit hücrelerinin görsel sınıflandırması. | 48 |
| Tablo 10. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları | 50 |
| Tablo 11. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri | 51 |
| Tablo 12. Yeşil ve siyah çay ile atıklarında bulunan fenolik madde miktarları..... | 53 |
| Tablo 13. Çay ve atıklarının fenolik içeriklerinin karşılaştırılması..... | 53 |
| Tablo 14. Standart, yeşil ve siyah çay ile bunların atıklarının farklı konsantrasyonlarına ait Comet skorları | 54 |
| Tablo 15. Çay ve atıklarında çalışılan parametrelerin genel gösterimi | 62 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------------------|--|
| 8OHdG | 8-hidroksi-deoksi guanozin |
| ADP | Adenozin difosfat |
| AP-1 | Aktivatör Protein-1 |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| AU | Arbitrary (rastgele seçilmiş hücreler) units |
| BHA | Bütillenmiş hidroksianisol |
| BHT | Bütillenmiş hidroksitoluen |
| CUPRAC | Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi |
| CE | Kapiler Elektroforez |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| DPPH | 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil |
| EK | Epikateşin |
| EKG | Epikateşingallat |
| EGK | Epigallokateşin |
| EGKG | Epigallokataşingallat |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| EtBr | Etidyum Bromür |
| Fe ⁺² | Ferro demir |
| Fe ⁺³ | Ferri demir |
| GA | Gallik asit |
| GC-MS | Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| Hb | Hemoglobin |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HOCl | Hipokloröz asit |
| HO ₂ · | Perhidroksil radikali |
| HOO· | Hidroperoksil |
| HNO ₂ | Nitröz asit |
| HPLC | Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| HOCl | Hipokloröz asit |

| | |
|---|---|
| HPV | Human Papilloma Virüsü |
| IC ₅₀ | % 50 İnhibisyon konsantrasyonu |
| LDL | Düşük Yoğunluklu Lipoprotein |
| LC-MS | Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi |
| LO· | Lipit alkoksil |
| LOO· | Lipit peroksil |
| LOOH | Lipit hidroperoksit |
| LMPA | Düşük Erime Noktalı Agaroz |
| LSM | Laser Scanning Microscopy |
| MDA | Malondialdehit |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NAD ⁺ | Nikotinamid Adenin Dinükleotid |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| Na ₂ EDTA | Disodyum Etilendiamintetraasetikasit |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | Disodyum fosfat dihidrat |
| Na ₂ CO ₃ | Disodyum karbonat |
| NF-kB | Nükleer Faktör-kB |
| NMPA | Normal erime noktalı agaroz |
| NO· | Nitrik Oksit |
| NO ₂ | Azot Dioksit |
| ¹ O ₂ | Singlet Oksijen |
| O ₂ ⁻ | Süperoksit Radikali |
| OH ⁻ | Hidroksil Radikali |
| ORAC | Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi |
| PARP | Poli ADP-Riboz Polimeraz Enzimi |
| PBS | Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate buffer in salt) |
| pO ₂ | Parsiyel oksijen basıncı |
| PK | Pozitif Kontrol |
| Ppm | Milyonda bir kısım |
| RNA | Ribonükleik asit |
| RNM | Reaktif Azot Metabolitleri |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| SCGE | Tek Hücre Jel Elektroforezi |

TEAC

Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite

UV

Ultraviyole

V

Volt

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri veya metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verirler. Hücre fonksiyonlarına zarar vermek suretiyle hücre içi ve dışı bileşenlere saldıran bu oksijen türlerinin oluşumunun ve aktivitesinin kontrol altına alınması gerekmektedir. Zararlı reaktif türlerin etkileri vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Ayrıca, vücudun bu endojen savunma mekanizmalarının diyetle alınacak antioksidan besin öğeleriyle de desteklenmesi gerekmektedir (Altınışık, 2000; Cooke vd., 2003).

Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere var olan antioksidan savunma sistemleri bazı durumlarda serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar(Altınışık, 2000).

UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, immunolojik reaksiyonlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla serbest radikal oluşumu gerçekleşebilir. Oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, akut renal yetmezlik, akciğer hastalıkları, anfizem, bronşit ve alkolik karaciğer hastalıkları gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar (Altınışık, 2000; Halliwell, 1991).

Bilimsel çalışmalarla bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler araştırılırken, diğer taraftan da sağlıklı bir yaşam sürdürme ve hastalıkları önleme alanında yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi söz konusu hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere antioksidan diyet uygulanması ve/veya ilaç kullanımı açısından önemli olmaktadır. Antioksidan aktivitenin güncelleşmesine bağlı olarak tedavide ve beslenmede kullanılan doğal bileşiklere ilgi artmış ve bu maddeler üzerinde yapılmakta olan çalışmalar da giderek ilgi uyandırmıştır. Reaktif oksijen bileşiklerini inaktive ederek oksidatif hasarı önleyebilen

ya da geciktiren antioksidan bileşiklerle tedavi son yıllarda ülkemiz dahil pek çok ülkede ilgi görmektedir. Ancak sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etkenlerinin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi, insanları antioksidan bileşik içeren doğal ürünlerin tüketimine yönlendirmiştir (Elliot, 1999).

Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup daha çok polifenoller ve flavonoidler halinde bulunurlar (Ivor, 2000). Polifenoller veya flavonoidler özellikle çayda, meyve, sebze, fındık ve ceviz gibi sert kabuklu yemişlerde, tohumlarda, bitkilerin sap kısmında ve çiçeklerinde, şarapta ve balda yaygın şekilde bulunmaktadır (Wollgast ve Ankla, 2000). Doğal ürünler kategorisinde bulunan çayın flavonoid muhtevası ve antioksidan kapasitesinin incelenmesiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Çayın, antioksidan, antikanserojenik ve antiaterosklerotik özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Frei ve Higdon, 2003). Genelde bu etki için flavonoidlerin sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Çayda etkin bir rol oynayan flavonoid; bitki ailesinde yaygın bir şekilde bulunan polifenolik bir bileşiktir. Flavonoidler 6 alt gruba ayrılabilir. Bunlar sırasıyla; flavonlar, flavanonlar, isoflavonlar, flavonoller, flavanol ve antasiyanin bileşikleridir. Flavonoid bileşiğinin çayda bulunan iki temel bileşiği flavanoller ve flavonoller'dir (Balentine vd., 1997).

Yeşil çayın flavonoid içeriği yaklaşık 160- 1500 mg/g kuru ağırlık, siyah çayın ise 120-1300 mg/g kuru ağırlık aralığındadır (Yen vd., 1997). Çayın flavonoid muhtevası ve antioksidan kapasitesinin incelenmesiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Zeyuan ve arkadaşları yeşil ve siyah çayın eritrositler üzerinde antioksidan etkisini karşılaştırmış ve siyah çayın daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir (Zeyuan vd., 1998). Langley-Evans, diyetle alınan antioksidanların % 35-45'inin çay flavonoidlerinden kaynaklandığını, demleme sırasında sıcaklık arttıkça deme geçen antioksidan miktarının arttığını, Yen ve arkadaşları ise, günde ortalama 23 mg flavonoid alındığını bunun % 48'inin çaydan sağlandığını belirtmişlerdir (Yen vd., 1997; Langley ve Evans, 2000). Çayda çok güçlü antioksidan içeren flavonoid bileşiği olduğu ve antioksidan içeren bu bileşiğin hücreleri serbest radikal hasarlarından, C ve E vitaminlerinden çok daha iyi koruduğu gösterilmiştir (Çelik, 2006). Yeşil ve siyah çayın tüketilmesiyle kateşinlerin artan plazma düzeyi araştırılmış ve yeşil çay için 0.63-1.8 mol/L aralığında, siyah çay için ise 0.2-0.34 mol/L aralığında değiştiği belirlenmiştir. Plazma düzeyleri, 1.5-2.6 saatten sonra en yüksek düzeye ulaşmakta, 24 saat içinde minimum düzeye gerilemektedir. Yeşil veya siyah çay içiminden sonra theaflavin ve thearubigin bileşenlerinin bir kısmı hızla absorbe edilerek

antioksidan kapasitenin artmasına neden olur. Yapılan değişik denemelerde, tüketilen yeşil ve siyah çayın plazma düzeyindeki antioksidan kapasite değerleri birbirinden farklı bulunmuştur. Yeşil çay tüketildikten sonra plazmada antioksidan kapasite oranı %50, siyah çay için ise bu oran %40 olarak belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, siyah çay tüketiminden sonra plazma antioksidan kapasitesinin %76 oranına kadar yükseldiği iddia edilmektedir. Sung'ın yapmış olduğu çalışmada ise, yeşil çayın tüketiminden sonra plazma antioksidan kapasitesinin ancak %12 oranında yükseldiği ifade edilmektedir (Sung vd., 2000). Yang ve arkadaşları tarafından, insan lösemi hücrelerinin tedavisinde kullanılan siyah ve yeşil çay özlerinin ve onların polifenollerini Epigallokateşingallat (EGKG) ve Theaflavinin (TF) doza bağımlı olarak kanser hücresinin büyümesini engellediğini ve kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını göstermiştir. Buna ek olarak, aynı çalışmada siyah çay TF'lerinin programlı hücre ölümü, apoptosise olan etkilerinin EGKG'm etkisine denk olduğu da belirtilmiştir (Yang ve Landau, 2000). 2007 yılında Kaur ve arkadaşları tarafından yayınlanan araştırmada yeşil çay kateşinlerine ek olarak siyah çay TF'lerinin de meme kanseri gelişimini geciktirebileceği gösterilmiştir (Kaur vd., 2004). Yapılan çalışmada TF kullanılan grupta hayatta kalma süresinin arttığı ve tümör hücresinin hacminin istatistiksel olarak azaldığı belirtilmiştir. Son çalışmalarda, çayın ayrıca yaşlanmayı geciktirici özelliği olduğu, bu özelliğinin içeriğindeki flavonid bileşeninin nöroprotektif özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Alzheimer, Parkinson ve Amyotropik Lateral Skleroz hastalıklarının tedavisi için çoklu antioksidanların kullanılması da sıklıkla araştırılmaktadır (Çelik, 2006).

Ülkemizde çay tarımının yapıldığı Doğu Karadeniz bölgesinde yaş çay yaprağının siyah çaya dönüştürülmesi sırasında organik kökenli çöp, lif ve tozdan oluşan katı atıklar ortaya çıkmaktadır. Bu oran normal standartlarda %3-5 arasında iken yanlış hasattan dolayı %17-18'e kadar çıkmaktadır. Bünyesinde çeşitli bitki besinlerini de bulunduran çay atığı, bu yönüyle değerlendirilmesi gereken önemli bir organik madde rezervi olarak karşımıza çıkmaktadır. Karadeniz bölgesindeki çay fabrikalarında her yıl tahminen 40.000 ton çay atığı oluşmaktadır. Çok değerli bir hammadde olan çay atıklarının değerlendirilmeden çevreye gelişi güzel atılarak çürümeye terk edilmesi veya çöp depolama alanına dökülmesi büyük çevre problemlerine ve ekonomik kayba neden olmaktadır (Arcak vd., 1997).

Çay atıklarının değerlendirilerek ekonomiye kazandırılması amacıyla ülkemizde ve yurt dışında birçok bilimsel araştırma yapılmaktadır. Hindistan'da fabrika çay atıklarının ve kafeini alınmış çay atıklarının hem küçükbaş hem de büyük baş hayvan çiftliklerinde

yem olarak kullanılmaktadır ancak bu konuda çok fazla veri mevcut değildir. Son zamanlarda çay atık özütlerinin banyo suyu ile kullanımının cilt sağlığı ile ilişkisini açıklayan çalışmalar olduğu gibi onların hücresel ortamda etkinliklerini ortaya koyan araştırmalar da giderek artmaktadır. Yapılan literatür taramalarında çay atıklarının bu ve bunun gibi birçok amaçla kullanılabilmesine dair bilgiler mevcuttur (Arcak, 1997).

Bu çalışmada, Rize’de yetişen ve Taşlıdere Çay Fabrikasından alınan yeşil çay ve Zihni Derin Çay Fabrikasından alınan siyah çay ve bunların farklı kısımlarının üretim aşamasında ortaya çıkan çay atıkları kullanıldı. İnsan lenfosit hücrelerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasar düzeyleri üzerine çay ve çay atıklarına ait özütlerin azaltıcı etkilerini karşılaştırmak amacıyla bir genotoksite testi olan Comet analizi kullanıldı. Comet analizi (SCGE), kırık DNA’nın alkali elektroforez sırasında hücre dışına çıkması ile DNA hasarını yansıtan kuyruklu yıldız görüntüsünden adını alan floresan mikroskopik bir yöntemdir (Bedir vd., 2004).

1.2. Çayın Genel Özellikleri

Çay, *Camellia sinensis* olarak bilinen bitkinin yapraklarından elde edilen ve sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecektir. Çay, yaprağını dökmeyen her zaman yeşil olan bir bitkidir ve her yıl yaklaşık olarak 2,5 milyon ton kuru çay üretilmektedir. Farklı yöntemlerle üretilen çay; yeşil, siyah ve oolong olarak 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. Siyah çay Avrupa, Kuzey Amerika ve Kuzey Afrika’da, yeşil çay ise Çin, Japonya, Kore ve Fas’ta, oolong çayı ise Çin ve Tayvan’da yaygın kullanım alanına sahiptir (Çelik, 2006).

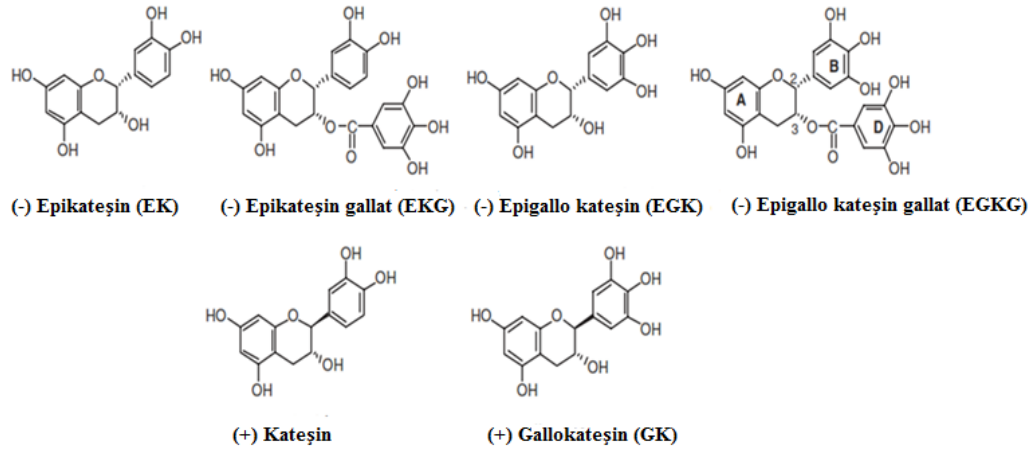
Yeşil çay, polifenol bileşenleri oksidasyona uğratılmadan *C. sinensis* yapraklarının dehidretasyonundan elde edilmektedir. Bu nedenle, yeşil çay, kateşin grubundan monomerik polifenollerin yüksek düzeyde konsantrasyonunu içerir (Çelik, 2006; Zaveri, 2006; Han vd., 2011). Yeşil çay, flavonoidler başta olmak üzere polifenolik maddeler açısından zengin bitkilerden biridir. Yeşil çaydaki kateşin miktarı yaprakların kurutulmadan önce gördüğü işlemlere, çayın yetiştiği bölgenin coğrafi ve tarımsal özelliklerine, yeşil çayın cinsine ve hazırlanış şekline göre değişkenlik gösterir (İslamoğlu, 2012).

Siyah çayın ise çay yapraklarının fermente edilerek oksidasyona uğratılması ile başlıca multimerik polifenoller içerdiği bilinmektedir. İçerik olarak birbirine benzeyen

içecekler olan yeşil ve siyah çaylar, antioksidan etkilerini farklı biyolojik aktif maddelerle gösterirler. Yeşil aydan farklı olarak fermentasyon işleminden dolayı, siyah çayda uçucu yağ bileşenleri olur. Bu nedenle yeşil çayın aromatik özelliği daha azdır. Siyah ayın en önemli kateşinleri siyah çaya rengini ve buruk aromasını da veren theaflavinler (TF) ve thearubiginlerdir (TB) (Fisünoğlu, 2003). Siyah ay elde edildiğinde kıvrırma, fermentasyon ve kurutma gibi işlemler uygulanır. Siyah ay lezzetinin özellikle kurutma işlemi sırasında olduğu gözlenmiştir (Altuğ ve Elmacı, 1998).

1.2.1. Yeşil ve Siyah ayın Kimyasal özelliği ve İçeriği

Çayın, yapısında bulunduğu flavonoidlerden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünölmektedir. ay flavanollerinin antioksidan yeteneği hidroksil gruplarının sayısı, bağlandığı yer ve galloil varlığına bağlı olarak değişmektedir (Benzie ve Szeto, 1999; Wang vd., 2000; Vinson ve Dabbagh, 1998). Yapılan çalışmalarda çay kateşinlerinin antioksidan gücünün vitaminlere göre daha yüksek olduğu saptanmış ve büyükten küçüğe doğru çay kateşinlerinin antioksidan aktivitesi epigallokateşin gallat > epigallokateşin > epikateşin gallat > epikateşin olarak sıralamıştır. Diğer bir çalışmada bu sıralama; epigallokateşin gallat > epikateşin gallat > gallokateşin > epikateşin > epigallokateşin olarak verilmiştir (Benzie ve Szeto, 1999). ay kateşinleri yanında oksidasyon ile oluşan teaflavin monogallat gibi sekonder fenolik maddeler de antioksidan özelliğe sahiptirler. Siyah ay üretimi sırasında oksidasyonla oluşan bu maddeler polimerizasyon nedeniyle monomerik kateşinlerden daha çok fenolik hidroksiller içerirler ve önemli ölçüde süperoksit ile hidroksil radikalini yok etme yeteneğine sahiptirler (Li ve Xie, 2000). Ana flavonoidlerden epigallokateşin-3-gallat (EGKG), epikateşin (EK), epikateşingallat (EKG) ve epigallokateşin (EGK) yeşil çayda ve daha az miktarda da siyah çayda bulunmaktadır. EGKG en bol (% 65) ve en yaygın bulunan çay polifenolüdür. Dolayısıyla yeşil çayın farmakolojik etkilerinden başlıca sorumlu etken madde EGKG'dır. Bir bardak yeşil çayda yaklaşık 100-200 mg EGKG bulunmakta iken, kateşin ve gallo kateşinin miktarları ise daha azdır (Zaveri, 2006).



Şekil 1. Çaydaki bazı önemli polifenolik kateşinlerin yapıları (Zaveri, 2006)

Tablo 1. Çay yaprağının bileşimi (Tosun ve Karadeniz, 2005)

| Bileşen | % Kuru Madde | Bileşen | % Kuru Madde |
|------------------------------------|--------------|----------------------|--------------|
| Flavanoller | 17-30 | Kafein | 3-4 |
| Epigallokateşingallat (EGKG) | 9-13 | | |
| Epikateşingallat(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 |
| Leykoantosiyeninler | 5 | Organik asitler | 0.5-1.5 |
| Toplam polifenoller | 30-36 | | |

İşleme yöntemine bağlı olarak çayın fenolik madde miktarıyla birlikte fenolik madde bileşenleri de değişmektedir. Örneğin siyah çay kuru maddede % 3-10, oolong çay % 8-20, yeşil çay ise % 30-42 oranında toplam flavanol içermektedir (Benzie ve Szeto, 1999). Ülkemizde yoğun bir şekilde tüketilen siyahçay içeceğinin katı ekstresinde bileşenlerin yaklaşık olarak ortalama yüzde oranları Tablo 2’de belirtildiği gibidir.

Tablo 2. Siyah çay içeceğinin başlıca bileşenleri (Graham, 1992)

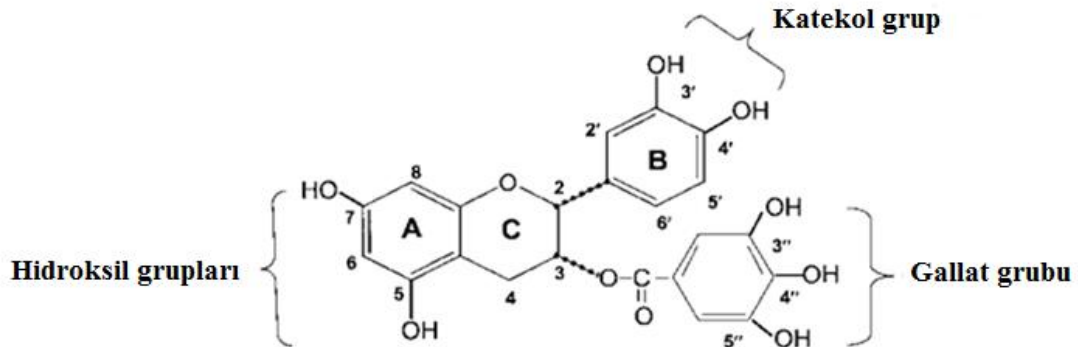
| Bileşen | % Kuru Madde | Bileşen | % Kuru Madde |
|---------------------------------|--------------|-----------------|--------------|
| Kateşinler | 3-10 | Metilksantinler | 8-11 |
| Theaflavinler | 3-6 | Karbonhidratlar | 15 |
| Thearubiginler | 12-18 | Protein | 1 |
| Flavonoller | 6-8 | Mineraller | 10 |
| Fenolik asitler ve depsidler | 10-12 | Uçucu maddeler | < 0.1 |
| Amino asitler | 13-15 | | |

Bileşenler katı özütün yüzde ağırlığı olarak ölçülmüştür

1.2.2. Çayın Antioksidan Etki Mekanizmaları

Çayın sağlığa yönelik yararları antioksidan özelliği ve polifenolik kateşinlerin reaktif oksijenleri süpürme yeteneği ile ilişkilidir. Bu özellikler gallatlanmamış EK ve EGK'deki B halkasında ve gallatlanmış EGK ile EGKG'daki B ve D halkalarında bulunan fenolik hidroksi gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır (Zaveri, 2006).

Çay kateşinlerinin ve polifenollerinin singlet oksijen, süperoksit, hidroksil, peroksinitrit, peroksil, 1,1-difenil-3-pikril hidrazil gibi radikalleri süpürmedeki aktiflikleri birçok çalışmada belirtilmiştir. Çay polifenollerinin bu antioksidan aktiviteleri için çeşitli yapılar önemli görünmektedir. Bunlar; B halkasında bulunan 3' 4'- dihidroksil (katekol) grubu, 3' 4' 5'- trihidroksil (gallat) grubu; C halkasında 3 pozisyonunda bulunan esterleşmiş gallat grubu ve A halkasının 5 ile 7 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarıdır (Şekil 2) (Frei ve Higdon, 2003).



Şekil 2. Antioksidan aktivite için önemli fonksiyonel gruplar

Çay polifenollerinden özellikle EGKG başta olmak üzere çay kateşinlerinin redoksa duyarlıNükleer Faktör-kB (NF-kB), Aktivatör Protein-I (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe eder, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini temizleyerek, hücre sistemlerinde lipit membranlarına, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vermelerini önlerler. Bunun yanında indüklenabilir nitrik oksit sentaz (NOS), lipooksijenaz, siklooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi prooksidan enzimleri inhibe ederek ve glutatyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimleri indükleyerek de indirekt antioksidan aktivite gösterirler (Frei ve Higdon, 2003; Mehmetoğlu, 2005).

Çay polifenollerini Cu (II) ve Fe (II) gibi metal iyonları ile şelat oluşturarak hasar yapıcı radikallerin oluşumunu engellerler. Çay polifenollerini metal iyonlarına ve proteinlere de bağlanırlar. Proteinlere bağlanma özellikleriyle belirli enzim ve reseptörleri etkileyebilirler.Ayrıca yeşil çay polifenol fraksiyonları H₂O₂ oluşumunu teşvik eden 12-o-tetradekanoil porbol-13-asetat (TPA)'ı ve 8-hidroksideoksi guanozin oluşumunu inhibe etmektedir (Yang ve Landau, 2000).

1.2.3. Yeşil ve Siyah Çayın Bazı Hastalıklara Etkisi

Yeşil ve siyah çay direkt olarak tedavi edici olarak görülmemekle birlikte,araştırmalarda toplanan bulgular göstermiştir ki, fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi pek çok hastalığın önleyicisi olabilmektedir.

Çay polifenollerini hücre zarı çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığını azaltarak, serbest radikal oluşumunda görev alan enzim sistemini inhibe ederek normal hücreleri, kanserli hücrelerin yayılımından korur. Böylece tümör gelişimini ve yayılımını önler. Kemik iliği lösemili hücrelerinin büyümesini kontrol altında tutar. Meme ve prostat kanseri tümörlerinin gelişimini durdurur.Epidemiyolojik çalışmalar yeşil çay tüketiminin artması ile meme kanseri riskinin önemli ölçüde azaldığını belirtmektedir. EGKG meme kanserinde östrojen reseptör durumuna bakmaksızın sitotoksik etki gösterir. Östrojen reseptörleri pozitif ve negatif olan hücre dizilerinde EGKG muamelesi sonrasında hücre sayısı azalmıştır. EGKG sitotoksik etkisinin yanında meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü sonlanmasına ve hücre içi sinyalizasyonu değiştirerek apoptozisin indüksiyonuna neden olur (Staurt vd., 2006). EGKG'nın PC-3 prostat kanser hücre kültürlerinde kanser hücrelerinin büyümesini önlediği, prostat kanserinde apoptozis ile kanser hücrelerinin oluşumunu indüklediği gözlenmiştir (Gupta vd., 2003; Yu vd., 2006). Akciğer kanseri, kolon (kalın bağırsak) kanseri riskini düşürür, farelerde EGKG'nın

sisplatin ile indüklenen akciğer tümörü oluşumunu önlediği ve doksorubusunin tümör inhibitör etkisini artırdığı bulunmuştur. Ancak insanlarda yeşil çayın akciğer kanserine ilişkin çalışmalarına ait veriler çelişkilidir. Çay polifenollerinin ve özellikle EGKG'nin akciğer karsinogenezindeki işlevinin, apoptozisin indüksiyonu ve hücre proliferasyonunun inhibisyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Nakachi vd., 1998; Chung vd., 2006). Ayrıca PCP (pentaklorofenol) kirleticilerinin sebep olduğu kanser riskini düşürür. Human papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu cervical lesion'ların (rahim yolunda oluşan anormal değişiklik) tedavisinde de kullanılmıştır (Tokaç, 2007).

Çay ve özellikle yeşil çaydaki EK, EGKG gibi antioksidanların oksidasyon işlemini bozması ile insanlarda oral yeşil çay özüt alımının in vivo oksidasyona karşı plazma LDL rezistansını artırarak, ateroskleroz riskini azalttığı gösterilmiştir. Çay oksijen radikal süpürücü olarak hareket ederek hipokolesterolemik etkiye neden olmaktadır (Zaveri, 2006; Hertog, 1995; Yang ve Koo, 1997). Beyinde lipit oksidasyonunu azaltır; sıçanlarda karaciğer, serum ve beyinde lipit hidroperoksitleri, malondialdehit gibi lipit peroksidasyon göstergelerini azalttığı da bildirilmiştir (Skrzydowska, 2002). Hücre zarı çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığını azaltarak, serbest radikal oluşumunda görev alan enzim sistemini inhibe ederek bozulmaya uğramış sinir hücreleri hastalıklarının tedavisinde etkili olabilir. Çayın nöroprotektif etkisi, antioksidan ve metal şelatör etkisinin yanı sıra, kateşinlerin nöronal hücrelerin sinyalizasyon yollarını etkilemesi ile de ortaya çıkar (Weinreb, 2003). Parkinson ve Alzheimer hastalığını önleyebilir, Alzheimer hastalığında çay kateşinlerinin koruyucu rolü gösterilmiş olmasına rağmen insanlarda Alzheimer hastalığına dair çayın olumlu etkilerini gösteren epidemiyolojik kanıt bulunmamaktadır (Çelik, 2006; Zaveri, 2006; Choi, 2011).

Çay polifenollerinin antioksidan etkisi ile birçok hastalığın önleyicisi olabildiği diğer hastalıklar ise şu şekildedir: *H.pylori*'nin neden olduğu gastrik hastalıkların kontrolünde kullanılabilir. Cilt için bir anti-inflamatuar gibi (enfeksiyon sonucu oluşan iltihaplanmalara karşı) kullanılabilir (Elwin-Lewis, 1980). Boğaz kanserini önleyebilir, ağız sağlığında etkilidir (Elwin-Lewis, 1980). Deneysel hayvan ve insan çalışmalarında şekerli yeşil çay tüketiminin diş çürüklerini azalttığı, plak, ağız kokusu ve diş eti iltihabı gibi diş ve ağız sağlığında istenmeyen olguları önlediği ve antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmektedir (Elwin-Lewis, 1980). Birçok çalışmada çay kateşinlerinin antimutajenik aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Çay polifenollerini ayrıca diyabet tedavisinde de yararlıdır. İnsülin rezistansı ve glukoz intoleransı tip 2 diyabet için risk faktörüdür. Epidemiyolojik

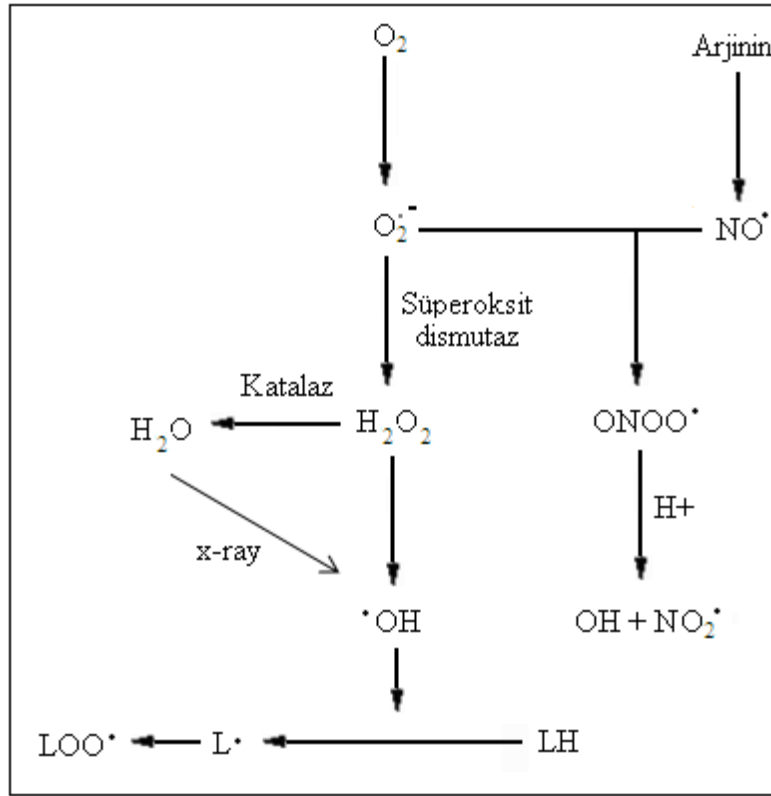
gözlemler ve hayvan çalışmaları yeşil çayın glukoz toleransı ve insülin duyarlılığına etkisini iddia etmektedir. Yeşil çay içiminin insanlarda oral glukoz intoleransını azalttığı ancak bazal kan glukoz düzeylerini etkilemediği bildirilmiştir (Zaveri, 2006).Çayda bulunan EGKG'nın sadece kandaki glukoz düzeylerini düzenlemediği aynı zamanda insülin oluşmasından sorumlu hasarlı beta-hücrelerini de onarabileceği gösterilmiştir (Zaveri, 2006; McKay ve Blumberg, 2002; Roberfroid, 2002; Hakim vd., 2003).

1.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Bu yapısal özellikleri nedeni ile eşlenmemiş elektronlarını diğer bir moleküle verebilen veya kendi elektronlarını eşlemek üzere başka bir molekülden elektron alan reaktif bileşiklerdir (Abdollahi, 2004; Freeman ve Crapo, 1982; Halliwell, 1991).Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. NO (nitrik oksit), nitrik dioksit (NO_2) gibi bileşiklerde dış orbitalde tek elektron bulunduğundan bu bileşikler de radikal yapısındadırlar (Altınışık, 2000; Halliwell, 1991).

1.3.1. 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 ROT oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin azot 6 fiksasyonunu katalizleyen nitrojenaz enzimleri ve CO_2 fiksasyonunu katalizleyen ribülozbifosfat karboksilaz oksijen tarafından yarışmalı olarak inhibe edilir. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir (Altınışık, 2000).



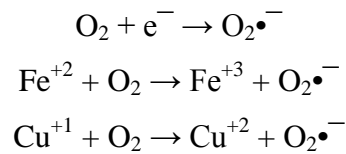
Şekil 3. Moleküler oksijenin serbest radikallere dönüşümü

1.3.1.1. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (1O_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).

1.3.1.2. Süperoksit Radikali

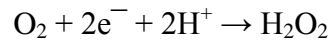
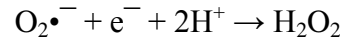
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit radikali meydana getirebilir (Altınışık, 2000; Brent ve Rumarck, 1993).



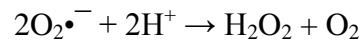
H₂O₂ kaynağı olup canlılarda olduğu ilk gösterilen serbest radikal türevidir. Hücre dışı ortamda endotel hücreleri, lenfositler, trombositler, fibroblastlar ve diğer hücreler tarafından normal hücrel reaksiyonlar sonrası ortaya çıkan zayıf bir oksidan olan O₂•⁻'nin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksitleyici ve metal iyonları redükleyici etkisi ile oksidatif strese yol açabilen reaksiyonları başlatabilir. Aktive edilen fagositik lökositlerden bol miktarda süperoksit üretilerek, fagozom içine ve buldukları ortama verilebilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatabilmektedir (Akkuş, 1995; Kılınç, 2002; Minnet, 2006; Yamamoto, 2001).

1.3.1.3. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü ise, ikihidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir (Akkuş, 1995; Altınışık, 2000).



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur.

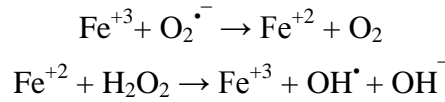


Zar fosfolipitleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri sitoplazmaya göre daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini oluşturabilmektedir. Hidrojen peroksit zarlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (Kılınç; 2002; Akkuş, 1995; Baykal vd., 2002).

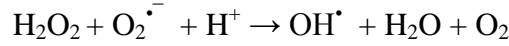
1.3.1.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikalının temel oluşum yolları (Altınışik, 2000):

- ✓ Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH^{\bullet} radikali oluşur.



- ✓ Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir).



Hidroksil radikali biyolojik makromoleküllerin bütün türlerine atak yaparak, DNA'nın pürin ve pirimidin bazıları ile etkileşebilmekte, DNA sarmalında kırılmalara, enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir. Lipit peroksidasyonu, hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasardır (Kılınç, 2002; Akkuş 1995).

1.3.1.5. Perhidroksil Radikali

Perhidroksil radikali (HO_2^{\bullet}), süperoksit radikalının protonlanmasıyla meydana gelir.



Biyolojik sistemlerde HO_2^{\bullet} radikali $O_2^{\bullet-}$ den daha az polardır. Biyolojik zarlardan kolayca geçebilir ve yağ asitlerine doğrudan etki edebilir ve lipit peroksitlerini oluşturur (Altınışik, 2000).

1.3.2. Serbest Radikallerin Oluşum Sebepleri

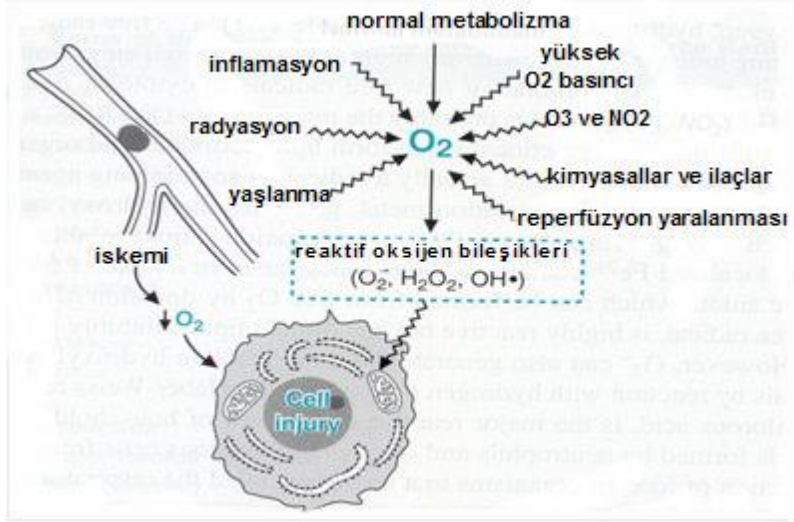
Serbest radikaller organizmada, enerjetik, reaktif ve metabolik olmak üzere üç ana mekanizmayla oluşmakta, metabolik reaksiyonlar en önemli serbest oksijen radikal kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır (Altınışik, 2000).

Hava kirliliği, radyasyon, sigara kullanımı, kötü beslenme alışkanlıkları (alkol tüketimi, yetersiz ve kalitesiz beslenme), stres de eksojen ve endojen olarak serbest radikal

oluşumunu artırmaktadır. Organizmanın antioksidan kapasitesinin yetersizliği durumunda, metabolik reaksiyonlar hücreler için zararlı olmaktadır (Friedberg, 2003; Halliwell, 1989). Bu metabolik reaksiyonlar şu şekilde özetlenebilir:

Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı Mitokondriyal e- transportudur. e- transportu sırasında, e- sızması olur. Sızan elektronların O_2 'i indirgemesi ile ROT meydana gelir. Diğer bir metabolik reaksiyonda Ksantin oksidaz ile gerçekleşir. Enerji azlığı ve artmış intraselüler kalsiyum varlığında kalsiyuma bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenazı, ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz, ksantinin ürik aside dönüşümü sırasında O_2 oluşumuna neden olur. Ksantin Oksidaz hasarsız dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O_2) daha çok NAD^+ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı iskemi gibi durumlarda ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali oluşur, bunların etkisiyle de iskemi veya reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Hemoglobin yıkımında da Hem yıkımında görevli bir enzim olan, hem oksidaz enzimi ROT oluşumuna neden olur. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Peroksizomlarda bulunan oksidazlar bol miktarda H_2O_2 üretirler. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen peroksit (H_2O_2) geçtiği bilinmemektedir. Ayrıca fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir (Capdevilla, 1981; Mason vd., 1980).

Şekil 4'te reaktif oksijen bileşiklerinin oluşum nedenleri ve reaktif oksijen türleri aracılı hücrel hasar özetlenmiştir (Altınışik, 2000).

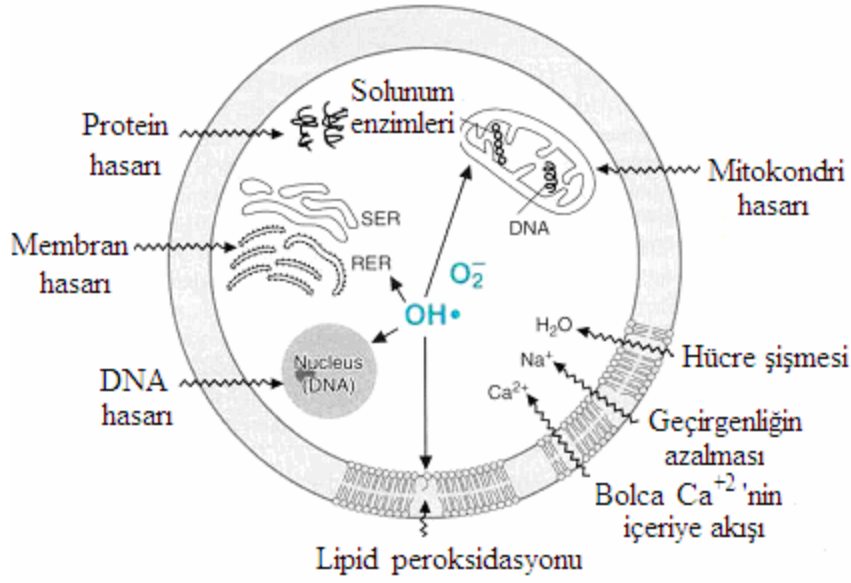


Şekil 4.Reaktif oksijen bileşikleri oluşum nedenleri ve hücrel hasar

Özellikle demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda elektron alış verişi şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyol sentezini, H_2O_2 ve O_2 'den OH^\bullet sentezini katalizlerler (Frei ve Higdon, 2003).

1.3.3. Serbest Radikal Türlerinin Biyolojik Etkileri

Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikali (OH^\bullet) sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatır. Zarlarda lipit peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu zar geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (Tokaç, 2007).



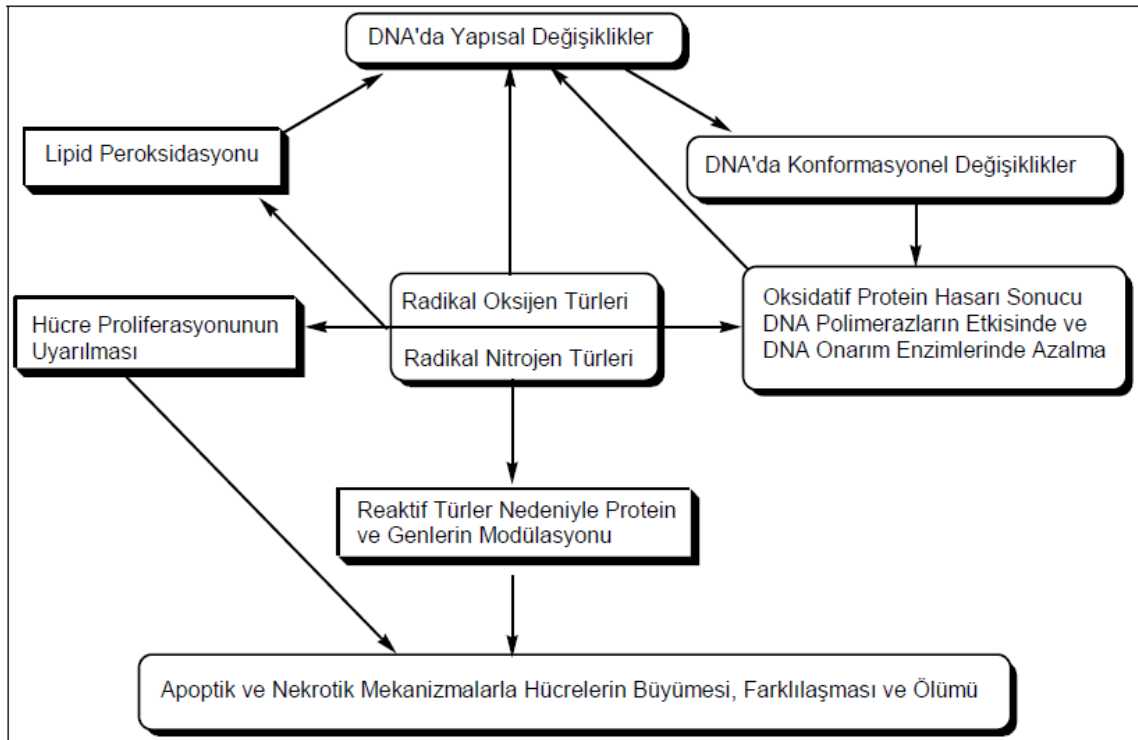
Şekil 5. Hücrede radikal aracılı hasar (Altınışik, 2000).

Tablo 3. Hücredeki serbest radikal hedefleri ve sonuçları (Demir, 2011).

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

Serbest radikallerin karbonhidratlar 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 (Halliwell, 1987).

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson ve Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, hemodiyaliz hastaları, anfizem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (Halliwell, 1987).



Şekil 6. Reaktif oksijen ve azot türlerinin vücuttaki genel etkileri (Demir, 2010)

1.4. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önler.

da geciktirirler. Gıdalar ile alınan antioksidanların başında E ve C vitaminleri, fenolik bileşikler ile karotenoidler gelmektedir (Elliot, 1999).

Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarı ve ölümüne kadar giden birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir. Organizmada antioksidan mekanizmalar prooksidan maddelere karşı koruyucu olarak bulunmaktadır. Bunlar zararlı oksidanları ortadan kaldırır veya *in vivo* olarak reaktif oksijen türü tarafından oluşturulan hasarı onarır. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Akkuş, 1995):

a. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

Bu mekanizma; başlatıcı reaktif türevlerinin uzaklaştırılması, oksijenin uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması ya da katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması şeklindedir.

b. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

Serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi dört farklı mekanizma ile gerçekleşebilir. Bunların ilki olan ‘Toplayıcı etki’ serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemiyle oluşan etkidir. Bilirubin, antioksidan enzimler bu tip bir etki göstermektedirler. İkinci mekanizma olan ‘Bastırıcı etki’ de ise serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir proton aktararak aktivitelerini azaltma ya da inaktif biçime dönüştürme söz konusudur (Ör; Vit’ler, flavinoidler, bilirubin). Bir diğer mekanizma ‘Zincir kırıcı etki’ olarak adlandırılır ve serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırar böylece fonksiyonlarını engellediği serbest radikalleri uzaklaştırır (Ör; Bilirubin, Hb, seruloplazmin, mineraller). Sonucu etki mekanizması olan ‘Onarıcı etki’ de serbest radikaller tarafından hasar gören biyomoleküller onarılırlar. Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (Akkuş, 1995).

Antioksidanlar kaynaklarına göre ekzojen ve endojen antioksidanlar olarak gruplandırılabilir ve bunlar Tablo 4’de verilmiştir (Akkuş, 1995; Kılınç, 2002).

Tablo 4. Ekzojen ve endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması (Demir, 2011).

| 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) | Lipit fazda bulunanlar : β -karoten, α - tokoferol |
| Bütile hidroksianizol (BHA) | Sıvı fazda bulunanlar (kan plazması veya hücre sitozölü): Glutasyon, melatonin, sitokinler, urat, |
| Etoksikin | sistein, serüloplazmin, transferrin, miyoglobin, |
| Sodyum benzoat | hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, |
| Propil galat (PG) | bilirubin. |
| Tersiyer butil hidrokinon (TBHQ) | |
| Tokoferoller | |
| Fe-süperoksitdismutaz (bakteriyel) | |

Bazı gıdalar;flavonoidler, polifenoller, flavonlar antosiyaninler, ellajitanninler, likopenler, resveratrol, kateşin ve epikateşinler, kuersetin, fisetin, rutin, morin, kaemferol, amigdalin, hesperidin, narinjin ve narinjenin,viniferin, triterpenoidler, hidroksisinnamik, benzoik, gallik, sinapik, vanilik, sirinjik, kafeik, ferulik ve pkumarik asit, bazı vitaminler ve/veya vitamin ön maddesi olan α -tokoferol, tokotrienol, karotenoidler, askorbik asit ile mineraller gibi aynı zamanda antioksidanlardan bir veya birkaçını içermektedir. Polifenoller; fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Flavonoidler ise kendi içerisinde altıalt gruba ayrılmaktadır; Kuarsetin ve kaemferol flavonollara, genistein isoflavanoitlere, kateşin ve epigalaktokateşin/gallat flavanollara, hesperidin flavanonlara, pelargonidin ve siyanidin antosiyanidinlere ve krisin flavonlara dahildir (Yılmaz, 2010).

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı reaktivitelerine bağlıdır. İn vitro çalışmalarda flavonoitler, basit fenolik asitler ve karotenoitler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğu ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular

elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşıp burada lipitler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişikliklere neden olurlar (Halliwell 1987).

Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini artırma ya da redoks hemostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlar ile ilgili çalışmalar in vitro yapılmış olup, in vivo çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır (Tokaç, 2007).

1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

‘Oksidatif stres’ koşullarında serbest radikaller biyolojik makromoleküllerle etkileşerek çeşitli hastalıklara yol açtığından özellikle risk grubundaki bireylerin aldığı gıdalarda, bu serbest radikalleri gideren, organizma tarafından sentezlenen ya da dışarıdan besinlerle alınan antioksidanların toplam tayini önemlidir. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek için birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (Demir, 2011):

- 1- MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- 2- Eritrosit Membranında Protein Karbonil Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi
- 3- Eritrositlerde Toplam Glutatyon Düzeyinin Belirlenmesi Yöntemi
- 4- Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi Yöntemi
- 5- Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi
- 6- Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi
- 7- Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi
- 8- Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi
- 9- DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi
- 10- Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi
- 11- Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi(CUPRAC) Yöntemi (Akkuş, 1995; Altınışık, 2000).

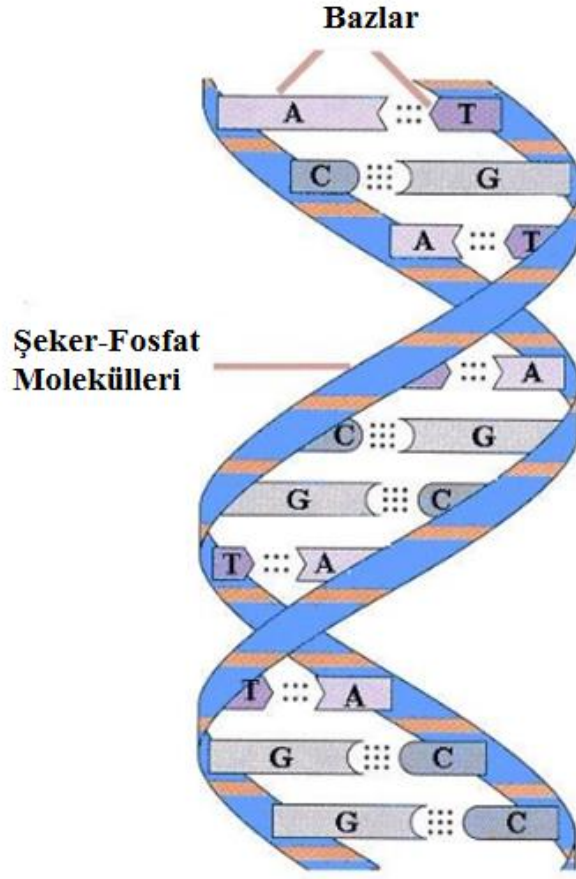
1.6. DNA Hasarı ve Hasara Neden Olan Etkenler

1.6.1. DNA

Deoksiribonükleik asit veya kısaca DNA, tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. Kimyasal olarak DNA, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur. DNA'yı oluşturan nükleotidler ise üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar Baz: Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C); Şeker (beş karbon atomu ile birlikte karbohidrat) ve fosfat grubudur (Tekşen, 2006).

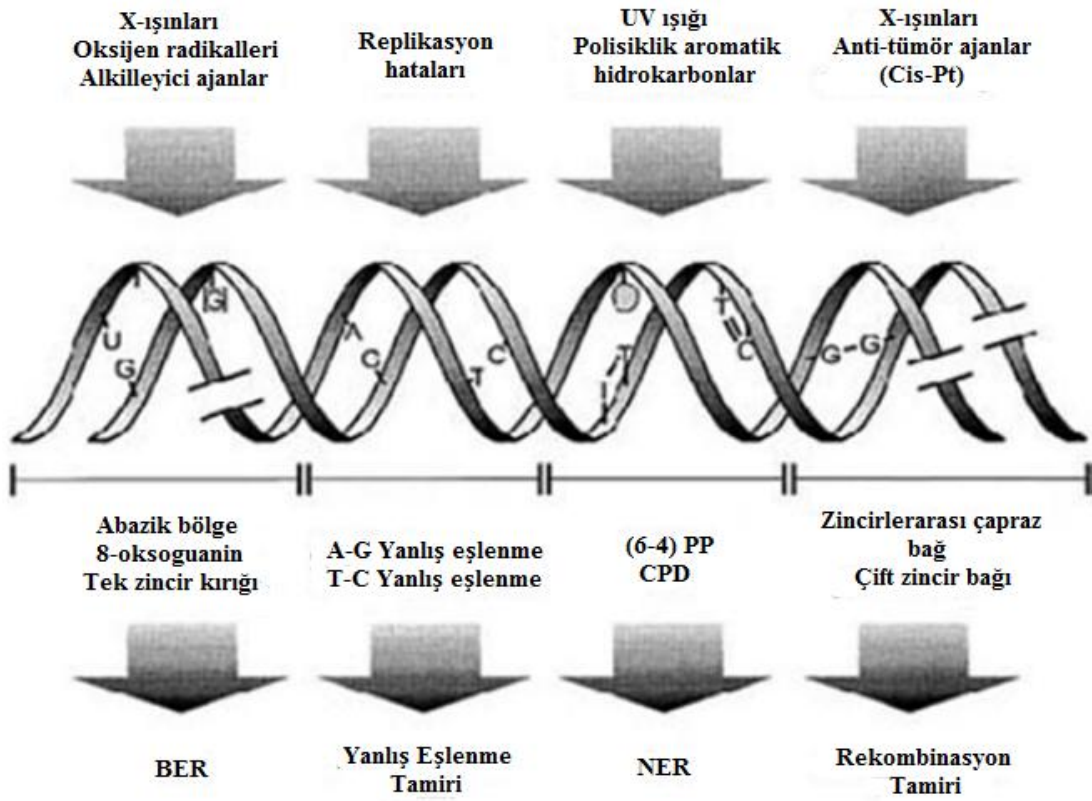
Bu polimerlerin omurgaları, ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından meydana gelir, baz ise çifte sarmaldaki diğer DNA ipliği ile etkileşir. Bu iki iplik birbirlerine ters yönde uzanırlar. Her bir şeker grubuna baz olarak adlandırılan dört tip molekülden biri bağlıdır (Tekşen, 2006).

Genel olarak bir şekerle bağlı baza nükleozit, bir şeker ve bir veya daha çok fosfata bağlı baza ise nükleotit denir. Birden çok nükleotidin birbirine bağlı haline polinükleotit denir. DNA'da bulunan şeker bir pentoz olan 2-deoksiribozdur. Bitişik iki şekerden birinin 3 numaralı karbonu ile diğerinin 5 numaralı karbon atomu arasındaki fosfat grubu, bir fosfodiester bağı oluşturarak şekerleri birbirine bağlar. Fosfodiester bağı asimetrik olması nedeniyle DNA ipliğinin bir yönü vardır. Çifte sarmalda bir iplikteki nükleotitlerin birbirine bağlanma yönü, diğer ipliktekilerin yönünün tersidir. DNA ipliklerinin bu düzenine antiparalel denir. DNA ipliklerin asimetrik olan uçları 5' (beş üssü) ve 3' (üç üssü) olarak adlandırılır, 5' uç bir fosfat grubu, 3' uç ise bir hidroksil grubu taşır (Tekşen, 2006).



Şekil 7. DNA çift sarmalı (URL-2, 2012)

Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücrel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır. DNA'da hasar oluşturan çeşitli ajanlar ve DNA'da oluşturdukları hasar tipleri Şekil 8'de görülmektedir (Müftüoğlu, 2003). Ultraviyole ışığının neden olduğu hasarlar (siklobütan ve 6-4 ışın ürünü pirimidin dimerleri) deri kanseri riski ile bağlantılıdır. Sisplatin ve alkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır (Tekşen, 2006).



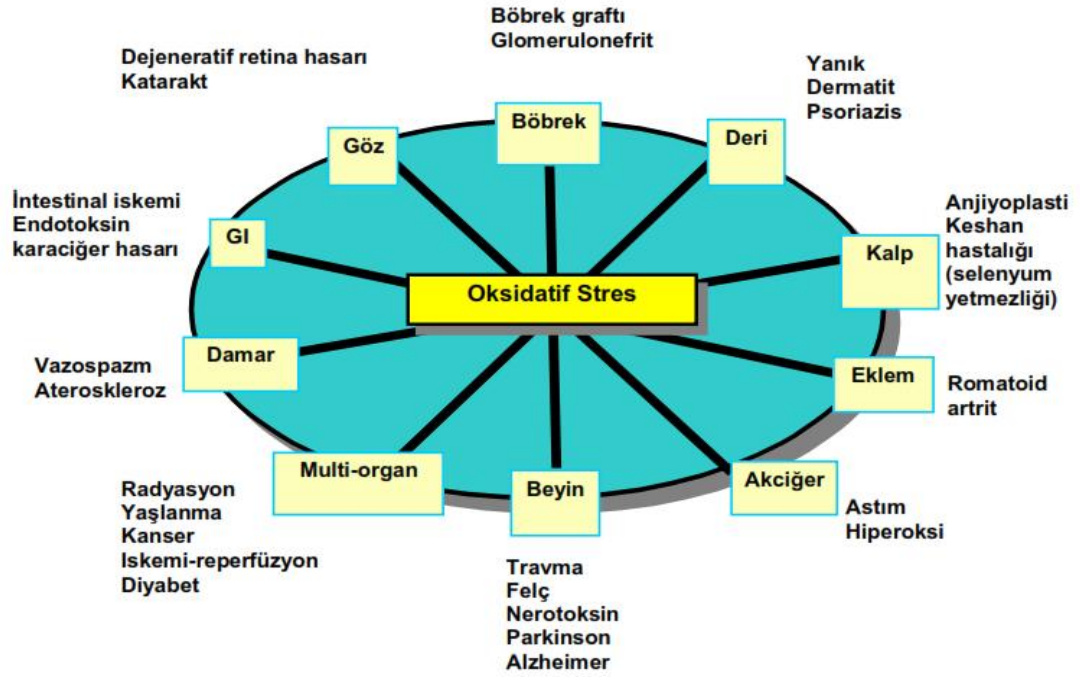
Şekil 8. DNA’da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları

1.6.2. Reaktif Oksijen Türlerinin DNA’ya Zararları

Reaktif oksijen türleri OH[•] oluşumuna yol açarak DNA’da zincir kırıklıklarına neden olur. Reaktif azot metabolitleri de (RNM; NO₂, ONOOH, N₂O₃, HNO₂) DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO- guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur (Aust ve Eveleigh, 1999). HOCl, DNA’da pürin oksidasyon ürünlerinden daha çok DNA bazlarını klorine ederek kloraminler ve halka klorasyonuna yol açar. Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Hücre zarının integral veya periferel proteinlerine ve DNA’ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil (LO[•]) ve lipid peroksil (LOO[•]) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine OH[•] radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir. OH[•] radikaline göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipid

hidroperoksitler ve karbonil bileşikleri, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca lipid radikalleri de $^1\text{O}_2$ gibi OH^\bullet radikallerinden daha özgün davranır ve tercihen guanin bazına etki eder. Oluşan başlıca lezyon tek dal kırıklarındır. Lipit oksidasyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarında metaller kritik rol oynamaktadır. LOOH etkisi ile DNA'da tek dal kırığı oluşumunda Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının katalitik etki yaptığı ve Fe^{2+} 'nin, Fe^{3+} 'den daha etkin olduğu öne sürülmüştür (Yang ve Schaich, 1996). Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantin gibi $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikali oluşturan sistemler ve aktive nötrofiller hücre membranından kolaylıkla diffüze olan H_2O_2 oluşumuna neden olarak hücrelerde yaygın DNA hasarı yapmaktadırlar (Halliwell ve Aruoma, 1991). Doku kültür ortamında belirli amino asitlerin, özellikle histidinin bulunması DNA hasarını arttırmaktadır. Histidin olasılıkla metal iyonlarını bağlayarak hücreye taşınmalarını sağlamaktadır. Memeli hücre kültür ortamına katılan L-histidinin H_2O_2 sitotoksitesini ve DNA'da çift dal kırılmalarını arttırdığı saptanmıştır. Histidin metal iyon bağımlı lipid peroksidasyonunu da arttırmaktadır. Hücreler ultraviyole ışığa (UV) maruz kaldığında da DNA hasarı oluşmaktadır. DNA hasarı iki şekilde meydana gelebilir. UV ışık H_2O_2 'e etki ederek OH^\bullet radikali meydana getirebildiği gibi doğrudan pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. İyonizan radyasyonun suyun homolizine neden olarak OH^\bullet radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir (Simic, 1994; Burçak ve Andican, 2004).

DNA'da ROT tarafından oluşan oksidatif hasar yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların başlıca nedeni ve göstergesi olarak görülmektedir (Müftüoğlu, 2003; Halliwell, 1989; Dizdaroğlu, 1999).



Şekil 9. Oksidatif stres ile ilişkili klinik durumlar (Demir, 2010).

1.6.3. Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı

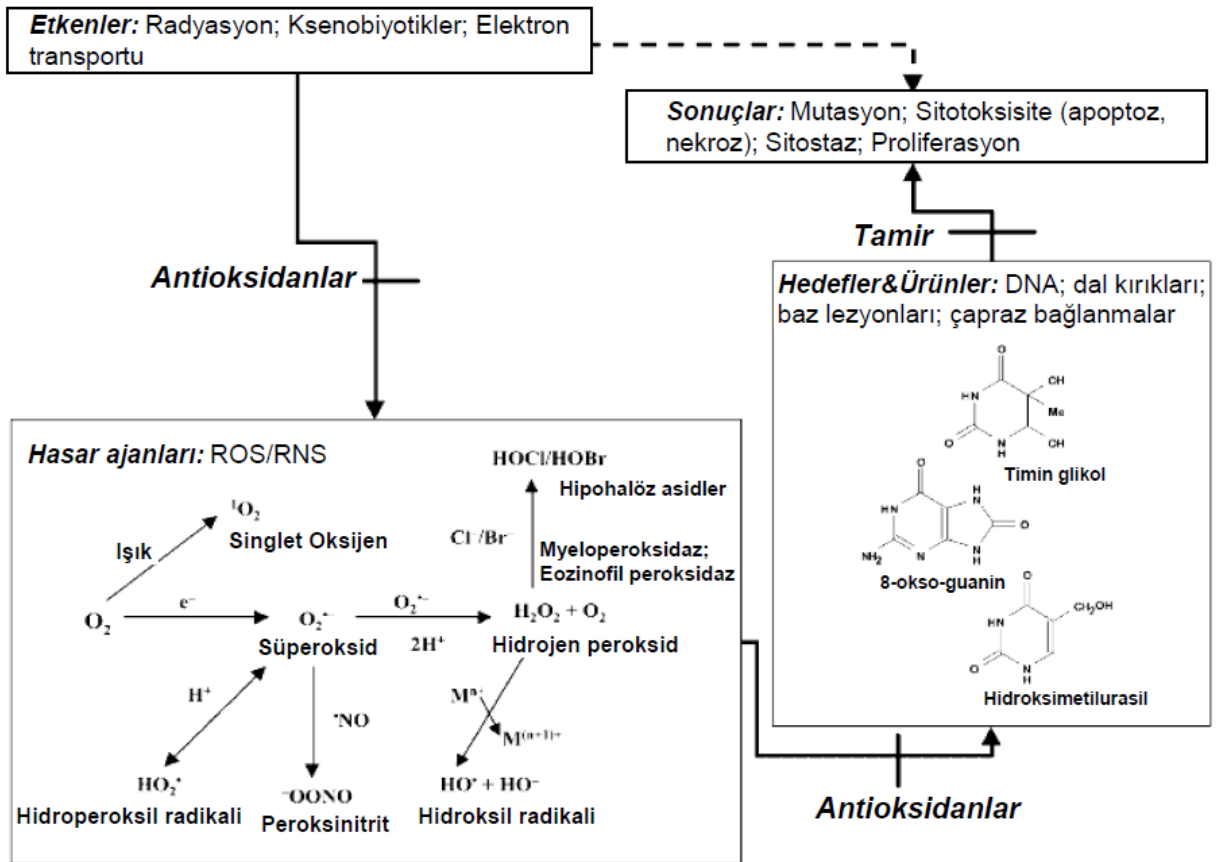
1.6.3.1. Oksidatif DNA Hasar Oluşumu

Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. Stabil bir molekül olan DNA'da; lipitler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğramaktadır. DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür. Oksidatif mekanizmalar; karsinogenin başlatıcı, geliştirici ve malign tümöre dönüşüm evrelerinde potansiyel role sahiptirler. $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , NO^{\cdot} veya HOO^{\cdot} gibi ROT'lar hücrede metal katalizli dönüşümden sonra veya doğrudan DNA'da hasar oluşturur (Boiteux ve Radicella, 1999). Bu tip DNA hasarı '*Oksidatif DNA Hasarı*' olarak tanımlanır ve mutajenez, karsinogenin, yaşlanma gibi biyolojik süreçlerde etki gösterir. Yapılan çeşitli araştırmalar, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in doğrudan DNA ile etkileşerek baz oksidasyonuna veya DNA sarmal kırıklarına yol açmadığı ancak geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşan ve daha aktif bir tür olan hidroksil radikalinin (OH^{\cdot}) DNA hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir. OH^{\cdot} çok reaktif olmasından dolayı hemen hemen her moleküle saldırarak hasar oluşturur (Halliwell, 1989).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift zincir kırıkları,

abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker fosfat omurgası hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (Evans ve Cooke; 2004).

Fenton Kimyası hipotezine göre OH•radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur. H₂O₂, O₂⁻ gibi radikaller doğrudan DNA hasarı oluşturamazlar. OH•radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için bizzat DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Fe^{+2/+3} ve Cu^{+1/+2} iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi, oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H₂O₂'nin hedefi haline getirmektedir (Halliwell, 1994; Halliwell, 1991). DNA'ya bağlı metal iyonları ile H₂O₂'nin DNA üzerindeki reaksiyonu sonucu oluşan OH•radikalleri, OH•radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH•radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedirler (Demir, 2010).



Şekil 10. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı

Nükleaz Aktivasyon hipotezine göre; oksidatif stres sitozolik Ca^{+2} iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olur ve buna bağlı olarak nükleusdaki Ca^{+2} bağımlı endonükleazları aktive edilerek ve DNA fragmantasyona uğramaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca^{+2} şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır. In vivo koşullarda her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir (Demir, 2010).

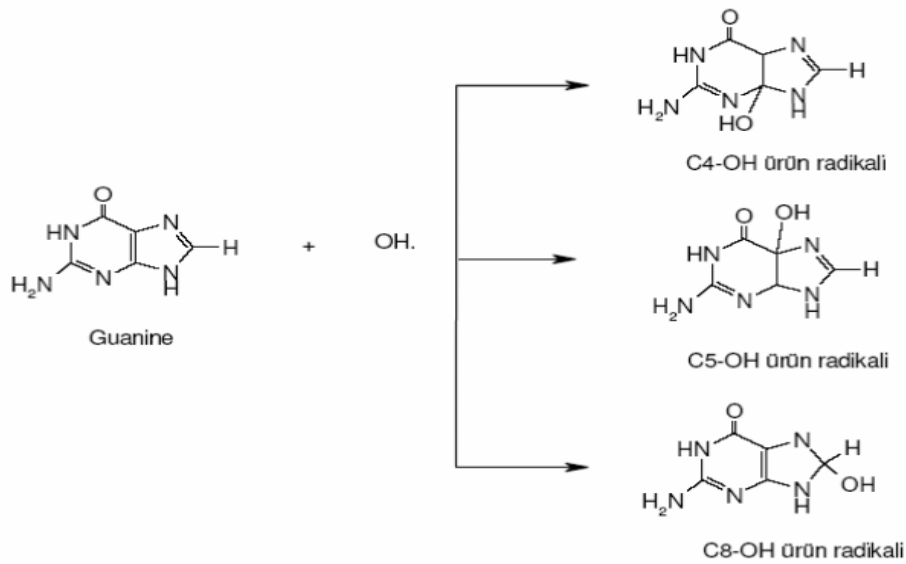
Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir (Halliwell ve Aruoma, 1991).

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak 'hasarlı dal onarıcı enzimlerle' onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir (Evans ve Cooke, 2004).

DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında programlı hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşmektedir. DNA'da zincir kırıklarının oluşumundan sonra DNA onarım mekanizmasının bir elemanı olan NAD^{+} bağımlı poli ADP-riboz polimeraz enzimi (PARP) aktive olmakta ve DNA hasarı belirli bir düzeyi aştığında ise aşırı NAD^{+} ve ATP tüketimi sonucunda hücre ölüme gitmektedir. Hücrenin NAD^{+} bağımlı programlı ölümü olarak adlandırılan bu olayın, yaygın hasarlı DNA'ya sahip hücrelerde, malign potansiyelli somatik mutantların oluşumunu engellemeye yönelik intihar yanıt olduğu öne sürülmüştür (Winyard, 1990).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. OH^{\bullet} radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Örneğin bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya adeninin 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına OH^{\bullet} radikali katılarak çeşitli ürünler oluşmaktadır. Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır. Hasarlı bazlardan bazıları timin-glikol, sitozin-glikol, 8-okso 2'deoksiguanozin (8-OHdG), FAPyGuanin ve FAPyAdenin'dir (Cooke vd., 2003).

8-OHdG ilk defa 1984 yılında Kasai ve Nishimura tarafından oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak tespit edilmiştir. Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır. Cu^{+2} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek orandabulduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan bazguanindir. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'deoksiguanozin, guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşur. (Evans ve Cooke, 2004; Cooke vd., 2003, Rodriguez, 1995).8OHdG büyük oranda sitozin ile doğru eşleşme yaparken düşük bir oranda da adenin ile hidrojen bağı yaparak GC \rightarrow AT (G \rightarrow T) transversiyon mutasyonuna neden olmaktadır (Cadet vd., 2003).



Şekil 11. Hidroksil radikali ile guanin bazının reaksiyonu (Atmaca ve Aksoy, 2009)

8-OHdG miktar tayini için ise son zamanlarda birçok analitik metot geliştirilmiştir. Bunlar kapiler elektroforez (CE), HPLC, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), immunoafinite kromatografi-monoklinal antibadi temelli ELISA kitleridir. Bunların yanısıra 8-OHdG'nin neden olduğu DNA tek zincir kırıklıkları Comet tekniği ile kalitatif olarak gözlemlenebilmektedir (Atmaca ve Aksoy, 2009).

1.6.3.2. Oksidatif DNA Hasar Onarım Mekanizmaları

Canlı organizmalar DNA'larını korumak için çeşitli DNA onarım mekanizmalarına sahiptir. Oksidatif DNA hasarına karşı savunma ve onarma yolları mevcuttur.

Bunlar,reaktif oksijen türlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen antioksidanlar ile DNA tamir mekanizmalarıdır.

Memeli hücrelerinde farklı DNA hasarları farklı DNA onarım yolları ile onarılmaktadır. DNA’da oluşan hasara verilen cevapta üç olasılık vardır. İlki; “hasar toleransı” olarak adlandırılan ve hasarlı bölgenin onarılmadan önce replikasyon mekanizması tarafından tanınarak lezyonun üzerinden atlanmasıyla replikasyona devam edilmesini sağlayan yoldur. Bu yolakta lezyon DNA’dan çıkarılmadığı için hasar toleransı; onarım yollarının içine dahiledilmemektedir. İkinci yol; hasar tipine göre işlev gören onarım yollarının görev almasıdır. Üçüncü yol ise; hücrenin kompleks sinyal yolak ağına sahip olması nedeniyle hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrol noktalarının (checkpoint) aktivasyonu sağlanarak hasarlı DNA’nın onarımı veya programlı hücre ölümüne gidilerek cevabın sağlanmasıdır. Başlıca DNA tamir yolları baz çıkarma onarımı, nükleotid çıkarma onarımı, yanlış eşleşme onarımı, çift zincir kırıkları onarımı ve direkt onarımdır (Friedberg, 2003).

1.7. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Son yıllarda hücre DNA’larında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde birtakım analitik teknikler; immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Comet testi), ³²P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elusyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) kullanılmaktadır. Genel olarak kütle spektrometrenin (MS) kullanılmadığı teknikler hasar sonucu şekillenen 20’den fazla lezyonlu DNA ürünleri arasında sadece birini (8-OHdG) ölçebilirler ancak bu molekülün kimyasal yapısı ve iyon değerleriyle ilgili bilgiler sağlanamaz (Atmaca ve Aksoy, 2009).

1.7.1. Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

DNA’daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan “Tek Hücre Jel Elektroforezi” (SCGE) hassas, basit ve hızlı bir görsel floresan tekniğidir. Teknik, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmakta olup ‘Single Cell Gel Electrophoresis’, ‘Comet

Analiz'ya da ' Microgel Electrophoretic Tecniqe ' olarak da adlandırılmaktadır (Anderson vd., 2010; Fidan, 2010; Yeni vd., 2010).

1.7.1.1. Comet Yönteminin Tarihçesi

İlk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere 'Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği' (SCGE) oluşturulmuştur. Ostling ve Johanson mikroskop lamı üzerinde, bir ince tabaka agar jeline süspansiyon ettikleri az sayıda hücreyi, tuz ve deterjanlarla lize ettikten sonra, nötral şartlarda elektroforeze tabi tutmuşlardır. Elektroforez sırasında uygulanan elektrik akımı, kırılmış hafif DNA parçalarının çekirdekten daha hızlı göçünü sağlamaktadır. Dolayısıyla comet tekniği, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromid gibi fluoresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında bu hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünüm almaktadır (Anderson vd., 2010; Fidan, 2010).

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysaki, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlar altında (pH>13), DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren '*alkali comet analizi*' geliştirilmiştir. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin %95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmaktadır (Singh, 1988; Tice, 1990).

Klaude ve Collins kuyruk oluşturma yönteminin altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok tek zincir kırıkları veya alkali oynak bölgeler oluşturmaları nedeniyle metodun bu versiyonudaha çok önerilir hale gelmiştir. Böylelikle comet tekniğinin yeni tasarımı, birey hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (Olive, 1990).

Tablo 5. SCGE yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri (Yeni vd., 2010).

| pH: 7-8 | pH: 10-12 | pH > 13 |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Çift sarmal kırıkları | Çift sarmal kırıkları | Çift sarmal kırıkları |
| Çapraz bağlar | Tek sarmal kırıkları | Tek sarmal kırıkları |
| | Eksizyon tamir bölgeleri | Eksizyon tamir bölgeleri |
| | Çapraz bağlar | Çapraz bağlar |
| | | Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar |

DNA göçü hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez koşullarına bağlı olarak maksimuma ulaşır. Düşük hasar seviyelerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrılmıştır (Anderson vd., 2010; Yeni vd., 2010).

Hücrenin baş tarafına göre kuyruktaki floresan şiddetinin karşılaştırılması ile sarmal kırıklarının sayısı hakkında bilgi edinilebilir. Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğundur. Ancak DNA'da kırıklar olduğunda floresan çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyruk bölgesinde daha şiddetli olur. Hasarlı hücrelerde floresan baş taraftan kuyruğa doğru geçişi yansıttığından, DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesinde kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu comet yönteminin önemli parametreleridir (Anderson vd., 2010; Klauning, 2011).

1.7.1.2. Comet Yönteminin Kullanım Alanları

Comet tekniği; DNA hasar veya onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitinde, insan lenfosit örneklerinin oksidatif hasar, UV ve iyonize radyasyona duyarlıklarının incelenmesinde; izleme (Human Biomonitoring) çalışmalarında DNA hasarının incelenmesinde kullanılmaktadır (Anderson vd., 2010).

1.7.1.3. Comet Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları

Comet yönteminin hızlı olması çabuk sonuç alınabilmesi, değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilmesi, hassas ve güvenilir olması, maliyetinin düşük olması, materyal gereksiniminin az olması, yöntemin az sayıda hücre gerektirmesi, çeşitli türlerde DNA

hasarlarının tespitine olanak sağlaması ve hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyabilmesi başlıca avantajları olarak sıralanabilir (Anderson vd., 2010).

Yöntem *in vivo* modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı proliferasyon yapan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksikite testlerinden daha üstündür (Demir, 2010).

SCGE yöntemi ile insan, hayvan ve bitki hücreleri gibi birçok çeşit hücre *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. En çok kullanılan insan hücreleri lökositler ve lenfositlerdir. Ancak, nasal veya gastirik mukoza hücreleri, lens, deri, reproduktif hücreler, kolon hücreleri neonatal fibroblastlar, pankreas hücreleri, adenokarsinomlu hücreler gibi bir çok doku hücrelerinde kullanıldığı bildirilmiştir (Fidan, 2010; Anderson vd., 2010).

Hayvan ve klinik örneklerden alınan dokularda veya örneklerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için örneklerin izole süspansiyonu ek bir hasara veya onarıma yol açmayacak şekilde hazırlanmalıdır. Pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği; donörün yaşı, fiziksel aktivitesi, sigara içip içmediği gibi olası faktörlerin hücre cevabında farklılık yaratabildiği ve bireyler arası farklılıkların olabileceği unutulmamalıdır (Fidan, 2010; Anderson vd., 2010).

Normalde sıklıkla kullanılan hücre grubu, beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler oransal olarak girişimsel olmayan yollarla, kolaylıkla ayrılabilir ve metoda iyi uyum sağlarlar. Ancak kanser için hedef doku olmamaları ve beyaz kan hücrelerindeki hasarın gerçek hedef dokudaki hasarı yeterince yansıtmadığının net olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bazen cerrahi sonrası çıkarılan dokular kullanılabilirlikle birlikte sağlıklı kontrol dokusu elde etmek oldukça güçtür. Yöntem bukkal ve üreteriyal epitel hücreler de denenmiştir ancak bu hücreler, yapıları nedeniyle ek proteaz kullanımını ve uzun bir lizis süresini gerektirirler. Comet yöntemi için hazır ticari kitler kullanıma sunulmakla birlikte, günümüzde manuel uygulamalar geçerliliğini korumaktadır. Fakat manuel uygulamalar, yöntemi uygulayan kişiye doğrudan bağlıdır ve kişisel performanstan fazlasıyla etkilenmektedir. Ayrıca comet tekniğinin farklı uygulanması da sonuçlarda farklılıklara sebep olmaktadır (Collins vd., 1997).

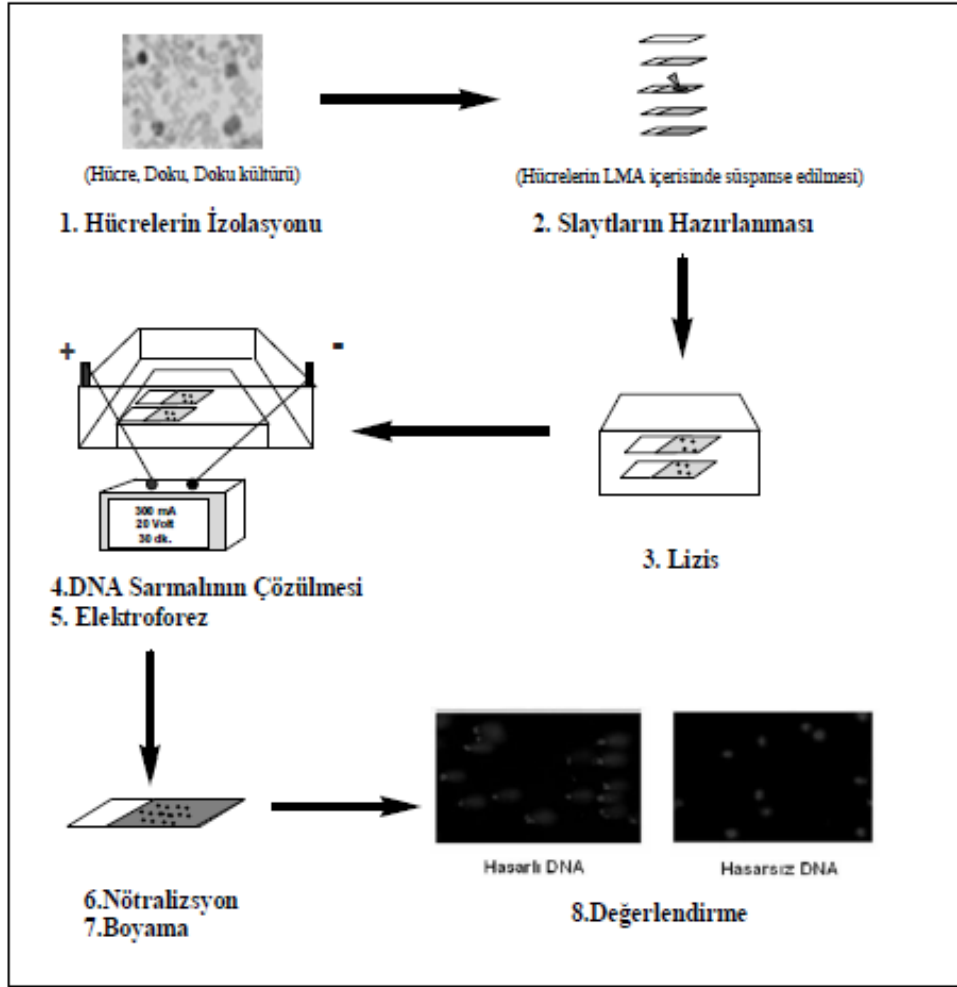
1.7.2. Alkali Comet Yönteminin Uygulama Basamakları

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Tek hücreler veya çekirdekçikler Şekil 12'de görüldüğü gibi agarozda gömülür; yüksek tuz

ve deterjan içeren lizis solüsyonunda hücrelerin lize olmaları sağlanır. Lizis ardından DNA'ların elektroforez de yürütülür. Bu esnasında hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden yürür ve kuyruk oluşturmaz, oysa hasarlı DNA'larda hasardan dolayı oluşan fragmenler farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip oldukları için elektriksel alanda farklı hızlarda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Sonuç olarak elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilerek bir fikir oluşturulur (Yeni vd., 2010).

Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuvar koşullarına göre farklılık göstermekle beraber Tice ve arkadaşları SCGE yönteminin genel basamaklarını şöyle sıralamışlardır (Fidan, 2010; Nossoni, 2008; Dhawan vd., 2009; Tice vd., 2000):

1. Hücrelerin izolasyonu
2. Slaytların hazırlanması
3. Lizis
4. DNA sarmalının çözülmesi
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. Boyama
8. Değerlendirme.



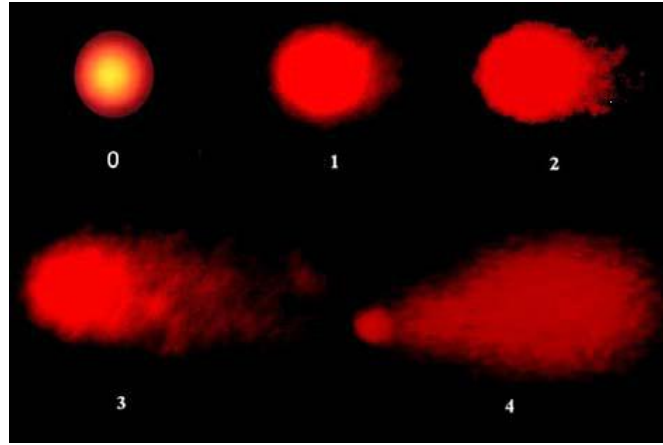
Şekil 12. Alkali comet tekniğinde temel basamakların şematik gösterimi (Fidan, 2010)

1.7.3. Görüntülerin Elde Edilmesi ve Değerlendirme

1.7.3.1. Görsel Skorlama Yöntemi

Görsel sınıflandırma hızlı ve kolay bir yöntemdir. İnsan gözü, oluşan kuyruk uzunluğu ve yoğunluğuna göre hasar derecesini ayırt edebilir. Hücreler hasar derecelerine göre beş gruba ayrılır. Teknikte hasarsız hücreler yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümündedir. Hücrelerin bu görünümü göç etmemiş olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise göç uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik göstereceğinden, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçmesi nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama oluşur. Bu görünüme; gerilmiş (stretch) ya da düşük dereceli göç (low migration) adı verilmektedir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (comet), yüksek dereceli göç (high migration) şeklini alır. Son aşama ise apoptozistir. Bu

uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir. Fakat bu yaklaşım hasarlı hücreler arasındaki tahribatın büyüklüğü hakkında bilgi vermekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hasarlı hücreler, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırılır (Nossoni, 2008; Olive vd., 1990). Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre Şekil 13'de görüldüğü gibi 1 den 4'e kadar puanlandırılır ve sonuçlar görsel skorlama ile değerlendirilir (Yeni vd., 2010).



Şekil 13. Görsel skorlama tekniği ile hücrelerin sınıflandırılması(0:Hasarsız DNA görüntüsü, 1-4:Hasarlı DNA'ların hasar derecesine göre puanlanması)

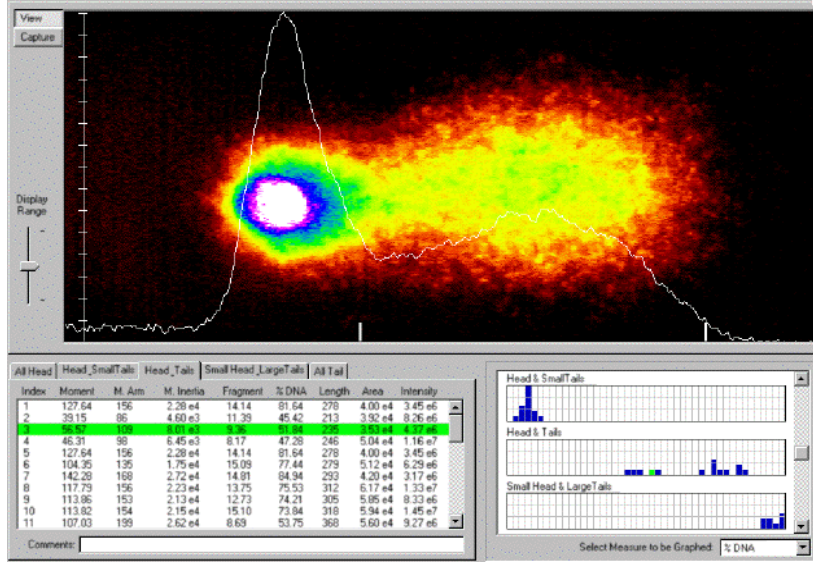
1.7.3.2. Bilgisayar Sistemi ile Görüntü Analizi

Gelişmiş laboratuvarlarda sonuçların değerlendirilmesinde kameralı bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi çeşitli comet parametreleri özel bilgisayar yazılımları kullanılarak başarılı ve objektif olarak değerlendirilebilmektedir (Yeni vd., 2010).

Belli bir bölgedeki DNA miktarının, o bölgedeki fluoresans yoğunluğu ile doğru orantılı olması özelliğinden yararlanılarak dijital görüntü sistemleri ve analiz yazılım programları ile daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılan parametreler olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti

ise; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır (Tice, 2000; Hartmann vd., 2003).

Son yıllarda değerlendirmede Laser-scanning microscopy (LSM) teknolojisi kullanılarak DNA sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla tespit edilmektedir.



Şekil 14. Comet görüntülerinin bilgisayar yardımı ile değerlendirilmesi (URL-3, 2012)

1.7.4. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Comet tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır (Demir, 2010).

Ancak çevresel ve fizyolojik değişikliklerin comet yönteminin varyasyonlarına katkısını tahmin etmek zordur. Sağlıklı kişilerde DNA hasarında değişiklik oluşturan faktörler; yaş, hava kirliliği, diyet, cinsiyet, sigara, güneş ışığına maruziyet, enfeksiyon ve meslek olarak sayılabilir (Anderson vd., 2010; Demir, 2010).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DMSO (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Himedia)
- NaOH (Merck)
- Histopaque 1077 (Sigma)
- Etidyum Bromide (Sigma)
- Triton-X 100 (Merck)
- Na₂EDTA (Merck)
- Trizma Base (Himedia)
- NMP agaroz (Vivantis)
- LMP agaroz (Vivantis)
- Etil alkol (Merck)
- Na₂HPO₄. 2H₂O (Himedia)
- KH₂PO₄ (Merck)
- H₂O₂ (% 30) (Sigma)
- Trypan Blue (Merck)
- RPMI 1640 (Sigma)
- DPPH (Sigma)
- Folin-Ciocalteu Reaktisi (Sigma)
- Na₂CO₃ (Merck)
- Kateşin (Sigma)
- %1-3 lük hipoklorit çözeltisi

2.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarflar

- Hassas terazi (Acculab atilon)
- pH metre (Hanna HI2210)
- Santrifüj (Hettich)
- Mikrosantrifüj (Beckman-Coulter)
- Elektroforez tankı (Cleaver Midi)
- Spektrofotometre (Molecular Devices SpektraMax M5)

- Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı) (Heidolph Laborota 4000)
- Mikroplaka yıkayıcısı (BioTek Elx50)
- Otomatik mikro pipetler (Rainin)
- Traşlı lam (Marienfeld 17x26x1mm boyutunda)
- Thoma lamı
- Buz banyosu (IQ 85C Aire ITV)
- MW fırın (Arçelik)
- EtBr için tip atık kutusu
- Lamel (Iso therm 22x22 boyutunda)
- 1.5 mL ependorf tüpü
- Plastik pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Çalkalayıcılı su banyosu (Memert WNB7-5)
- HPLC (Thermo Finnigan)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Leica DM 4000 B)
- Işık mikroskobu (Leica DM 500)
- Isıtıcı Blok (HLC MHR 13)
- Buzdolabı (Bosch)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Deiyonize Su Cihazı (Sartorius Arium 61316)
- Class 2 Steril Kabin (Scanlaf)
- İnkübatör (Wisecube)
- Manyetik Karıştırıcı (Wisestir MSH 20-D)

2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Folin-Ciocalteu Reaktifi; 0.2 N

2 N'lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 10 kat seyreltilerek hazırlanır.

Na₂CO₃ çözeltisi; % 7'lik (w/v)

7 g Na₂CO₃ alınır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf suda 100 mL'ye tamamlanır.

Stok Kateşin Çözeltisi; (1 mM)

2.9 mg kateşin az miktarda alkolde çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlanır.

DPPH Çözeltisi; 100 µM

3.94 mg DPPH bir miktar metanolde çözüldükten sonra son hacim 100 mL metanolle tamamlanır.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS), pH 7.4

| | |
|---|---------|
| NaCl | 4 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0.89 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.135 g |

tartılıptemiz bir behere aktarılır, 400 mL kadar saf su içerisinde magnetik karıştırıcıda magnetik bar yardımıyla çözülür. Kalibre edilmiş pH metre ile çözelti pH'sı 7.4'e ayarlanır. Çözelti balon jøjeye aktarılarak son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanıp 2-8 °C'de saklanır.

Lizis Çözeltisi; pH 10, 500 mL

Bir behere 2.5 M (73.05 g) NaCl, 100 mM (18.6 g) EDTA ve 10 mM (0.6 g) Tris tartılarak konulur. Üzerlerine 350 mL distile su eklenerek karıştırıcı yardımı ile çözünmeleri sağlanır. Çözelti pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra karışım balon jøjeye aktarılarak son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Kullanılmadan önce çözeltiye son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde, Triton-X-100, %10 olacak şekilde DMSO eklenir.

Elektroforez Tampon Çözeltisi;pH 13.1, 500 mL

Elektroforez tamponunu hazırlamak için, 10 mM (1.86g) Na₂EDTA, 300 mM (6 g) NaOH tartılarak behere konulur. 400 mL distile su eklenip, karıştırılarak eritilir. Kalibrasyonu ayarlanmış pH metre ile pH'sı 13.1'e ayarlanır. Balon jøjeye aktarılarak son hacim 500 mL'ye tamamlanır.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi;pH 7.5, 500 mL

24.2289 g TRİS (0.4 M) 400 mL distile suda çözümlenip pH 7.5'e ayarlanır. Distile suyla 500 ml'ye tamamlanır. 2-8 °C'de saklanır.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi; % 1

0,5 g NMP agaroz tartılır ve 50 mL PBS (pH 7.4) üzerine konulur. Mikrodalga fırında kaynatılarak hazırlanır.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi; % 0.5

0.05 g LMP agaroz tartılır ve 10 mL PBS (pH 7.4) üzerine konulur. Mikrodalga fırında kaynatılarak hazırlanır.

Etidyum Bromür Çözeltisi; 20µg/mL

Stok etidyum bromür çözeltisinden (0,5 mg/mL, distile su) 40 µL alınarak 960 µL distile su ile dilüsyon yapılır. Böylece son konsantrasyonu 20 µg/ ml olan etidyum bromür çözeltisi hazırlanır.

H₂O₂ Çözeltisi; 1mM

% 30' luk H₂O₂ çözeltisinden 10.3µL alınır, 4 °C deki PBS'den 989.7 µL alınarak son hacim 1 ml'ye tamamlanır (100 mM). Deney için, 100 mM H₂O₂ çözeltisinden 10 µL alınır, 990 µL PBS ile son hacim 1 ml' ye tamamlanır (1 mM).

2.4. Çay Numunelerinin Eldesi ve Ekstraktlarının Hazırlanması

2011 yılının şubat ayında Rize Taşlıdere Çay İşleme Fabrikası'ndan yeşil çay ve farklı atıkları, Rize Zihni Derin Çay İşleme Fabrikası'ndan siyah çay ve siyah çaya ait 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 6'da şu şekilde kodlanmıştır.

Tablo 6. Numune kodları

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

Çay özütlerinin hazırlanması için 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, süzüntü alınarak tekrar aynı işlem uygulandı. Daha sonra etil asetat çözücüsüyle yapılan işlemlerin aynısı metanol

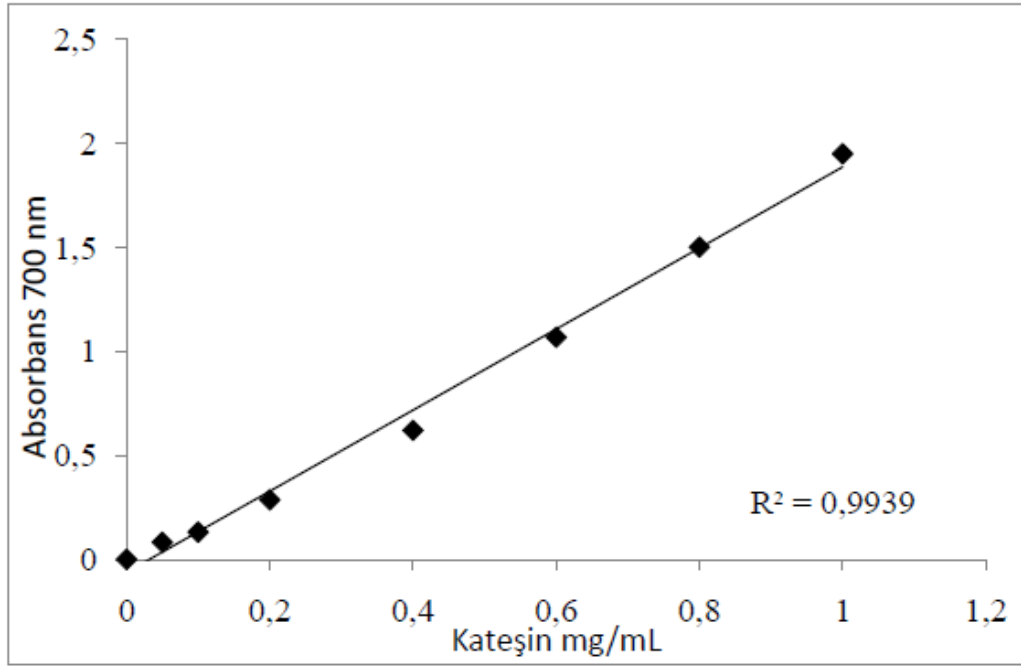
kullanılarak yapıldı ve süzüntüler toplanarak çözücüleri evaporatörde uçuruldu. Elde edilen çamur kıvamındaki kalıntılar Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü laboratuvarında bulunan liyofilizatör ile yoğunlaştırıldı. Özütler DMSO'da çözülerek sonraki tayinlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.5. Özütlerde Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntem, metanol ve etil asetat çözücülerinde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifli ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbands oluşturur. 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 7'deki gibi pipetleme yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı ve bu zaman sonunda 700 nm'de köre karşı okuma yapıldı ve şekil 18'de verilen kalibrasyon grafiği elde edildi. Oluşturulan bu grafikten numunelerin absorbandsları standart grafik aralığında olacak şekilde seyreltmeleri yapılarak toplam fenolik içerikleri hesaplandı.

Tablo 7. Polifenol tayini için pipetleme miktarları

| | Kör (ml) | Numune (ml) | Standart (ml) |
|---|--------------------|----------------------|-------------------------------|
| Numune | - | 0.05 | - |
| Standart | - | - | 0.05 |
| Deiyonize su | 2.55 | 2.5 | 2.5 |
| 0.2 N Folin | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| | | Tüpler | çalkalandıktan 3 dakika sonra |
| % 7 Na₂CO₃ | 0.75 | 0.75 | 0.75 |
| | 2 saat inkübasyona | bırakılır, 700 nm'de | absorbansları okunur. |



Şekil 15. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği

2.6. Yeşil ve Siyah Çay ile Bunların Farklı Atıklarından Elde Edilen Ekstraktlardaki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi

Çalışmanın bu kısmı ÇAY-KUR Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Yöntem bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin cinsi ve miktarı, sistemde önceden yürütölen saf standart fenolik bileşikler (gallik asit, kafein, kateşin (K), EGK, EGKG, EK, EKG ve teoflavinler) referans alınarak belirlenir (ISO 14502-2, 2005).

Sistemde kullanılan mobil fazların içeriği şu şekildedir:

Mobil faz A : % 9 asetonitril, % 2 asetik asit ve 20 ppm EDTA

Mobil faz B: % 80 asetonitril, %2 asetik asit ve 20 ppm EDTA

Gradient şartları Tablo 8'deki gibi ayarlandı.

Tablo 8. Gradient şartları

| | % A | % B |
|--------------|-----|-----|
| 0-10 dakika | 100 | 0 |
| 10-25 dakika | 68 | 32 |
| 25-35 dakika | 68 | 32 |
| 35-45 dakika | 100 | 0 |

2.7. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Denemelerde kullanılan DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup çay özütlerinin bu radikalin 100 μM 'lık metanolik çözeltisinde radikal temizleme aktivitesi incelenmiştir. Denemelerde Cuendet yöntemi kullanıldı. Elde edilen özütler ve standart (kateşin) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartlar 5-10-15-20 μM 'lık; numuneler ise μM kateşin eşdeğer cinsinden 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı ve ölçümler mikropılaka üzerinde yapıldı. Eşit hacimde (150 μL) DPPH• çözeltisi, 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 absorptans verdiği 517 nm'de absorptanslar okundu (Cuendet, 1997). Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalama dan çıkarıldı. Bulunan absorptanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC_{50} değerleri μM cinsinden hesaplandı.

2.8. IC_{50} Değerlerinin Bulunması

IC_{50} ; radikal miktarını veya hasar ürününü yarıya indiren çay özüt miktarıdır. IC_{50} değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda dört farklı konsantrasyon ile değerlendirme yapıldı. Çay özütleri ile muamele edilen periferik kan lenfositlerine daha sonra H_2O_2 ile hasar verilmek suretiyle comet analizi uygulandı. DNA'lar skorlandı ve skorlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum skorun yarısına karşılık gelen yani skoru yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC_{50} değerini vermektedir. IC_{50} μM birimiyle ifade edildi.

2.9.Comet Tekniğinin Lenfositlere Uygulanması

2.9.1. Lam Kaplama

Lamlar etil alkole daldırılarak temizlenmesi sağlandı. Ardından asetona daldırılıp dikey şekilde kurumaya bırakıldı.

% 1'lik NMP agaroz jel MW fırında hazırlanarak 60°C'deki su banyosuna bırakıldı. Lamlar beher içerisindeki NMP agarozla daldırılır ve çıkarıldıktan sonra dip kısmı hızlıca bir peçeteye değdirildi. Arka kısmı da peçete ile silinerek oda sıcaklığında kuruması için düz bir zeminde bırakıldı. Kullanılncaya dek kapalı bir kutuda bekletildi (Dhawan vd., 2009).

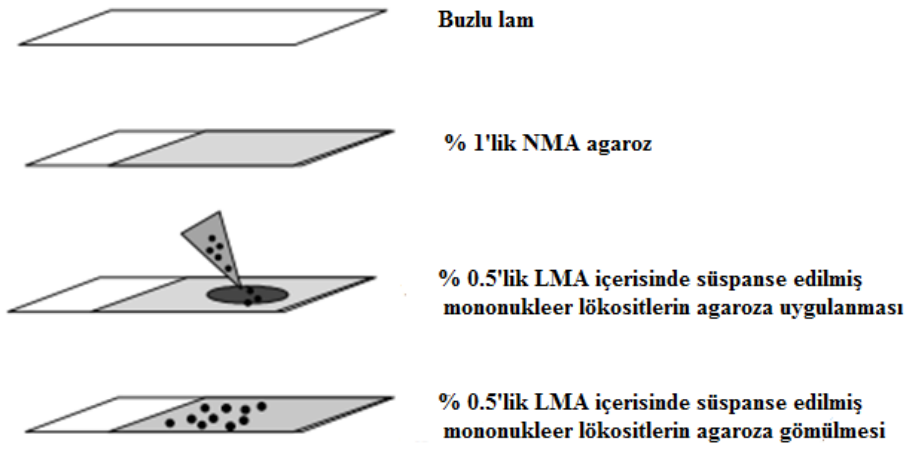
2.9.2. Lenfosit İzolasyonu

Çalışmalar, deney günü sağlıklı bireylerden heparinli tüplere alınan taze kan ile yapıldı. 5 mL kan, 5 mL RPMI-1640 çözeltisi ile seyreltildi ve yavaşça karışması sağlandı. Aynı bir tüpe konulan 3 mL Histopaque üzerine, seyrelmiş kan pastör pipeti yardımıyla yavaşça tabakalandırılıp 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan PBMC (Periferel blood mononuclear cell) tabakası pastör pipet ile toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı, PBS ilave edilerek yavaşça alt üst edildi. 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atılıp pellete 1 ml PBS ilave edilerek resüspanse edildi (Aydın vd., 2005).

2.9.3. Örneklerin Hazırlanması ve Lamlara Yüklenmesi

- ✓ Yaklaşık 50 µL hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Çay özütlerinin PBS'de hazırlanmış çözeltilerinden uygun hacimler konularak son hacim PBS ile 1 mL'ye tamamlandı. Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 200 µM H₂O₂ kullanıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı.
- ✓ İncelenen çay bileşiklerini içeren hücre süspansiyonları 37± 0.5 °C'de 30 dakika bekletilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- ✓ Pozitif kontrol olarak 200 µM H₂O₂ kullanılacak hücrelere inkübasyondan sonra 200 µL 1 mM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi ve +4 °C'de PBS ile son hacim 1 mL'ye tamamlandı. 5 dakika buz banyosunda inkübe edildi.

- ✓ +4 °C'de 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. +4 °C'de 1 mL PBS ile 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
- ✓ 37±0.5 °C'de eritilmiş 75 µL %0.5'lik LMPA, 10 µL hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden %1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı, buzlu yüzey üzerinde 10 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı (Aydın vd., 2005).



Şekil 16. Örneklerin lamlara yüklenmesi (Fidan, 2010)

2.9.4. Lizis

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır. Lamlar, en az 30 dakika önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi. H₂O₂ uygulanan lamlar farklı bir soğuk lizis çözeltisine daldırıldı (Dhawan; Aydın vd., 2005).

2.9.5. Elektroforez

DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez süresi, çalışılmakta olan hasar ile incelenmekte olan hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Akım uygulanmadan önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar elektroforez tamponunda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon döneminin amacı yüksek yoğunluklu tuzlu lizis solüsyonunun DNA

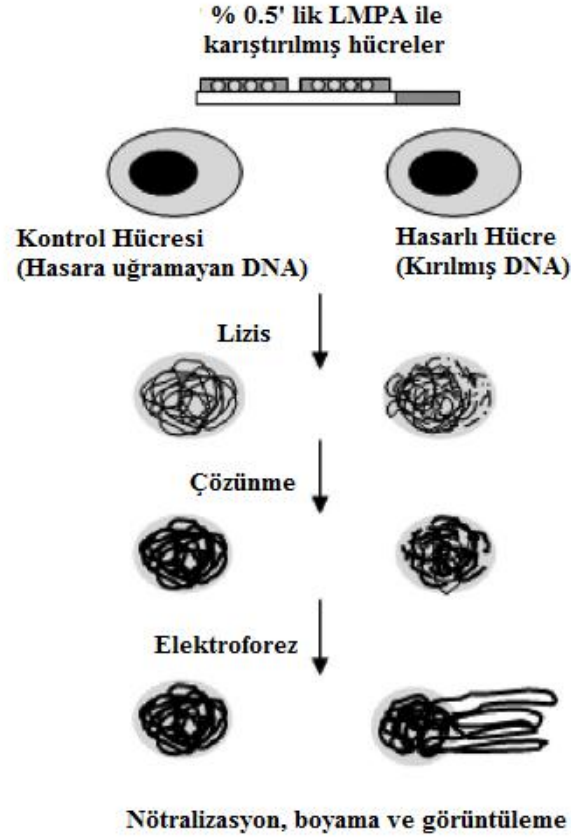
ile bir elektrotmuş gibi mücadele ettiği tabakadaki agardan ayrılmasını sağlamaktır (Aydın vd., 2005; Fidan 2010).

Lizis çözeltisinden çıkarılan lamalar elektroforez tankına yerleştirildi ve lamaların üzerini kaplayacak şekilde elektroforez tamponu yavaşça tanka boşaltıldı. 20 dakika boyunca DNA sarmalının çözülmesi için beklendi. Çözülme işleminin ardından 25 V, 300 mA'de akım verilerek 20 dakika elektroforez uygulandı. Resistansdan kaynaklanabilecek ısının dengelenmesi ve elektroforez işleminde optimum sıcaklık olan 4-20 °C'nin sağlanması amacıyla tankın üzerine buz paketleri konuldu (Dhawan, 2009; Aydın vd., 2005).

2.9.6. Nötralizasyon ve EtBr ile Boyama

Alkali elektroforez çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için, slaytlar 5 dakika distile suda bekletildi. Ardından 15 dakika nötralizasyon tamponunda (0.4 M Tris pH 7.5) nötralize edildi. Nötralizasyon çözeltisinden alınan slaytlar hücrelerin slayta fikse olmasını sağlamak amacıyla % 96'lık etil alkolde 10 dakika bekletildi. Slaytlar kurumaya bırakıldı.

Stok etidyum bromürden 40 µL alınarak 960 µL distile su ile dilüsyon yapıldı. 60 µL EtBr çözeltisi slaytlara damlatılarak lamel ile kapatıldı (Dhawan, 2009; Aydın vd., 2005).



Şekil 17. Normal ve hasarlı hücrelerde deneyin uygulanışı ve sonucunun gösterimi (Azqueta vd., 2009).

2.9.7. Floresan Mikroskop ile Değerlendirme

Kamera ataçmanlı floresan mikroskopta her lamdan 50 hücreye ait görüntü alındı. Bu yöntemde DNA migrasyonu görsel olarak değerlendirildi. Oluşan hasarın derecesine göre DNA'lar Anderson ve arkadaşları tarafından tariflenen 5 kategoride sınıflandırıldı (Anderson vd., 1994). Genotoksik hasarın gösterilmesinde kullanılan bu sınıflandırma sistemi kuyruktaki DNA yoğunluğuna göre yapılmaktadır.

Tablo 9. Lenfosit hücrelerinin görsel sınıflandırması (Anderson vd., 1994)

| Sınıflandırma | Görünüm |
|----------------|--|
| Sınıf 0 | Hasarsız hücrelerin incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü olanlar |
| Sınıf 1 | DNA hasarı oluşmaya başlamış ve normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alanlar |
| Sınıf 2 | Hasar arttıkça lenfositlerde merkezden kenara doğru uzama olup kuyruktaki fluoressan yoğunluğu artanlar |
| Sınıf 3 | DNA hasarı daha da artmış olup kuyruklu yıldız (comet) görünümü alan hücreler |
| Sınıf 4 | Hasar derecesinin en üst düzeyde olmasının sonucunda apoptotik hücre görünümü alanlar |

Değerlendirilen 50 hücreye ait DNA'lardaki hasar dereceleri tespit edilip çıkan sonuç 2 ile çarpıldı ve değerlendirme 100 üzerinden yapıldı. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Maksimum hasar 400 olabilecek şekilde bütün lamalar aşağıdaki formüle göre skorlandı (Munari vd., 2009).

$$\text{Skor} = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) \quad (n: \text{her skor için sayılan hücre sayısı})$$

Genotoksik ajan (H_2O_2) ile indüklenmiş DNA hasarının yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıkları ile giderilme oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Azalma} = (A-B) / (A-C)$$

A: Pozitif kontrol skoru

B: Ekstraktla muamele skoru

C: Negatif kontrol skoru

Maksimum skorun yarısına karşılık gelen yani pozitif kontrol skorunu yarıya düşüren konsantrasyon miktarları IC_{50} olarak verilmiştir. % 50 inhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen maddenin antioksidan aktivite yönünden etkili olduğu

söylenbilir. Hasar verilmesi sonucu oluşan skorun özütler aracılığı ile azaltılması antioksidan etkinin varlığını gösterir.

2.10. İstatiksel 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 parametrelerde gözlenen değişimin Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile çoklu karşılaştırma ise Tukey HSD testine göre yapıldı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

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

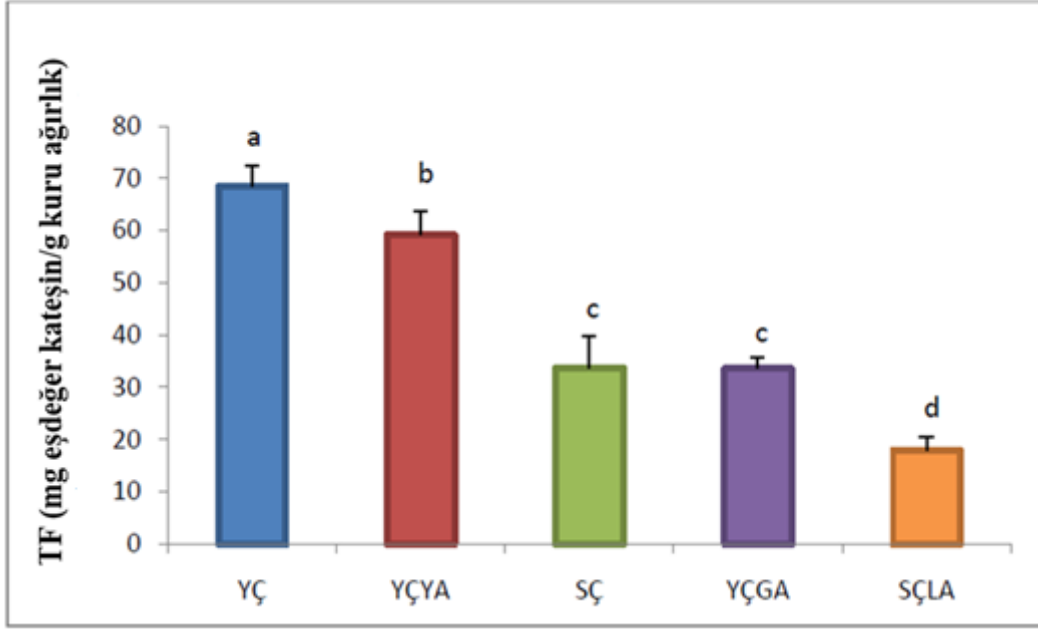
Folin-Ciocalteu yöntemiyle gram kuru ağırlık başına düşen mg kateşin eşdeğer olarak belirlenen fenolik madde miktarları Tablo 10'da verilmiştir. En yüksek fenolik madde muhtevası yeşil çayda (YÇ) gözlenirken siyah çay (SÇ) ve özellikle siyah çayın lif atığında (SÇLA) bu içeriğin en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 10. Yeşil ve siyah çay ile bunların farklı atıklarına ait toplam fenolik maddemiktarları

| Numune (n=15) | TF (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 olduğu gösterir.

Yeşil çayın toplam fenolik madde miktarının siyah çaya oranla daha fazla olduğu, yeşil ve siyah çay numunelerinin ise kendi atıklarına göre daha yüksek fenolik madde içerdiği Şekil 18'de grafiksel olarak verilmiştir.



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

Şekil 18. Yeşil ve siyah çay ile atıklarına ait toplam fenolik madde miktarları

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

3.2. Yeşil ve Siyah Çay İle Atıklarının DPPH Radikali Temizleme Aktivitesine İlişkin Bulgular

Numunelerde DPPH radikali temizleme yöntemiyle belirlenen örneklerin radikal temizleme kapasiteleri Tablo 11’de gösterilmiştir. Antioksidan aktivite, numunelerin farklı konsantrasyonları kullanılarak IC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

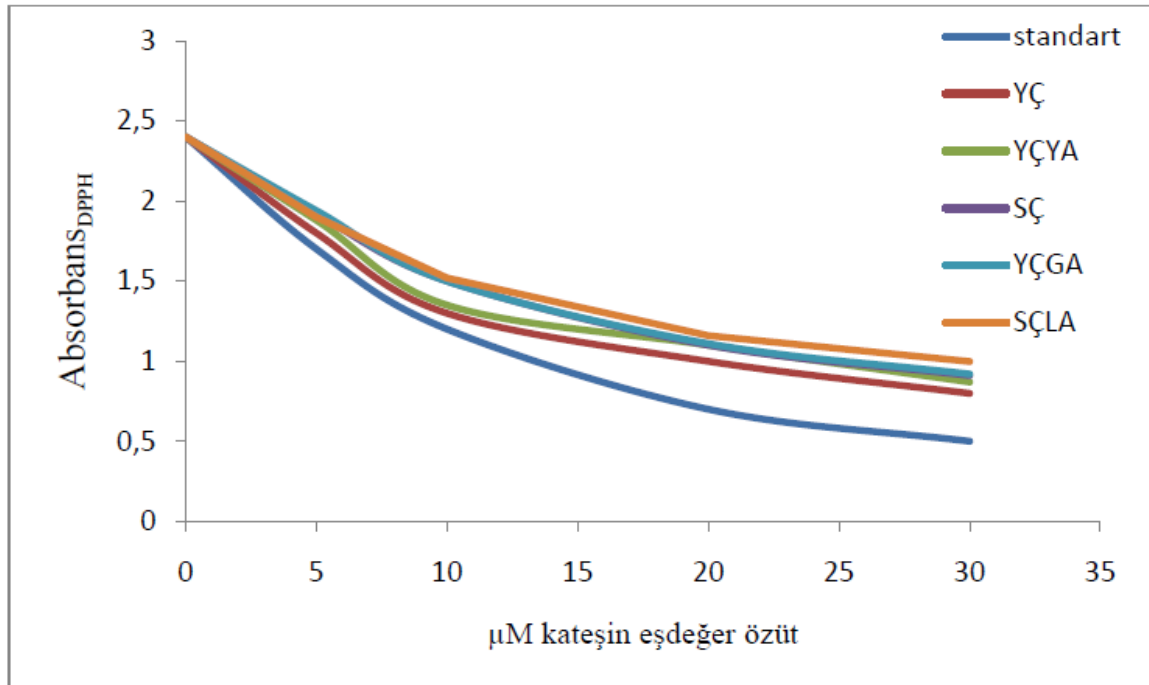
Tablo 11. Numunelerin DPPH radikali temizleme aktiviteleri

| Numune (n=15) | DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi (IC_{50} μM eşdeğer kateşin) |
|---------------|---|
| STANDART | 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 çay atıklarına göre radikal temizleme aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu değerlerin numunelerin fenolik içerikleriyle paralellik göstermesi ilgi çekicidir. Numunelerin DPPH radikal temizleme aktivitelerinin: STD > YÇ > YÇYA > SÇ = YÇGA > SÇLA şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir.

Numunelerin ve standart olarak kullanılan kateşinin DPPH radikal temizleme aktivitelerinin kinetiğini gösteren ve IC₅₀ değerlerini veren grafik Şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19. Numunelerin radikal temizleme kinetiğini gösteren grafik

3.3. Yeşil ve Siyah Çay ile Atıklarından Elde Edilen Özütlerdeki Polifenol Bileşiminin HPLC ile Analizi

Numunelerde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları standart kromatogram referans alınarak hesaplanmış ve Tablo 12'de verilmiştir. Buna göre fenolik madde içerik bakımından en fazla miktar YÇ'da bulunmaktadır. En fazla bulunan fenolik madde epigallokateşingallat (EGKG)'tır.

Tablo 12. Yeşil ve siyah çay ile atıklarında bulunan fenolik madde miktarları (ppm)

| Fenolik bileşiğin adı | YÇ | YÇYA | YÇGA | SÇ | SÇLA |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K | 0.041 | 0.023 | 0.049 | 0.007 | 0.006 |
| EK | 0.799 | 0.545 | 0.554 | 0.307 | 0.049 |
| EKG | 1.113 | 0.998 | 0.203 | 0.039 | 0.035 |
| EGK | 3.165 | 2.639 | 0.675 | 0.149 | 0.067 |
| EGKG | 6,142 | 3,42 | 0,921 | 0,079 | 0,028 |
| GA | 0.005 | 0.008 | 0.034 | 0.254 | 0.154 |
| Kafein | 1.527 | 1.578 | 0.477 | 2.021 | 1.776 |
| Toplam fenolik madde | 11,26 | 7,615 | 2,402 | 0,581 | 0,185 |

Özütlerin içeriklerinin kateşin, EGKG, EGK, GA, kafein ve toplam miktar bakımından birbirleriyle karşılaştırılması Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Çay ve atıklarının fenolik içeriklerinin karşılaştırılması

| Fenolik İçerik | Sıralama |
|------------------------------|------------------------------|
| Epigallokateşin gallat(EGKG) | YÇ > YÇYA > YÇGA > SÇ > SÇLA |
| Epigallo kateşin (EGK) | YÇ > YÇYA > YÇGA > SÇ > SÇLA |
| Kateşin (K) | YÇGA > YÇ > YÇYA > SÇ > SÇLA |
| Kafein | SÇ > SÇLA > YÇYA > YÇ > YÇGA |
| Gallik asit | SÇ > SÇLA > YÇGA > YÇYA > YÇ |
| Toplam fenolik madde | YÇ > YÇYA > YÇGA > SÇ > SÇLA |

3.4. Yeşil ve Siyah Çay ile Atıklarının Farklı Konsantrasyonlarında DNA Hasarı Üzerine Etkileri

Tüm çalışmalar için hücre canlılığını azaltmadan, maksimum oksidatif DNA hasarı oluşturan H₂O₂ konsantrasyonu 200 µM olarak belirlendi.

Farklı konsantrasyonlardaki özütler kullanılarak, in vitro periferik kan lenfositlerinde oluşan comet sayılarından yola çıkılarak her grup için hesaplanan Comet skoru değerleri DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edildi. Bu değerler üç farklı çalışma yapılarak karşılaştırıldı.

Tablo 14. Standart, yeşil ve siyah çay ile bunların atıklarının farklı konsantrasyonlarına ait Comet skorları

| SKOR | STD | YÇ | YÇYA | YÇGA | SÇ | SÇLA |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| NK | 56 ± 4 ^a | 56 ± 4 ^a | 56 ± 4 ^a | 56 ± 4 ^a | 56 ± 4 ^a | 56 ± 4 ^a |
| 1 µM | 98 ± 7 ^a | 106 ± 15 ^a | 117 ± 8 ^b | 132 ± 9 ^b | 124 ± 24 ^b | 175 ± 2 ^c |
| 10 µM | 125 ± 15 ^a | 141 ± 16 ^b | 127 ± 12 ^b | 139 ± 15 ^b | 147 ± 20 ^c | 188 ± 5 ^c |
| 25 µM | 155 ± 5 ^a | 162 ± 36 ^b | 149 ± 5 ^b | 185 ± 16 ^b | 171 ± 14 ^b | 177 ± 9 ^c |
| 50 µM | 201 ± 15 ^a | 222 ± 32 ^b | 236 ± 7 ^b | 234 ± 17 ^b | 215 ± 19 ^b | 226 ± 12 ^b |
| PK | 235 ± 6 ^a | 235 ± 6 ^a | 235 ± 6 ^a | 235 ± 6 ^a | 235 ± 6 ^a | 235 ± 6 ^a |

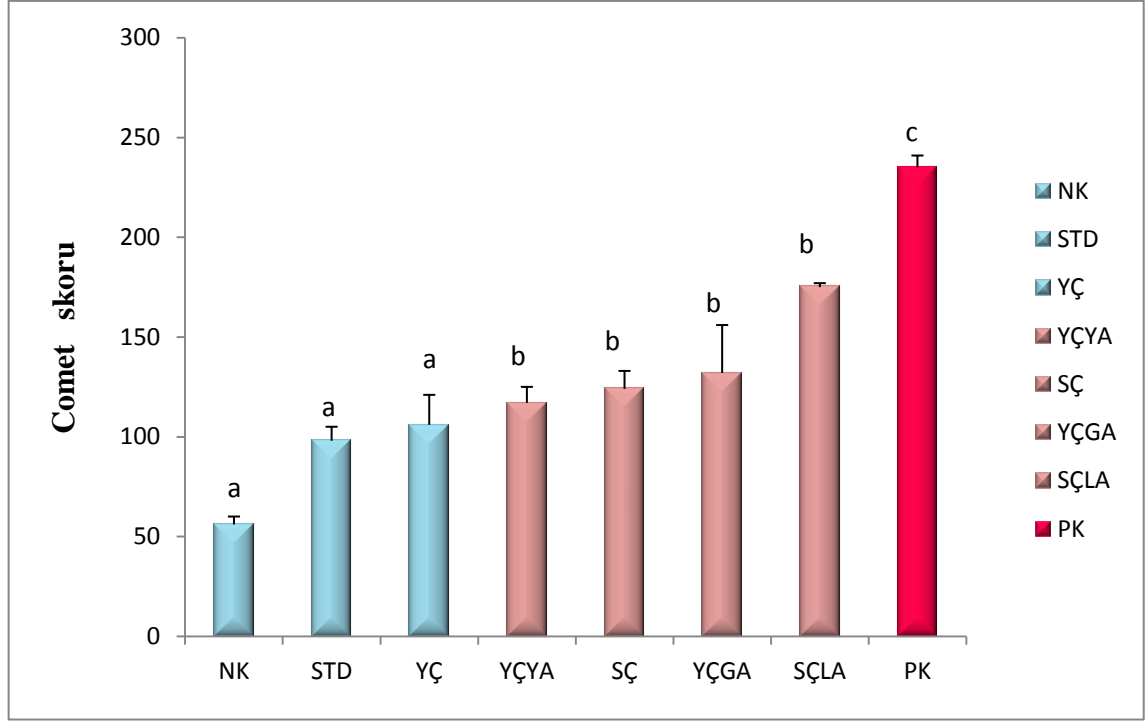
^{a,b,c}:Numuneler arasındaki farklılığın p < 0,05 düzeyinde olduğunu gösterir.

NK: (Negatif kontrol) H₂O₂ ve özütle muamele edilmemiş grup

PK: (Pozitif kontrol) H₂O₂ ile muamele edilmiş hücre grubu

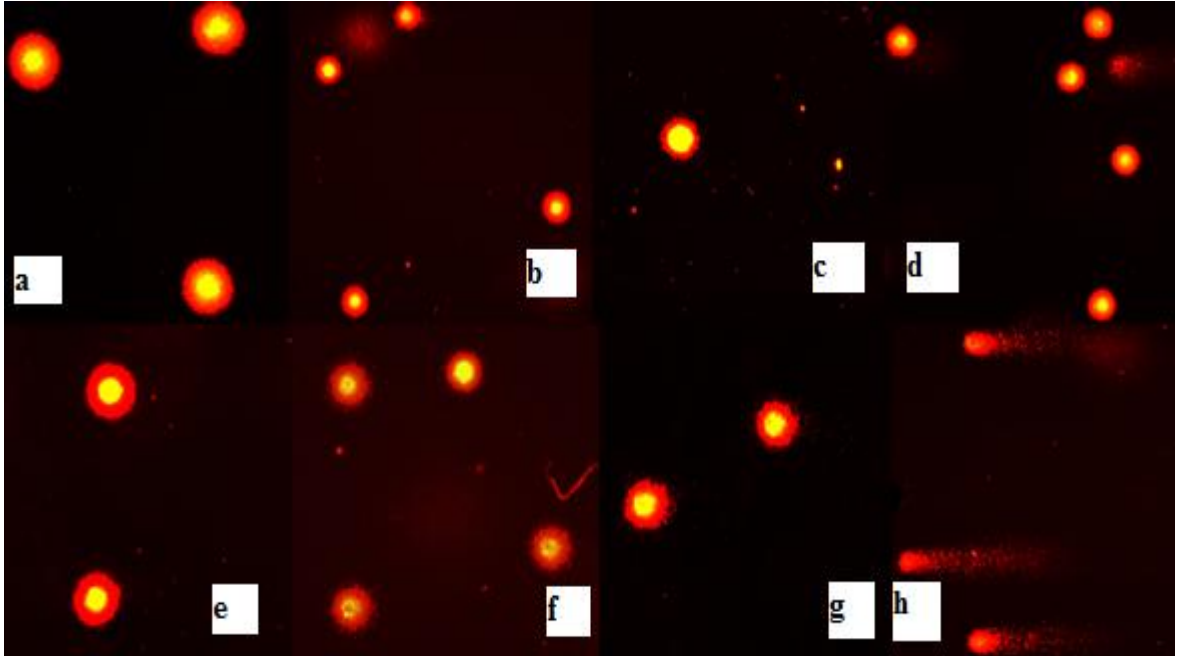
3.4.1. Lenfositlerde H₂O₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 1 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi

1 µM STD, YÇ numunelerinin atıklarına oranla daha etkili olduğu fakat kendi aralarında anlamlı bir fark olmayacak kadar skorlarının birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Bu durum YÇ'nin bahsedilen konsantrasyonda en az standart kadar etkili bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra yeşil çay yaprak atığı (YÇYA), yeşil çay gövde atığı (YÇGA) ve SÇ arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, 1 µM'da YÇ'a göre daha düşük antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. SÇLA'nın ise tüm özütler arasında en yüksek Comet skoruna sahip olması DNA hasarına karşı en düşük koruyucu etkiyi sağladığını göstermektedir.



a,b,c: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,05$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 20. 1 μM konsantrasyonda farklı özütleri ait Comet skorları

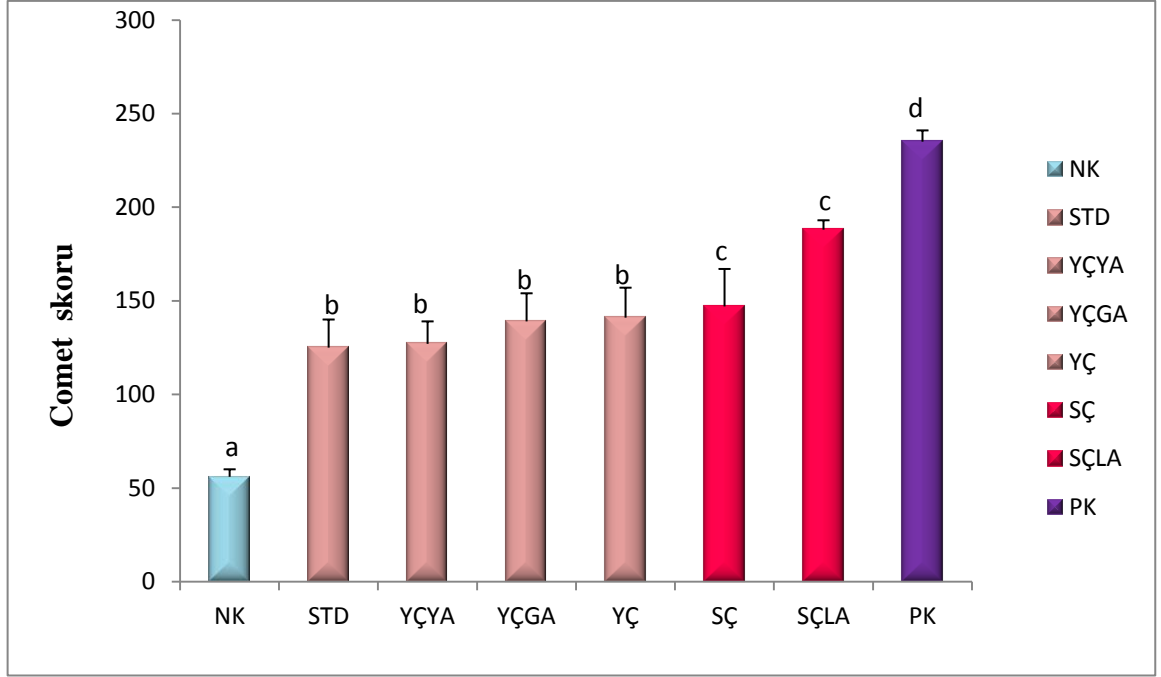


Şekil 21. a) NK'e ait Comet görüntüsü, b) 1 μM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 1 μM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 1 μM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 1 μM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 1 μM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 1 μM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK'e ait Comet görüntüsü

En düşük comet skoruna sahip ve NK'e en yakın olan özüt, DNA hasarını önleme kapasitesi en yüksek numunedir. Şekil 20'de görülen Comet skor değerlerine göre numunelerin anti-DNA hasar aktiviteleri $NK = STD = YÇ > YÇYA = SÇ = YÇGA = SÇLA > PK$ şeklinde sıralanabilir.

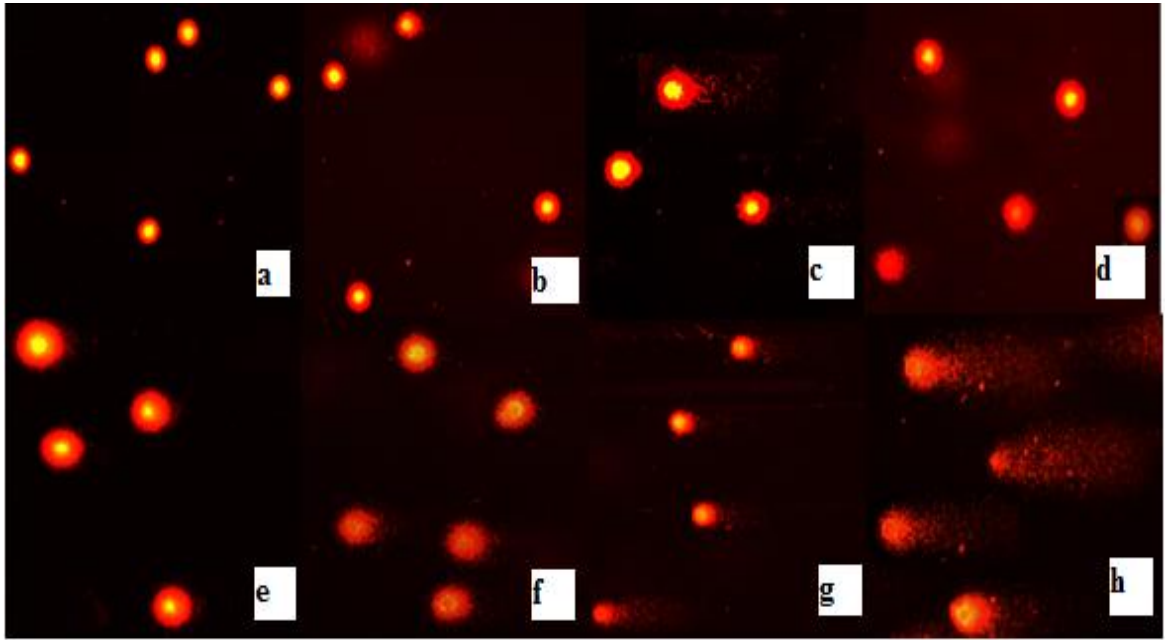
3.4.2. Lenfositlerde H₂O₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 10 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi

10 µM konsantrasyonda, NK ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenirken; STD, YÇYA, YÇGA ve YÇ'in birbirine istatistiksel olarak fark teşkil etmeyecek kadar yakın olup SÇ ve SÇLA'dan daha etkili koruyucu aktiviteye sahip olduğu Şekil 22'de görüldüğü gibidir.



a,b,c,d: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,05$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 22. 10 μM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları

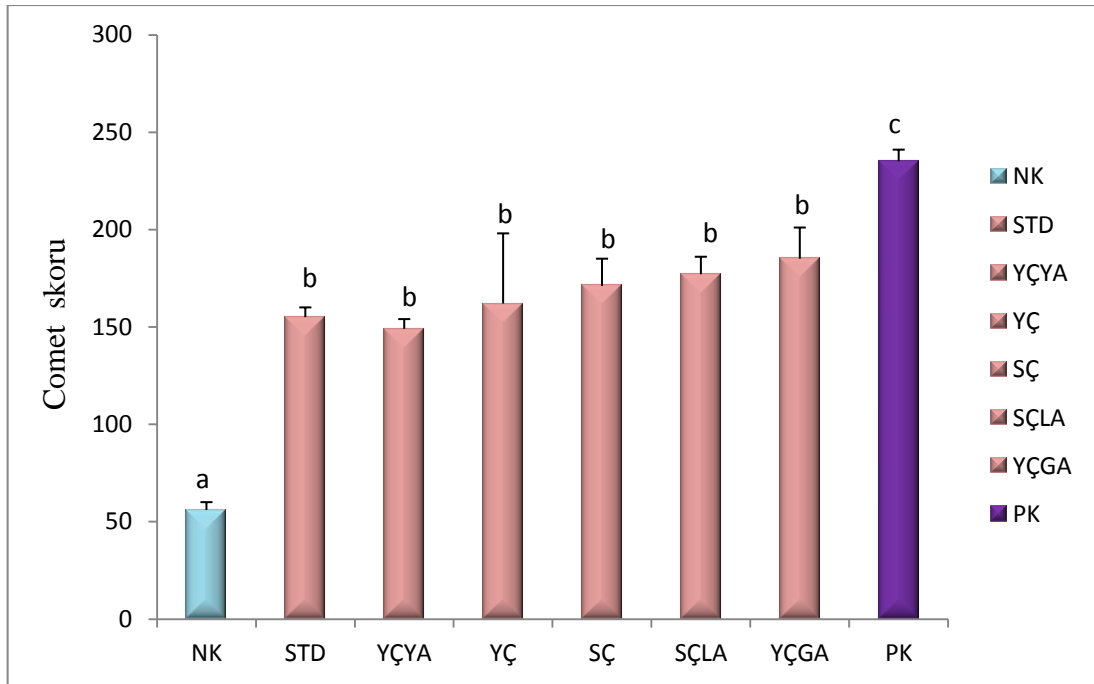


Şekil 23.a) NK' e ait Comet görüntüsü, b) 10 μM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 10 μM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 10 μM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 10 μM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 10 μM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 10 μM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK' e ait Comet görüntüsü

Şekil 22’de görülen Comet skor değerlerine göre numunelerin anti-DNA hasar aktiviteyi NK>STD = YÇYA = YÇGA = YÇ > SÇ = SÇLA > PK şeklinde sıralanmaktadır.

3.4.3. Lenfositlerde H₂O₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 25 µM’lık Çay Örneklerinin Etkisi

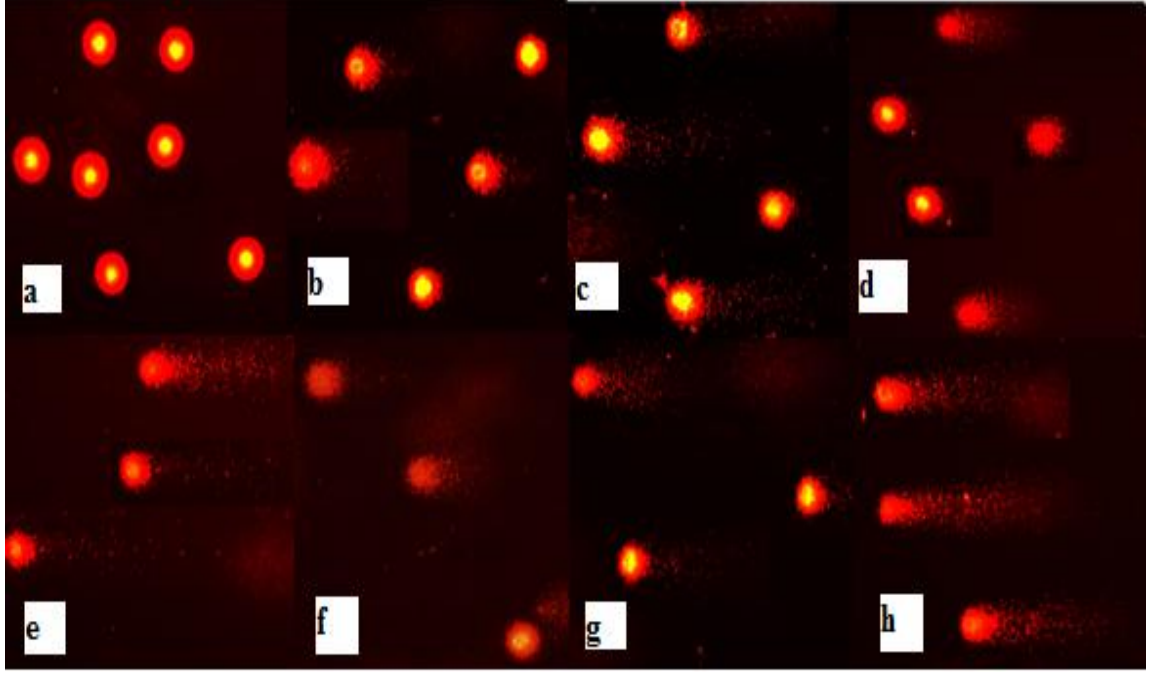
25 µM konsantrasyonda, tüm özütler istatistiksel olarak NK ve PK’e göre anlamlı bir farklılık gösterirken; STD, YÇYA, YÇGA, YÇ, SÇ ve SÇLA’nın H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin kendi aralarında anlamlı bir fark olmayacak kadar yakın olduğu belirlendi. 25 µM’da tüm numunelerin 200 µM H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarını azalttığı ve H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarına ekstra bir katkısının olmadığı gözlemlendi.



^{a,b,c}Numuneler arasındaki farklılığın p < 0,05 düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 24. 25 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları

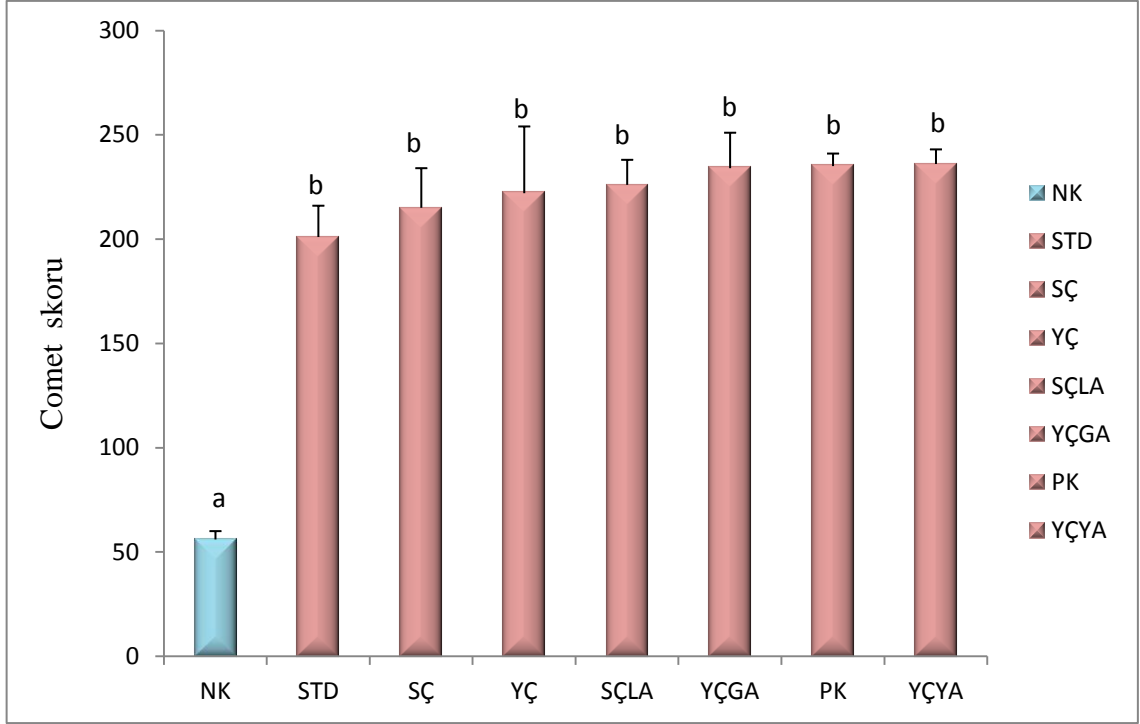
25 µM’da farklı çay özütlerinin H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkileri, NK > YÇYA ≥ STD ≥ YÇ ≥ SÇ ≥ SÇLA ≥ YÇGA > PK şeklinde sıralanmaktadır.



Şekil 25. a) NK' e ait Comet görüntüsü, b) 25 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 25 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d)25 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 25 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 25 µM SÇ özütüne ait Comet görüntüsü, g) 25 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK' e ait Comet görüntüsü

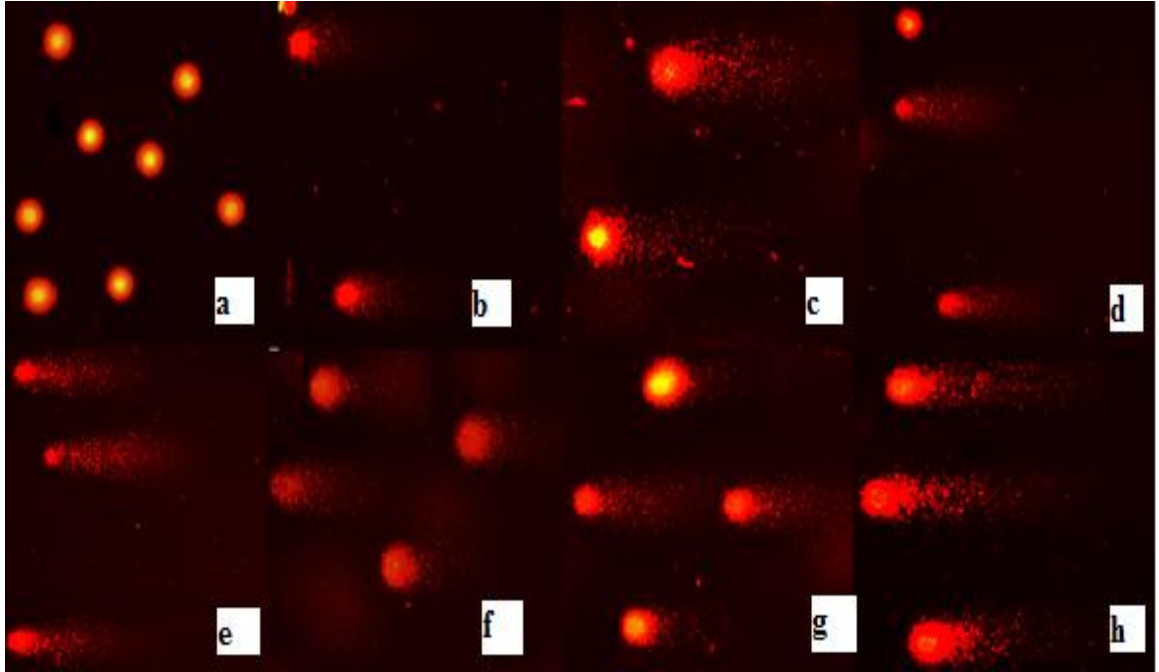
3.4.4. Lenfositlerde H₂O₂ ile İndüklenen DNA Hasarı Üzerine 50 µM'lık Çay Örneklerinin Etkisi

50 µM'da özütlere ait skorlar ile NK arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi. Farklı özüt değerlerinin birbirine istatistiksel olarak fark teşkil etmeyecek kadar yakın olduğu ayrıca özütlerin bu konsantrasyonda DNA hasarında indükleyici rol oynadığı gözlemlendi.



a,b: Numuneler arasındaki farklılığın $p < 0,05$ düzeyinde olduğunu gösterir.

Şekil 26. 50 µM konsantrasyonda farklı özütlere ait Comet skorları

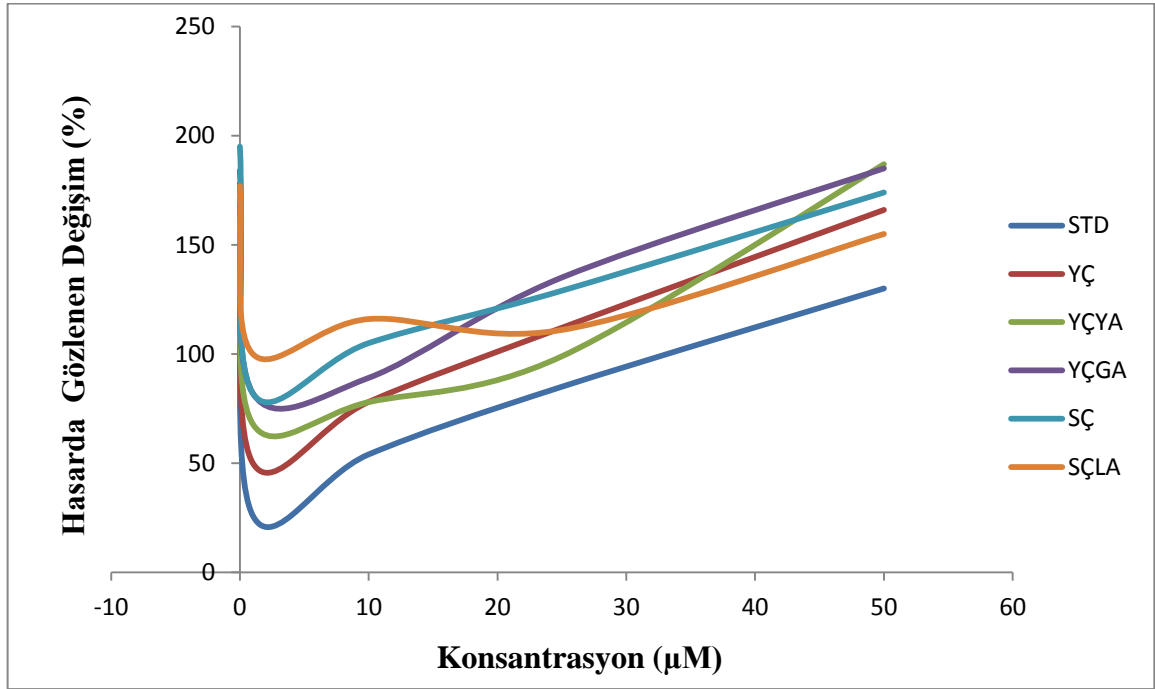


Şekil 27. a) NK' e ait Comet görüntüsü, b) 25 µM Standarta ait Comet görüntüsü, c) 25 µM YÇ özütüne ait Comet görüntüsü, d) 25 µM YÇYA özütüne ait Comet görüntüsü, e) 25 µM YÇGA özütüne ait Comet görüntüsü, f) 25 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, g) 25 µM SÇLA özütüne ait Comet görüntüsü, h) PK' e ait Comet görüntüsü

Şekil 26’da görülen Comet skor değerlerine göre numunelerin anti-DNA hasar aktiviteleri $NK > STD \geq SÇ \geq YÇ \geq SÇLA \geq YÇGA \geq YÇYA \geq PK$ şeklinde sıralanabilir.

3.5. Çay Özütlerine Ait Anti-DNA Hasar Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Numunelerin DNA oksidasyonu sonucu oluşan hasar miktarını inhibe etme kapasitesi incelenmiş ve sonuçlar IC_{50} kateşin eşdeğer olarak ifade edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (1-10-25-50 μM) özütler kullanılarak IC_{50} değerleri bulunmuştur. DNA oksidasyon inhibisyonu hesaplanırken oksidasyon birimi AU (rastgele seçilmiş hücrelerin Comet skoru) olarak alındı ve farklı özüt konsantrasyonlarına karşılık gelen bu değerlerin grafiği oluşturularak IC_{50} değerleri hesaplandı. Numunelerin 8-OHdG oluşum inhibisyonunda etkili olduğu IC_{50} değerleri Tablo 15’de verilmiştir. Buna göre en yüksek anti-DNA oksidasyon (en düşük IC_{50} değeri) aktivitesi yeşil çayda iken en düşük siyah çay lif atığında görülmüştür.



Şekil 28. Yeşil ve siyah çay ile atıklarının farklı konsantrasyonlarına ait Comet skor kinetiği

DPPH radikali temizleme aktivitesinde olduğu gibi minimum IC_{50} değerine sahip olan numune anti-DNA hasar aktivitesi en yüksek olan numunedir. IC_{50} değerlerine bakıldığında inhibe kapasitesi $STD > YÇ \geq SÇ \geq YÇYA \geq YÇGA \geq SÇLA$ şeklinde sıralanmıştır.

Çalışılan bütün parametreler ve sonuçları Tablo 15’de özetlenerek verilmiştir.

Tablo 15. Çay ve Atıklarında çalışılan parametrelerin genel gösterimi.

| NUMUNELER | TP (mg eşdeğer kateşin/g kuru ağırlık) (n=15) | DPPH Temizleme Aktivitesi (μM eşdeğer kateşin) (n=15) | Lenfosit Anti-DNA Hasar Aktivitesi IC_{50} μM eşdeğer kateşin) (n= 19) |
|---------------------------------------|---|---|---|
| STANDART (X\pmSD) | - | 8.4 \pm 0.8 ^a | 0,39 \pm 0,02 ^a |
| YÇ (X\pmSD) | 68.5 \pm 3.9 ^c | 10.1 \pm 1.3 ^b | 0,49 \pm 0,06 ^a |
| YÇYA (X\pmSD) | 59.2 \pm 4.6 ^a | 12 \pm 1.7 ^c | 0,69 \pm 0,07 ^a |
| YÇGA (X\pmSD) | 33.6 \pm 2.2 ^b | 14.3 \pm 1.9 ^d | 0,71 \pm 0,11 ^a |
| SÇ (X\pmSD) | 33.7 \pm 6.2 ^d | 13.9 \pm 1.6 ^d | 0,67 \pm 0,1 ^a |
| SÇLA (X\pmSD) | 17.9 \pm 2.6 ^e | 16 \pm 1.8 ^e | 0,76 \pm 0,07 ^a |

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

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Dünya’da tüketimi sudan sonra ikinci sırayı alan içecek çaydır. Çayın, yapısında bulundurduğu flavonoidlerden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresle iç içe bulunan canlıların sağlıklı bir şekilde hayatlarını sürdürebilmeleri çay ve bunun gibi bitkisel kaynaklı antioksidan bileşiklerin tüketimi ile mümkün olabilmektedir. Serbest radikallerin sebep olduğu dejeneratif hastalıklardan korunmak amacıyla antioksidan muhtevası olan çeşitli bitkisel ve sentetik bileşiklerin tüketimine ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Türkiye’de halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan ve biyolojik aktivitesi bilinmeyen pek çok bitki bulunmaktadır. Bu doğal ürünlerden en yaygın olarak kullanılanlar arasında çay, üzüm, elma ve nar gibi bitkisel kaynaklı yiyecekler gelmektedir. Bu ürünler serbest radikal toplayıcı özelliğine sahip antioksidan bileşikler ihtiva ederler. Ayrıca günümüzde kullanılan pek çok ilaç etken maddesi kaynağını bitkilerden almıştır. Özellikle fenolik yapıda bitkisel kaynaklı etken maddelerin ve bitkisel ürünlerin bazı hastalıkların tedavi ve önlenmesinde yararlı oldukları bilinmekle birlikte bu bileşiklerin toksik, mutajenik ve hatta karsinojenik özellikler de gösterebileceği unutulmamalıdır. Bitkisel ürünlerin insan sağlığı üzerine muhtemel olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar son derece sınırlıdır. İn vitro çalışmalarda bazı bitkisel kaynaklı bileşiklerin, mutajen oldukları ve DNA hasarını indükledikleri bildirilmişse de tersini belirten bulgulara da rastlanmaktadır.

Bu doğal ürünlerden biri olan çayın işlenmesi sırasında işlenen ürünün yaklaşık % 5’i atık olarak ortaya çıkmakta çay fabrikalarının, ortaya çıkan bu atıkları çevreye zarar vermeden imha etme konusunda zaman zaman sıkıntı yaşadığı bilinmektedir. Bu atıklar genellikle buhar kazanlarında yakılmaktadır. Çay atıklarını en iyi değerlendiren ülkelerin başında Hindistan gelmektedir. Hindistan’da çay atıklarından; Kompost üretilerek (kompost üretiminde at gübresi kullanılmakta), pellet haline dönüştürülmesi ile yakıt olarak, torfla karıştırılıp gübre olarak ve kafein üretilerek değerlendirilmektedir. Ülkemizde de çay atıklarının; hayvan yemi üretimi, yonga levha üretimi, kafein eldesi, gübre üretimi, odun plastik kompozitlerinde değerlendirilmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır (Anderson vd., 1994).

Yapılan literatür taramaları ve değerlendirmeleri sonucunda yeşil ve siyah çayın iyi birer antioksidan olduğu belirtilmiştir (Zeyuan vd., 1998; Rietveld ve Wiseman, 2012; Zaveri, 2006; Han vd., 2011; Langley ve Evans, 2000; Chen, 2009). Buna karşın çay üretimi esnasında açığa çıkan çay atıklarının kendisini oluşturan çay ürünü kadar antioksidan potansiyele sahip olup olmadığı ve bu özütlerin hücresel ortamdaki etkilerinin yeterince incelenmediği görülmüştür. Bu da çay atıklarının sağlık alanında ekonomik olarak katma değer oluşturacak bir çalışmaya konu olmadığını göstermektedir. Buradan yola çıkarak çay atıklarının in vitro incelenmesinin atıkların değerlendirilmesinde farklı bir yön kazandırabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada; yeşil ve siyah çay ile bunların atıklarına ait özütlerin polifenol içeriği, radikal temizleme aktivitesi ve hasar oluşturulmuş DNA üzerine olası etkiler incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar için ilk olarak çay ve atıkları kurutulup öğütüldükten sonra özütleme işlemi yapıldı. Özütleme işlemi yapılırken uygun çözücü seçimi için yapılan literatür taramalarında metanol ve etil asetat çözücülerinin çay polifenolleri açısından en uygun çözücüler olabileceği kanısına varıldı. Beevi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan su, metanol, etil asetat, aseton, kloroform, hekzan gibi çözücüler arasında en verimli olan çözücülerin metanol ve etil asetat olduğu görülmüştür (Beevi vd., 2010; Cheng vd., 2003). Henning ve arkadaşlarının yaptığı çay ve özütlerinin biyoyararlılığının incelenmesinde yine etil asetat ve metanolün özütleme işlemi için ideal çözücüler olduğu görülmüştür (Henning vd., 2004). Özütleme işlemi yapıldıktan sonra numunelerin polifenol muhtevaları spektrofotometrik olarak kateşin eşdeğerli cinsinden incelenmesiyle yeşil çayın siyah çaya oranla daha fazla fenolik madde ihtiva ettiği ve hem yeşil hem de siyah çayın kendi atıklarından daha fazla etken madde içerdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar Henning ve arkadaşlarının (Henning vd., 2004) çay ve atıklarının fenolik kompozisyonunun araştırılmasında bulduğu sonuçlarla uyumludur. Ayrıca benzer çalışmalarda farklı çay tiplerinin fenolik madde bileşimlerinin incelenmesinde bulunan sonuçlar, mevcut çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Zeyuan, 1998; Henning vd., 2004). Yapılan tüm çalışmalarda yeşil çayın polifenol miktarının siyah çaydan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, siyah çayın işlenmesi esnasında yapısında bulunan flavanollerden theaflavin ve thearubigin gibi sekonder polifenollerin oluşmasıyla flavanol miktarının azalması şeklinde açıklanmaktadır. Bu sebeple çayın işleme yöntemine bağlı olarak fenolik madde kompozisyonu da değişmektedir (Vinson vd., 2004).

Çay ve çayın farklı dokularına ait atıklarının radikal temizleme etkisini belirlemek için DPPH radikali temizleme testi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar yeşil çay özütünün en düşük IC₅₀ değerine yani en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca yeşil çay yaprak atığı özütünün radikal temizleme aktivitesinin siyah çay özütünden daha yüksek olması YÇYA'nın piyasada en fazla tüketilen ve ticari değere sahip siyah çaydan daha zengin biyoyararlılığa sahip olması ilgi çekicidir. Yine siyah çay özütünün de diğer atık özütlerinden daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar Vinson ve arkadaşlarının, Benzie ve Strain'in yaptığı benzer çalışmalara göre uyumludur (Vinson vd., 2004; Benzie ve Szeto, 1999). Antioksidanların serbest radikallere karşı etki mekanizmaları birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bu mekanizmaların; metal iyonları ile şelat oluşturarak hasar yapıcı radikal oluşumunun engellenmesi, reaktif oksijen türlerinin süpürülmesi, prooksidan enzimlerin inhibisyonu, antioksidan enzimlerin indüklenmesi şeklinde olduğu ileri sürülmektedir.

Bitkisel özütlerin hücresel sistem üzerinde oluşturduğu koruyucu etkilerin karşılaştırılmasında tek bir özüt konsantrasyonundan ziyade farklı konsantrasyonlarla elde edilen reaksiyon kinetiğinin daha hassas sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Cheng vd., 2003). Çay örneklerinin biyoyararlılığının karşılaştırıldığı mevcut çalışmada; H₂O₂ ile indüklenen DNA oksidasyonu deneyinde, reaksiyon kinetiğinin göstergesi olarak Comet skorunu yarıya düşüren bitki özüt konsantrasyonu'na karşılık gelen IC₅₀ değeri belirlendi ve bu şekilde karşılaştırmalar yapıldı. Buna göre elde edilen sonuçlar yeşil çay, siyah çay ve atıklarının aynı derecede hasar önleme kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar diğer parametrelerde edilen verilerde yeşil çayın siyah çaya olan üstünlüğü bakımından çelişkili görünmektedir. Ancak daha önce yeşil ve siyah çay üzerinde yapılan araştırmalar bu durumu açıklayıcı niteliktedir.

Mevcut çalışmada yeşil ve siyah çay ile bunların atıklarının lenfositlerde olası DNA hasarına karşı etkisi incelendi. Hücreler ilk olarak özütler ile muamele edildi, özütlere ait ortamın uzaklaştırılması ve hücrelerin PBS ile yıkanmasının ardından hücrelere genotoksik ajan H₂O₂ ilave edildi. Özütlerin, dolayısıyla polifenolik bileşiklerin hücrelerle preinkübasyonu hücreleri korumada ve oksidatif DNA hasarını önlemede etkili olmuştur. Bu durum; fenolik bileşiklerin hücre zarı yapışabileceğini ve bu bileşiklerin hücre yüzeyi üzerinde kalarak da benzer şekilde etki edebileceğini göstermektedir. Bu bilgiler, Yoshida ve arkadaşlarının theaflavinlerin hücre zar yapısına benzeyen LDL partikülleriyle ön

muamelesi sonrası elde edilen antioksidan aktivite bulgularıyla uyumludur (Feng vd., 2002).

Siyah çaya nispeten yeşil çay ve atıklarında daha fazla miktarda bulunan EGKG'nin oksidan DNA hasarına karşı koruyuculuğunun incelendiği çalışmalarda EGKG başta olmak üzere kateşin ve gallil türevlerinin düşük konsantrasyonlarda hasarı önledikleri ancak yüksek konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterdikleri belirtilmektedir. Polifenollerin antioksidan/proksidan aktiviteleri geçiş metallerini şelatlama potansiyeli, çözünürlükleri, doku ve hücrelerdeki kararlılığı ile ilişkilidir (Feng vd., 2002). Bu çalışmada 1 ve 10 μM konsantrasyondaki yeşil çay, siyah çay ve atıklarının insan lenfositlerinde H_2O_2 ile uyarılmış DNA hasar göstergesi olan Comet skorunu etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. 25 μM çay özütlerinde önemli derecede anti-DNA hasar aktivitesi gözlenmezken, 50 μM konsantrasyondaki özütlerin DNA hasarını inhibe etmeye yönelik bir etkisi olmadığı sonucuna varıldı. Birçok çalışmanın aksine 50 μM 'ın pozitif kontrole yakın Comet skorlarına sahip olması ve 1 μM 'ın maksimum hasar önleyici etki göstermesi Gleis ve Pool-Zobel'in yaptıkları çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Gleis ve Pool-Zobel düşük konsantrasyonlardaki EGKG'nin (2-20-40-60-80 ve 100 μM) insan periferik lenfosit hücrelerine yönelik antigenotoksik etkilerini incelemiş; maksimum DNA hasarının 60 μM 'da oluştuğunu, 2 μM EGKG'nin ise genotoksik ajan bleomycine karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir (Gleis ve Pool-Zobel, 2006). Mevcut çalışmada maksimum hasar aktivitesinin gözlemlendiği ve diğer çalışmalarla da desteklendiği 1 μM özüt konsantrasyonundaki sonuçlar, radikal temizleme aktivitesindeki sonuçlar ile birebir uyum göstermektedir. Yeşil ve siyah çay için elde edilen bu sonuçlar yapılmış birçok çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Johnson ve Loo 10 μM EGKG'nin Jurkat T-lenfositlerinde H_2O_2 ile uyarılmış DNA hasarını inhibe ettiğini ancak 100 μM EGKG'nin tek başına hücrel DNA hasarına yol açtığını bildirmişlerdir (Johnson ve Loo, 2000). Başka bir çalışmada 200 μM EGKG'nin insan lenfosit DNA'sında H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarını artırdığı, H_2O_2 ve peroksinitrit üreticisi 3-morfolinosidonimin (SIN-1)'in Jurkat T-lenfositlerinde indüklenen DNA hasarını 10 μM EGKG tarafından inhibe edildiği, 100 μM EGKG ile hasarın arttığı ve yüksek konsantrasyonlarda EGKG'nin oksidan DNA hasarını indüklediği belirtilmiştir (Sutherland, 2006). Ayrıca Yen ve arkadaşları da karaciğer hücrelerinde yeşil çay, oolong çay ile siyah çay özütleri ve beş farklı çay polifenolünün (EK, EKG, EGK, EGKG, THF) benzo[a]pyren ile uyarılmış DNA hasarına etkilerini incelemiş ve hasarın yeşil çay ile oolong çay özütünün 10 μM 'lık konsantrasyonunda,

siyah çay özütünün ise 25 µM'lık konsantrasyonlardahasarı önemli oranda azaltılabildiğini bulmuşlardır (Yen vd., 2004). EK ve EKG DNA hasar oluşumuna yol açmazken EGK, EGKG ve THF'lerin 100 µM'da DNA hasarına yol açtığı gözlemlenmiştir. EK ve EKG 1-100 µM aralığında DNA hasarını önlemiş, EGK, EGKG ve THF'lerin ise ancak düşük konsantrasyonlarda(1-50 µM) koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar EGK, EGKG ve THF'in yüksek konsantrasyonlarında süperoksit üretmesinden dolayı hücrelerdeki DNA hasar oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Yen ve arkadaşlarının ulaştığı bu veriler mevcut çalışmada SÇ ve atığında yüksek oranda bulunan TF'lerin ve yeşil çay ile atıklarında fazla miktarda bulunan EGKG'nin düşük konsantrasyonlarda etkili olmasının, 50 µM'a yaklaşıldığında ise bu etkinin TF'lerden dolayı siyah çayda, EGKG'dan dolayı da yeşil çay ve atıklarında DNA hasarı inhibisyon kapasitesindeki azalmayı açıklayıcı niteliktedir. Yeşil çayda en fazla miktarda bulunan EGKG'nin düşük dozları sağlıklı insan lenfositlerinde mutajenler ile indüklenen DNA sarmal kırıklarını önlerken, yüksek dozlarda kırıkları artırdığını bildirilmiştir (Kanadzu vd., 2005). Ancak başka bir çalışmada EGKG ile preinkübe edilen Çin hamster V-79 hücrelerinin H₂O₂ genotoksik ajanı tarafından oluşturulan hasarı azalttığını bulmuşlardır. Farklı dozlarda (25-50-75-100 µM)EGKG'nin Comet kuyruk uzunluğunu azalttığı ve bu etkinin 100 µM'da maksimum olduğunu ileri sürmüşler, EGKG'nin normal hücreleri genotoksik ajanlara karşı korumanın yanı sıra apoptoz indüksiyonu yoluyla kanser hücrelerini ortadan kaldırdığını ifade etmişlerdir (Roy vd., 2003).

Feng ve arkadaşları siyah çayda bol miktarda bulunan theaflavinlerin oksidatif stres ve DNA hasarına yönelik etkilerini incelemiş; H₂O₂ ve tert butil hidroperoksitin (tBuOOH) neden olduğu oksidatif DNA hasarına TF'lerin etkisini 8-OHdG miktar ölçümü ve Comet yöntemi ile gözlemlenmişlerdir. Rat karaciğer epitel hücreleri RL-34 hattının kullanıldığı bu çalışmada TF'nin bu hasar ajanlarına karşı inhibitör etkisi belirlenmiştir. 50 µM TF'nin tBuOOH'in neden olduğu hasar göstergesi olan kuyruk uzunluğunu büyük ölçüde azalttığını gözlemişlerdir (Feng vd., 2002).

Çayın koruyucu etkilerine yönelik in vivo çalışmalar da mevcuttur. Rietveld ve Wiseman sigara içen ve içmeyen kişilerin lökositlerinde oksidatif DNA hasarına karşı siyah çay ve yeşil çay tüketiminin potansiyel antioksidan etkilerini incelemişler ve günde 1-6 bardak çay, özellikle siyah çay tüketiminin oksidatif DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir (Rietveld ve Wiseman, 2012). Buna benzer bir çalışmayı Klaunig yapmış ve günde 2.4 g siyah çay tüketiminin sigara içen ve içmeyenlerin lökositlerinde DNA zincir

kırıklarını önemli oranda azalttığını gözlemlemiştir (Klaunig vd., 2001). Oksidatif DNA hasarı biyogöstergesi olan 8-OHdG'nin dokularda veya idrarda HPLC-ECD ile ölçülmesi ile mevcut oksidatif stresin belirlendiği çalışmada Hakim ve arkadaşları 4 ay boyunca düzenli olarak kafeinden arındırılmış 4 bardak yeşil ve siyah çay tüketiminin sigara kullanan bireylerde idrar 8-OHdG miktarlarına yönelik etkilerini incelemiştir. Bu araştırmanın sonucunda yeşil çay tüketen bireylerde 8-OHdG miktarının % 31 azaldığını ancak siyah çayın hiçbir değişikliğe yol açmadığı sonucuna varmışlardır (Hakim vd., 2003). Tüketime bağlı olarak çayın DNA hasarını koruyucu etkisinin ancak düşük miktarlarda, çalışmalarda belirtilen değerlerde etkili olduğu görülmektedir.

Çay polifenollerini antioksidan olarak bilinmesine rağmen, yapılan son çalışmalarda çay polifenollerinin hücre kültürü ortamında H₂O₂ üretebildiği bildirilmiştir. Siyah çayda yüksek oranda bulunan theaflavinlerin de H₂O₂ ürettiği ve çeşitli hücrelerin apoptozisini indüklediği bilinmektedir (Roy vd., 2003). Ayrıca yeşil çayda EGKG başta olmak üzere kateşinlerin yüksek konsantrasyonlarda hasarı önlemekten ziyade hasarı indüklediği bildirilmiştir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak bu çalışmada H₂O₂ tarafından lenfositlerde oluşturulan oksidatif DNA hasarına yeşil çay ve siyah çay ile atıklarının olası koruyucu etkileri 1-50 µM konsantrasyon aralığında incelenmiştir. Özütlelerin 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda oksidatif DNA hasarını azalttığı ancak ortadan kaldırmadığı bulunmuştur. 25 µM konsantrasyona sahip özütleler DNA hasarını önemli derecede azaltmamasına rağmen prooksidan etki de göstermemiştir. 50 µM'da ise DNA sarmal kırıklarına karşı koruyucu bir etki gözlenmemiştir.

Serbest radikal temizleme ve Anti-DNA hasar aktivitesine paralel şekilde yeşil çay ve onun yaprak atığına ait antioksidan etkinin piyasada daha çok tüketim yoğunluğuna sahip olan siyah çay kadar hatta çalışılan bazı konsantrasyonlarda daha fazla koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çay atıklarının özellikle yeşil çay atığının hücresel sistemlerde benzer biyoyararlı etkiye yol açtığından işlenerek tüketilen ürün haline getirilmesi, bölgemizde atıl halde duran bu atıkların ekonomik değer haline getirebileceğini göstermektedir. Böylelikle, sınırlı ekonomik girdiye sahip mevcut yöre için önemli bir ekonomik değer olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmaya benzer araştırma olmamasının mevcut bulguların önemini artırdığı söylenebilir.

Çalışma sonucunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir:

1. Toplam polifenol miktarının numuneler arası değerlendirmesi sonucunda en fazla polifenol miktarının yeşil çayda, en az ise siyah çay lif atığında olduğu görülmüştür.
2. Yeşil çay ve atıklarının yüksek radikal toplama aktivitesine sahip olduğu ancak siyah çay ve siyah çay lif atığının daha az radikal temizleme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir.
3. Çalışmada kullanılan lenfositlerde hücrelerin canlılık oranını düşürmeden maksimum DNA hasarı oluşturacak H_2O_2 konsantrasyonu $200 \mu M$, bu konsantrasyondaki H_2O_2 ile uygun muamele süresi 5 dakika olarak bulunmuştur.
4. Çalışılan lenfosit hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı DNA hasarını engelleyen konsantrasyon miktarları $1 \mu M$ ve $10 \mu M$ olarak bulunmuştur. $1 \mu M$ 'da yeşil çay en etkili aktiviteye sahip iken yeşil çay atıkları, siyah çay ve siyah çay lif atığı benzer etki göstermiş tüm numuneler pozitif kontrole göre anlamlı bir fark ($p < 0.05$) oluşturmuştur.
5. $10 \mu M$ konsantrasyonda yeşil çay ve atıkları benzer etki göstermiş, siyah çay ve atığına göre anlamlı bir fark oluşturmuştur ($p < 0.05$).
6. $25 \mu M$ 'da tüm numuneler benzer etki göstermiş ve pozitif kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Konsantrasyonun artması ile birlikte özütler dikkate değer antioksidan etki gösterememiş ve hasardaki azalma oranı düşmüştür.
7. $50 \mu M$ konsantrasyonda özütler arasında negatif kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmüş ancak pozitif kontrole göre bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmanın en yüksek konsantrasyonu olan $50 \mu M$ hiçbir koruyucu etki göstermemiş ancak ilave oksidan bir etkiyle hasarıda artırmamıştır.
8. Özütlere ait IC_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülemezken, en düşük IC_{50} değeri YÇ ve SÇ'da gözlemlenirken antioksidan etkinin en az olduğu dolayısıyla IC_{50} değerinin en yüksek olduğu özütün SÇLA olduğu tespit edilmiştir. Bu verilerin Anti-DNA hasar kinetiğinin incelenmesi Comet skor çalışmaları ve DPPH radikal temizleme aktivitesi ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

5. ÖNERİLER

1. Deneysel hayvan çalışmaları ile çay ve atıklarının aynı etkileri *in vivo* koşullarda incelenip mevcut bulguların doğruluğu daha sağlıklı şekilde tartışılabilir.
2. Özütlerdeki polifenolik bileşiklerin ne kadarının hücre tarafından etkili bir şekilde absorbe edilebildiği *in vivo* koşullarda araştırılabilir.
3. Anti-DNA hasar aktivitesinin maksimum olacağı özüt konsantrasyonunu belirlemek amacıyla daha geniş bir konsantrasyon skalasında çalışmalar artırılabilir.
4. Özütlerin hasarı azaltmadığı konsantrasyonlarda meydana gelen etkileşimi aydınlatılmak amacıyla özütlerin genotoksik ajana maruz bırakılmaksızın tek başına DNA'ya etkileri incelenebilir.
5. Çalışma HPLC/LC/MS-GC/MS kullanılarak DNA hasar ürünlerindeki değişimin kantitatif düzeyde belirlenmesi mevcut sonuçlara bir delil niteliği kazandırılabilir.
6. Çay ve atıklarının desmutajen özelliğinin ortaya konması için, H₂O₂ ile muamele öncesi özüte maruz bırakılan grup ile negatif ve pozitif kontrol grubunda ortamdaki metal iyon konsantrasyonu ölçülerek, çay ve atıklarının metal şelatör özellikleri değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S and Rezaie A. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit*, 10:141-147.
- Akkuş I. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayınları.
- Altınışık M. 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı. Aydın.
- Altuğ T and Elmacı Y. 1998. Gıdalarda doğal olarak bulunan lezzet bileşenleri. Saldanlı, editör. Gıda Kimyası. 1. Baskı. Ankara: Hacettepe Yayınları, 453-86
- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ and Schmezer P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat Res*. May 1; 307(1): 261-71.
- Anderson D, Başaran N, Duydu Y, Karahalil B ve Üstündağ A. 2010. Türk Toksikoloji Derneği, Comet tekniği kursu, Ankara.
- Arcak S, Kütük AC ve Haktanır KG. 1997. Çay Atıklarının Toprakta Enzim Aktivitesi ve Nitrifikasyon Üzerine Etkileri. *Mühendislik Bilimleri Dergisi* (3).
- Atmaca E ve Aksoy A. 2009. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi, *Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 79 - 83.
- Aust AE and Eveleigh JF. 1999. Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM*, 222: 246-252.
- Aydın S, Başaran AA ve Başaran N. 2005. Modulating Effects of Thyme and Its Major Ingredients on Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1299-1305.
- Azqueta A, Shaposhnikov S and Collins AR. 2009. Detection of Oxidised DNA Using DNA Repair Enzymes. The Comet Assay in Toxicology. Royal Society of Chemistry.
- Balentine DA, Wiseman SA and Bouwens LC. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37:693- 704.
- Baykal Y, Gök F ve Erikçi S. 2002. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom*, 14(1): 94-100.
- Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ ve Alvir M. 2004. DNA Hasarı Analizinde μ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2(3): 97-103.
- Beevi SS, Narasu ML ve Govda BB. 2010. Polyphenolics Profile, Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Leaves and Stem of *Raphanus sativus* L., *Plant Food Hum. Nutr.*, 65(1): 8-17.
- Benzie IFF and Szeto YT. 1999. Total Antioxidant Capacity of Teas By The Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J Agric Food Chem*. 64: 633-636.

- Brent, J.A. and Rumack, H.H.: Role of free radicals in toxic hepatic injury I.free radicalchemistry. *Journal of Clinical Toxicology*, 49(4): 481-493, 1993.
- Burçak G ve Andican G. 2004. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaşa TıpDergisi*, 35: 159-169.
- Boiteux S and Radicella JP. 1999. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNAfrom endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81(1-2): 59-67.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D and Ravanat JL. 2003. Oxidative damage to DNA:Formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res*; 531: 5-23.
- Capdevilla J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BSS and Estrabrook RW. 1981. Theoxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P 450.*Biochemical Biophysical and Research Communications*, 101, 1357-1363.
- Chen H, Qu Z, Fu L, Dong P and Zhang X. 2009. Physicochemical properties andantioxidant capacity of 3-polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea,*J. Food Sci.*, 74(6):C469-74.
- Cheng HY, Lin C, Yu K, Yang CM and Lin CC. 2003. Antioxidant and Free RadicalScavenging Activities of Terminalia chebula. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(9) 1331-1335.
- Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH ve diğerleri. 2001. The green teapolyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sciences*, 70(5), 603-614.
- Chung SY, Lambert DJ, Ju J, Lu G. and Sang S. 2006. Tea and cancer prevention:Molocular mechanisms and human relevance. *Toxicology and AppliedPharmacology*(doi:10.1016/j.taap.11.024).
- Collins AR, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L,Panayiotidis M, Raslova K and Vaughan N. 1997. Comet assay in humanbiomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental andMolecular Mutagenesis*, 30: 139-146.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M and Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage:Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17: 1195-1214.
- Cuendet M, Hostettmann P and Potterat O. 1997. Iridoid Glucosides with Free RadicalScavenging Properties from Fagraea blumei, *Helv. Chim. Acta.*, 80, 1144-1152.
- Çelik F. 2006. Çay (Camellia sinensis); İçeriği, Sağlık Üzerindeki Koruyucu Etkisi ve Önerilen Tüketimi. Derleme, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Dicle ÜniversitesiHastanesi *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 26.

- Demir S. 2010. Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin Comet assay yöntemi ile araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Trabzon.
- Demir A. 2011. Siyah çay, yeşil çay ve atıklarının antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Rize.
- Dhawan A, Bajpayee M, Pander KA and Parmar D. 2009. Protocol for the single cell gel electrophoresis / comet assay for rapid genotoxicity assessment. Industrial Toxicology Research Centre. India.
- Dizdaroglu M. 1999. Mechanisms of oxidative DNA damage; lesion and their measurement. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 302: 67-87, 1999.
- Elliot JG. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*53(2); 46-48.
- Elwin-Lewis M, Vitale MK and Opjas T. 1980. Anticariogenic potential of commercial teas. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 6, 273-276.
- Evans MD and Cooke MS. 2004. Factors contributing to the outcome of oxidativetodamageto nucleic acids. *BioEssays*, 26: 533-542.
- Feng Q, Torii Y, Uchida K, Nakamura Y, Hara Y and Osawa T. 2002. Black Tea Polyphenols, Theaflavins, Prevent Cellular DNA Damage by Inhibiting Oxidative Stress and Suppressing Cytochrome P450 1A1 in Cell Cultures *J Agric Food Chem.*(Jan 2;50(1):213-20.
- Fidan AF. 2010 DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrofrezisi, AKÜ *Fen Bilimleri Dergisi*, (8)1.
- Fisunoğlu M. 2003. Besler Çay ve Sağlık İlişkisi Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü.
- Freeman BA and Crapo JD. 1982. Biology of disease Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47(5): 412-423.
- Frei B and Higdon JV. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies *J. Nutrition*, 133: 3275S–3284S.
- Friedberg EC. 2003. DNA damage and repair. *Nature*; 421(23): 436- 440.
- Glei M and Pool-Zobel BL. 2006. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3 gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes, *Toxicol In Vitro*, 20 295–300.
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *PrevMed*, 21:334-50.

- Gupta S, Hussain T and Mukhtar H. 2003. Molecular pathway for (-) epigallocatechin-3 gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410, 177-185.
- Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S and Talbot W. 2003. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *Journal of Nutrition*, 133(10), 3303-3309.
- Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal*, 1, 358-364.
- Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91:14-22.
- Halliwell B and Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19.
- Halliwell B. 1989. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82: 747-752.
- Halliwell B. 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 52:253-265.
- Han KC, Wong WC and Benzie FF. 2011. Genoprotective effects of green tea (*Camelliasinensis*) in human subjects: results of a controlled supplementation trial. Department of Health Technology and Informatics, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong *British Journal of Nutrition*, 105, 171-179.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. 2003. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *4th International Comet Assay Workshop Mutagenesis*, 18:45-51.
- Henning SM, Nicolas HL, Yantao N, Rosario RM and Hejing W. 2004. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80:1558-64.
- Hertog MGL, Kromhout D, Arvanis C, Blackburn H, Buzina R and Fidanza F. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- Ivor ED. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine; *Nutrition. Volume 16, Issues 7-8*, 692-694.
- Johnson MK and Loo G. 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*, 459, 211-218.
- Kanadzu M, Lu Y and Morimoto K. 2005. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Letters*, 241(2), 1-6.

- Kaur PK, Chopra K, Garg A and Geetha T. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Journal Article*. 556(1-2):65-74.
- Kılınç K ve Kılınç A. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijenradikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33: 110-118.
- Klaunig JE, Meng J, Ren B, Xu Y, Kamendulis LM and Dum N. 2001. Reduction of oxidative DNA damage (comet assay) in white blood cells by black tea consumption in smokers and non-smokers. *Toxicol. Sci*, 60: 411-412.
- Langley S and Evans C. 2000. Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using the Ferric Reducing Power (FRAP) Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 51: 181-188.
- Langley S and Evans C. 2000. Consumption of Black Tea Elicits an Increase in Plasma Antioxidant Potential in Humans. *Int. J. Food Sci. Nutr*, 51: 309-315.
- Li C and Xie B. 2000. Evaluation of the Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Tea oxypolimers. *J Agric Food Chem*. 48: 6362-6366.
- Mason RP, Kalyanaraman B, Tainer BE and Eling TE. 1980. Carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthetase oxidation of arachidonic acid: spintrapping and oxygen uptake studies. *Journal of Biology and Chemistry*, 255, 5019-5022.
- McKay DL and Blumberg JB. 2002. The role of tea in human health. *Journal of American Collage of Nutrition*, 21, 1-13.
- Mehmetoğlu İ, Muhteşem C, Gökçe R ve Kurban S. 2005. Çay baharat ve bitki kaynaklı bazı gıda maddelerinin flavonoid içerikleri ve antioksidan özellikleri. *Türk klinikleri J Med Sci*, 25:407-411.
- Minnet C. 2006. Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi. Osmangazi Üniversitesi. Eskişehir.
- Munari CC, Alves JM, Bastos JK and Tavares DC. 2009. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 30(1): 22-28.
- Müftüoğlu M. 2003. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi*;28 (1); 20-24.
- Nakachi K, Suemasu K and Suga K. 1998. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89, 254.
- Nossoni F. 2008. Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology, Potential Applications, and Limitations in Cancer Research, *Basic Biotechnology Journal*.

- Olive PL, Banath JP and Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “comet” assay. *Radiat Res*, 122:86-94.
- URL-1 2012 <http://www.biriz.biz/cay/literatur/index.htm> Kamil Engin İslamoğlu, Çay literatürü. (21 Kasım, 22.30).
- URL-2 2012 <http://www.hknkrt.com/dna-nedir-tam-anlamiyla-biliyor-musunuz-2/>(15 Kasım, 18.00).
- URL-3 2012 <http://www.loats.com/comet.html> LAI's Automated Comet Assay Analysis System (LACAAS). (24 Kasım, 16.50).
- Rietveld A and Wiseman S. 2012. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials¹ Unilever Health Institute, Unilever Research and Development, Vlaardingen, *The Netherlands. nutrition*.
- Roberfroid MB. 2002. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, 133-138.
- Rodriguez M, Drouin R, Holmquist GP, O'Connor TR, Boiteux S, Laval J, Doroshov J, Hand Akman SA. 1995. Mapping of Cu/H₂O₂-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem*; 270: 17633-17640.
- Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK and Siddiqi M. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol, *Mutat. Res.* 523–524, 33–41.
- Simic MG. 1994. DNA Markers of oxidative processes in vivo: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 54(suppl): 1918-1923.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*; 175:184-91.
- Skrzydłowska E, Ostrowska J, Farbiszewski R and Michalak K. 2002. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*, 9, 232-238.
- Stuart CE, Scandlyn MJ and Rosengren RJ. 2006. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. *Life Sciences*, 79, 2329-2336.
- Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE and Min WK. 2000. In vivo antioxidant effect of green tea. *Eur J Clin Nutr*; 54:527-9.
- Sutherland BA, Rahman, RMA and Appleton I. 2006. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(5), 291-306.

- Tekşen F. 2006. Tıbbi biyoloji ve genetik ders kitabı. Cilt 1. Baskı 2. Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Yayınları. Ankara.
- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci*;53:291-301.
- Tice RR, Agurell E and Anderson D. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35:206-21.
- Tokaç D. 2007. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri, Hacettepe Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Tosun İve Karadeniz B. 2005. Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi. *OMÜZir. Fak. Dergisi*, 20(1):78-83.
- Vinson JA, Teufel K and Wu N. 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52; 3661-3665.
- Wang H, Provan GJ and Helliwell K. 2000. Tea Flavonoids: Their Functions, Utilisation and Analysis. *Trends in Food Sci Tech*, 11: 152-160.
- Weinreb O, Mandel S and Youdim MB. 2003. Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, Rapomorphine, green tea polyphenol(-)-epigallocatechine-3-gallate, and melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 993, 351-361.
- Winyard PG, Perrett D, Blake DR, Haris G and Chipman JK. 1990. Measurement of DNA oxidation products. *Analytical Proceedings Articles*, 27: 224-227.
- Wollgast J and Ankla E. 2000. Review on Polyphenols in Theobroma cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, *Food Res. Int*, 33, 423-347.
- Yamamoto Y. 2001. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science*, 27: 1-4.
- Yang, MH ve Schaich KM. 1996. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic Biol Med.*, 20: 225-236.
- Yang TT ve Koo MW. 1997. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacology Research*, 35, 505-12.
- Yang CS and Landau JM. 2000. Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. *American Society for Nutritional Sciences*. 130: 2409-2412.
- Yen GC, Chen HY and Peng HH. 1997. Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Various Tea Extracts. *J. Agric. Food Chem*, 46:3875-3878.

- Yen GC, Ju JW and Wu CH. 2004. Modulation of tea and tea polyphenols on benzo(a) pyrene-induced DNA damage in Chang liver cells, *Free Radic. Res.* 38 193–200.
- Yeni D, Fidan AF ve Gündoğan. 2010. Spermatozoon'da Tek Hücre Jel Elektroforezi(SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 24 (3): 167-173.
- Yılmaz İ. 2010. Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres İnönü Üniversitesi *Tıp Fakültesi Dergisi Derleme*, 17 (2) 143-153.
- Yu H, Yin J and Shen S. 2006. Effects of epi-gallocatechin gallate on PC-3 cellcytoplasmic membrane in the presence of Cu². *Food Chemistry*, 95, 108-115.
- Zaveri NT. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer andnoncancer applications. *Life Sciences* 78, 2073–2080.
- Zeyuan D, Bingyin T, Xiaolin L, Jinming H and Yifeng C. 1998. Effect of Green Tea andBlack Tea on the Blood Glucose, the Blood Triglycerids, and Antoxidants in Aged Rats. *J. Agric. Food Chem*, 46: 3875-3878.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra KELEŞOĞLU 02.03.1987 tarihinde Gümüşhane’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa’da tamamladı. 2009 yılında K.T.Ü. Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü bitirdi. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda tezli yüksek lisans programına başladı. Halen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans yapmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.