

283869

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRK ÇAYLARININ ANTİTİYAMİN AKTİVİTESİ  
ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA**

Biyokimya Programı  
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

**Ecz. ÖZLEM TÜRKAY**

ANKARA — 1986

59

T.C.  
HACETTEPE UNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK ÇAYLARININ ANTİTİYAMİN AKTİVİTESİ  
UZERİNDE BİR ÇALIŞMA

Biyokimya Programı  
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz. ÖZLEM TÜRKAY

Rehber Öğretim Görevlisi : Dr. NİLGÜN SOMER

ANKARA - 1986

# İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.

## BÖLÜM I

Giriş ve Amaç . . . . .	1
-------------------------	---

## BÖLÜM II

Genel Bilgiler . . . . .	3
II.1. Tiyamin, yapısı ve kofaktör şekli . . . . .	3
II.2. Tiyamin'in biyokimyasal işlevi . . . . .	4
II.3. Tiyamin'in metabolizması . . . . .	6
II.4. Tiyamin eksikliği . . . . .	7
II.5. Besin kaynaklı antitiyamin faktörler . . . . .	10
II.5.1. Bitkisel kaynaklı antitiyamin faktörler ve etki mekanizmaları . . . . .	11
II.5.2. Hayvansal kaynaklı antitiyamin faktörler ve etki mekanizmaları . . . . .	17
II.6. Tiyamin eksikliğinin biyokimyasal tespiti . . . . .	18
II.6.1. Tiyamin düzeyinin direkt ölçümü . . . . .	18
II.6.2. Tiyamin düzeyinin indirekt ölçümü . . . . .	20

## BÖLÜM III

Araç, Gereç ve Yöntemler . . . . .	24
III.1. Kullanılan alet ve çözeltiler . . . . .	24
III.1.1. Kullanılan aletler . . . . .	24
III.1.2. Kullanılan çözeltiler . . . . .	24
III.2. Çalışma materyali olarak kullanılan çay ve kan örneklerinin sağlanması . . . . .	26
III.2.1. Çay örneklerinin sağlanması . . . . .	26
III.2.2. Kan örneklerinin sağlanması . . . . .	26
III.3. Yöntemler . . . . .	27
III.3.1. Türk çaylarında ATA tayin yöntemi (Tiyokrom yöntemi) . . . . .	27
III.3.2. ETKA'ne TPP'ın etkisinin tayin yöntemi . . . . .	29

## BÖLÜM IV

B u l g u l a r . . . . .	32
IV.1. ATA tayin sonuçları . . . . .	32
IV.2. ETKA tayin sonuçları . . . . .	32

## BÖLÜM V

T a r t ı Ő m a v e S o n u ç . . . . .	42
V.1. Uygulanan yöntemlere ilişkin tartışma . . . . .	42
V.2. Türk çaylarının ATA bulgularına ilişkin tartışma . . . . .	43
V.3. Demleme süresinin ATA üzerine etkisine ilişkin tartışma . . . . .	44
V.4. İnkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve pH'nın ATA'ye etkisine ilişkin tartışma . . . . .	45
V.5. Çay içiminin ETKA'nin TPP ile stimülasyonuna etkisine ilişkin tartışma . . . . .	46
V.6. Sonuç . . . . .	47
ÖZET - T ü r k ç e . . . . .	48
ÖZET - Y a b a n c ı D i l d e . . . . .	49
K a y n a k l a r . . . . .	51
Ö z g e ç m i Ő . . . . .	60

## BÖLÜM I

### G İ R İ Ş v e A M A Ç

B kompleks vitaminlerinden biri olan tiyamin (B<sub>1</sub> vitamini) hemen hemen bütün canlı organizmalarda bulunabilen, omurgalıların birçoğu ve bazı mikroorganizmalar için esansiyel olan bir bileşiktir (1).

İlk kez 1897 yılında Eijkman, kabukları çıkartılmış pirinçle beslenen tavuklarda denge kaybı ve felç gibi sinir sistemi bozuklukları olduğunu fark etmiş, 1901'de Grijns bu hastalığın besin kaynaklı olduğunu bulmuştur. 1912 yılında Funk bundan sorumlu olan bileşiği pirinç kabuklarından izole etmiş ve pirimidin bazı yapısında olduğunu bildirmiştir. 1926 ve 1927 yıllarında Jansen ve Donath tiyaminini tam olarak izole etmeyi başarmışlardır (1-3). Williams'ın vitaminin kimyasal yapısını açıklamasından sonra 1936 yılında tiyaminin beslenmedeki rolü ve biyokimyasal fonksiyonları açıklığa kavuşmuştur (4). Tiyamin eksikliğinde ortaya çıkan ve yorgunluk, halsizlik, kusma, kaslarda zayıflama, periferik nörit, irritabilite, depresyon, taşikardi, kalp yetmezliği, ödem ile karakterize olan "Beriberi", bugün eski önemini kaybetmiş bir hastalık olmakla birlikte antityamin faktörler içeren besinlerin sıklıkla alındığı Tayland ve Kore gibi ülkelerde halâ problem yaratmaktadır (5).

Yapılan çalışmalar çay, eğreltiotu, kahve, böğürtlen, pamuk tohumu, pirinç gibi birçok bitkide ısıya dayanıklı antityamin özelliğe sahip bazı maddeler bulunduğunu göstermiştir (6).

Antitiyamin aktivite (ATA) gösteren bileşiklerle tiyamin eksikliği arasındaki bağıntının ayrıntıları henüz tam olarak aydınlatılmamışsa da, başta çay olmak üzere bu tip bileşikleri içeren birçok bitkinin insanlarda tiyamin dengesini bozduğu, çay içiminin ve Tayland gibi bazı ülkelerde yaygın olan fermente çay yaprağı çiğneme alışkanlığının vücut tiyamin düzeyini belirgin şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (7). Çeşitli çaylarda yapılan araştırmalar, çayların ATA'sinin tanen ve diğer polifenolik bileşik içerikleri ile orantılı olduğunu, bu bileşiklerin yüksek pH ve oksijenin de etkisi ile tiyaminin tiyazol halkasını açarak tiyamini SH formuna çevirip inaktif hale getirdiğini ortaya koymuştur (8,9). Ayrıca çayların hazırlanış biçimleri ve inkübasyon süreleri de ATA'yi etkilemekte, özellikle yemeklerden hemen sonra içilen çay besinlerle alınan tiyamini etkisiz hale getirmektedir (10,11).

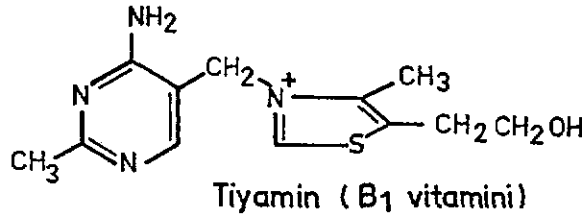
Ülkemizde çay içimi yaygın olduğu ve özellikle uzun süre demlenmiş çay kullanıldığı, ayrıca besinlerle birlikte çay içme alışkanlığı bulunduğu halde, bugüne kadar Türk çaylarında ATA'nin varlığı gösterilmemiş, kullanılan çayların cinslerinin, hazırlanış biçimlerinin ve inkübasyon sürelerinin ATA üzerine etkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Türkiye'de üretilen 10 farklı çayın ATA'lerinin ölçülmesi, bu aktivite üzerine demleme ve inkübasyon süreleri, pH ve sıcaklığın etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak yoğun çay içiminin insan organizmasında tiyamin düzeyine etkisi in vivo olarak araştırılmıştır.

BÖLÜM II  
GENEL BİLGİLER

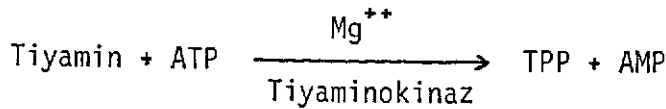
II.1. TIYAMİN; YAPISI, KOFAKTÖR ŞEKLİ

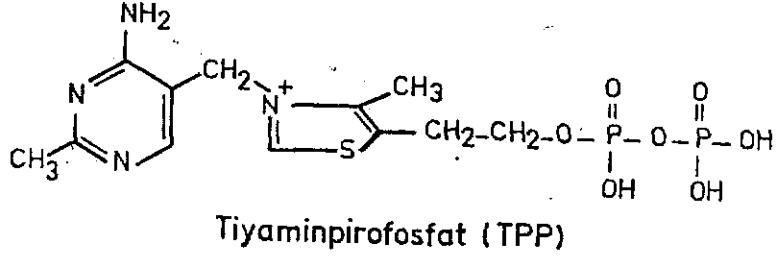
İlk kez Jansen ve Donath tarafından (1926) kristalize halde izole edilen tiyaminin yapısı, 1936'da Williams tarafından aydınlatılmıştır (1,12).

Kimyasal olarak pirimidin ve tiyazol halkalarından oluşan tiyamin, bütün canlı organizmalarda bulunan ve esansiyel olan bir bileşiktir. Bitkiler ve bazı mikroorganizmalar tiyamini kendileri sentezlerken hayvanlar bu vitamini dışarıdan almak zorundadırlar. Yüksek bitkilerin çoğu, özellikle yaprakları, tiyamin sentezleme yeteneğine sahiptir. Bu bitkiler çoğunlukla pirimidin ve tiyazol halkalarını ayrı ayrı sentezler ve daha sonra birleştirirler. Ancak bu halkaların biyosentezleri henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır (1).



Tiyaminin organizmadaki kofaktör şekli tiyamin pirofosfattır (TPP). Tiyamin pirofosfat, tiyamin molekülüne, tiyaminokinaz enzimi aracılığı ile ATP'den pirofosfat grubunun transferi ile sentezlenir (1,3,12,13).





Bütün canlı organizmalar tiyamini fosforile etme yeteneğine sahiptirler. Bununla beraber bazı bitkiler tiyamini serbest şekliyle de kullanabilmektedirler.

## II.2. TIYAMİN'İN BİYOKİMYASAL İŞLEVİ

Tiyaminin biyokimyasal işlevi ilk kez Peters ve diğ. tarafından ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar tiyamin yetmezliği oluşturulan güvercinlerin beyin dokusu homojenatlarının oksijen kullanımının normallere oranla daha az olduğunu gözlemişler, bu homojenatlara dışardan tiyamin ekledikten sonra piruvat çözeltisinde süspande ettiklerinde oksijen kullanımının belirgin bir şekilde yükseldiğini saptamışlardır. Daha sonra sürdürülen çalışmalar tiyaminin, pirüvik asidin asetaldehite dekarboksilasyonunu katalizleyen dekarboksilaz enziminin kofaktörü olduğunu göstermiştir. Bugün TPP'in (kokarboksilaz olarak da adlandırılmaktadır) 24'den fazla enzim sisteminin koenzimi olduğu bilinmektedir (4).

TPP, karbohidrat metabolizmasında rol oynayan dekarboksilaz, pirüvik dehidrogenaz,  $\alpha$ -ketoglutarik dehidrogenaz, transketolaz, fosfoketolaz gibi birçok önemli enzimin koenzimidir (1).

TPP'in kofaktör olarak görev aldığı başlıca biyokimyasal tepkimeler şöyle özetlenebilir (4,13,14) :

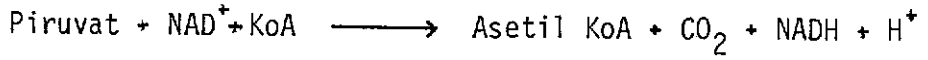


### II.2.1. $\alpha$ -Ketoasitlerin oksidatif dekarboksilasyon tepkimeleri

Bu tepkimelerde TPP aldehit grubu transferi yapar.

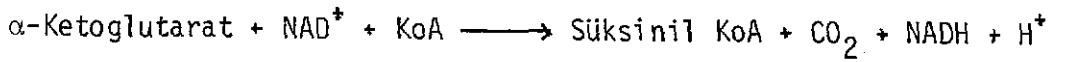
#### a) Pirüvik asidin asetil KoA'ya dönüşmesi

Piruvatın asetil KoA ve CO<sub>2</sub>'e tersinmez olarak oksidatif dekarboksilasyonu bir multienzim kompleksi tarafından katalizlenir ve bu kompleksin bir üyesi olan piruvat dehidrogenaz enziminin prostetik grubu TPP'dir.



#### b) $\alpha$ -Ketoglutaratın sürsinil KoA'ya dönüşmesi

Bu tepkime tersinmez olup  $\alpha$ -Ketoglutarat dehidrogenaz enzim kompleksi tarafından katalizlenir. Bu enzim sistemi de koenzim olarak TPP'a gereksinim duyar.

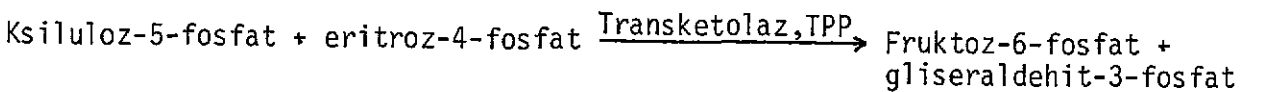
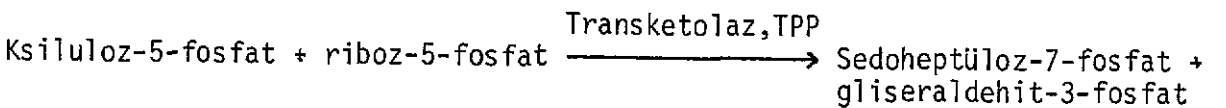


#### c) Dallı zincirli aminoasitlerin katabolizması

Valin, izolösin ve lösin gibi dallı zincirli aminoasitlerin yıkımındaki oksidatif dekarboksilasyon basamağında görev yapan kompleks enzim sisteminin tiyamin pirofosfata gereksinimi vardır.

### II.2.2. Transketolaz tepkimesi (15-17)

Başlıca eritrositlerde bulunan transketolaz enzimi TPP'a bağımlı bir enzimdir ve heksozmonofosfat şantının aşağıdaki tepkimelerini katalizler :



Tiyamin eksikliğinde eritrosit transketolaz aktivitesi düşer.

### II.2.3. Oksidatif olmayan dekarboksilasyon tepkimeleri

Genellikle bira mayasında ve E. coli gibi mikroorganizmalarda piruvatın asetaldehite dönüştüğü tepkimelerdir ve TPP gerektirirler. Sonuçta aldehit veya aldehitin oksidatif formları (açiloinler) meydana gelir.

### II.2.4. Fosfoketolaz tepkimeleri (fosforoklastik parçalanma)

Bu tepkimelerde ketozların açil grupları açil fosfatlara dönüşür ve TPP'a gereksinim vardır.

Tiyamin, önemli biyokimyasal tepkimelerdeki etkin rolü nedeniyle karbohidrat metabolizması, nükleotid sentezi ve redükte NADP yapımında (18), lipid ve protein sentezinde görev yapar (19-21).

## II.3. TIYAMIN'IN METABOLİZMASI

Tiyamin başlıca duodenum ve proksimal jejunumdan emilir (22,23). Emiliminde hem aktif hem de pasif difüzyon rol oynar. Absorpsiyon hız sınırlandırıcı bir yöntemle kontrol edilmektedir. Serum tiyamin düzeyi de, diğer B grubu vitaminlerinde olduğu gibi oral yükleme dozundan etkilenmez. Absorpsiyonu etkileyen faktörler henüz bilinmemekle birlikte kortikosteroidlerin tiyamin absorpsiyonunu kontrol ettikleri sanılmaktadır (3). Tiyamin kan dolaşımında büyük oranda albumine bağlı halde taşınır (3). Hücre zarlarından özgül zar-sal fosfatazlar yardımı ile geçtiği saptanmıştır (24). Vücutta en fazla kalp, böbrek, karaciğer ve beyin dokularında bulunur. Kanda 9 µg/100 ml oranında; plazma, serebrospinal sıvı ve tükürükte 0-1.5 µg/100 ml oranında bulunur (2). Normal kişilerde 24 saatte idrarla atılan tiyamin miktarı 100 µg kadardır (25).

Tiyamin, özellikle glukoz metabolizmasında önemli bir rol oynadığından günlük tiyamin gereksinimi vücudun enerji ihtiyacı ile bağlantılıdır. Her 4400 kj enerji ihtiyacı için 0.33 mg tiyamine gerek vardır. Normal bir yetişkinin günlük tiyamin gereksinimi yaklaşık 9 mg dır (3).

Tiyamin bakımından zengin besinler arasında kuru fasulye, bezelye, ceviz, fındık, buğdaygillerin tümü, sebzelerin çiçek, meyva ve kökleri, domuzeti, hayvanların karaciğeri, kalp, böbrek, beyin gibi organları, yumurta sarısı, ayrıca balık sayılabilir (2,13,14).

#### II.4. TIYAMIN EKSİKLİĞİ

1897 yılında Eijkman, kabukları çıkarılmış pirinçle beslenen tavuklarda denge kaybı, felç ve ani vücut ısısı düşüşü ile karakterize bir hastalığı keşfetmiş, yaptığı mikroskopik incelemede periferel sinir sisteminde dejenerasyonlar olduğunu görmüştür. Bu duruma "polinötritis gallinarum" adını veren Eijkman, hastalığa nişastalı besinlerde bulunan bir zehirin neden olduğunu, antidotun ise pirinç kabuklarında bulunduğunu öne sürmüştür (1).

Aynı şekilde Vonderman, hayvanlarda gözlenen bu hastalık ile insanlarda gözlenen "Beriberi" nin benzer yanları olduğunu farketmiş, Grijns ise 1912'de sözedilen belirtilere yol açan antinöritik faktörü pirinç kabuklarından izole ederek kabukları çıkartılmış pirinçle beslenenlerde tiyamin eksikliği gözlendiğini bildirmiştir (1). 1922 yılında Peters, tiyamin yetersizliğinin yalnızca periferel sinirleri değil merkezi sinir sistemini de etkilediğini göstermiştir (2).

Beriberi terimi besin kaynaklı tiyamin eksikliğini ifade etmek için kullanılmaktadır (26). Asya'da 1800'lerde ve 1900'lerin başında binlerce

insanın ölümüne yol açan beriberi hastalığı, diyetlerinin ana maddesi pirinç olan Güneydoğu Asya ülkelerinde halen sıklıkla görülen bir hastalıktır.

Bu hastalık kabukları çıkarılmış pirinçle beslenmenin yaygın olduğu Tayland, Filipinler, Endonezya ve bazı Afrika ülkeleri gibi birçok ülkede ciddi problemler yaratmaya devam etmektedir (3,25). Tiyamin eksikliğinin başlıca belirtileri genel olarak halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma, baş ağrısı, kas ağrıları, yorgunluk, periferik nörit, mental konfüzyon, irritabilite, depresyon, ani korkular, kalp hızında düşme, kalp büyümesi, kondüsyon düşüklüğü, kol ve bacaklarda ödemdir. Kronik beriberide kalple ilgili belirtiler hastayı sonuçta ölüme götürebilir (4). Genel olarak iki tip beriberi vardır (4,14) :

a- Kuru beriberi; Periferik nörit ile karakterizedir.

b- Yaş beriberi; Konjestif kalp yetmezliği ve ödem ile karakterizedir.

Günlük tiyamin alımı 0.4 mg'dan az olduğunda ortaya çıkan beriberinin yalnızca B<sub>1</sub> vitamini yetersizliği ile ilgili olmayıp, bazı risk faktörleri ve diğer bazı bileşiklerin yetersizlikleri eşliğinde ortaya çıktığı bildirilmektedir (3,4). Beriberi ayrıca yaşlılarda ve alkoliklerde de sıklıkla rastlanan bir durumdur (3,26,27). Alkoliklerde gözlenen kalp ve beyin dokusu hasarları, nörolojik bazı belirtiler büyük oranda tiyamin eksikliğine bağlıdır. Alkoliklerde rastlanan "Wernicke Ensefalopatisi" mental bozukluklar, felç göz hareketlerinde zayıflık, ataksi ile karakterize bir hastalıktır ve tiyamin eksikliğinden kaynaklanır (4).

Alkolik tiyamin yetersizliğinin çeşitli nedenleri vardır :

a- Beslenmeye bağlı yetmezlik : Alkolikler normal kişilere oranla

daha düzensiz ve yetersiz beslendiklerinden bu kişilerde vitamin eksiklikleri söz konusudur (3,28).

b- İntestinal malabsorpsiyon : Etanolün, tiyaminin barsak mukozasından taşınımı ve Emilimini engellediği gösterilmiştir (3,29).

c- Karaciğer fonksiyonlarındaki bozukluk : Alkoliklerde karaciğer fonksiyonları bozulduğundan tiyamin, aktif şekli olan tiyamin pirofosfata dönüşemez, bu da yetmezliğe yol açar (23). Ayrıca bu kişilerdeki karaciğer yağlanması ve siroza bağlı olarak tiyaminin depolanışında da bozukluklar ortaya çıkmaktadır (3,23).

d- Alkolün kendi metabolik yolunda kofaktör olarak tiyaminini kullanması da uzun süre alkol alanlarda ciddi tiyamin eksikliğine neden olmaktadır. Ayrıca alkolün metabolik yolunda bir ara ürün olarak ortaya çıkan asetaldehit, tranoketolaz apoenzimini denatüre ederek tiyamin eksikliğine yol açmaktadır (3,30).

Tiyamin eksikliği olan annelerin bebeklerinde de beriberiye rastlanmıştır (3,4). Bebeklerdeki beriberi ödem, ataksi, iştahsızlık, kusma, kalp yetmezliği, oligüri, karaciğer ve kalp büyümesi, büyüme geriliği ile karakterizedir (31).

Gebelik süresince tiyamin içermeyen diyetle beslenen sıçanların yeni doğanlarında, tiyamin yetmezliğine bağlı olarak beyin ve vücut ağırlığında azalma, ayrıca beyin gangliosid miktarında düşme ile birlikte mental gerilik gözlenmiştir (32).

Benzer şekilde gebeliklerinin 2. gününden itibaren tiyaminsiz veya tiyamince yetersiz diyetle beslenen sıçanların yavrularında prenatal dönemde tiyamin yetmezliğine paralel olarak büyüme geriliği gözlenmiştir (33).

Maymunlarda yapılan bir çalışmada tiyaminsiz diyet uygulandığında görülen başlıca klinik semptomların, insanlarda Wernicke hastalığına karşıt gelen periferik stimüli, ataksi, pitosis, pupiller anafleksiyeye eğilim, nistagmus ve oftalmopleziye eğilim gibi bulgularla karakterize olduğu gözlenmiştir. Tiyamin hidroklorür (15 mg/haftada 2 kez) tedavisi ile birlikte iyileşme görülmektedir. 6 aydan uzun süren tiyaminsiz uygulamalarda beyinin özellikle kontrol sisteminde anormallikler ve ölüm görülmüş, beyaz madde karakteristik bir şekilde boşalmıştır (34).

Tiyamin eksikliği beyinde bazı bölgelerde muskarinik reseptör sıklığını arttırmakta, bazılarında ise azaltmaktadır. Kronik yetmezlikte de hipotalamusu da içeren orta beyin bölgesinde asetilkolin seviyesinde azalma görülmüştür (35). Gene bu safhada ATP sentezinde anormallikler olmakta, tersinmez nörolojik bozuklukların etkisiyle glutamat katabolizmasında bozukluk görülmektedir.

Deneyler sonucu görülen ağırlık kayıpları, polinöritik konvülsiyonlar, hipotalamustaki muskarinik reseptörlerde görülen azalma, kolinerjik aktivitedeki artış bize tiyamin eksikliğini anlatan durumlardır (36).

Beyinde olduğu gibi, karaciğer mitokondrial aktivitede görülen tiyamin eksikliğine bağlı değişiklik, tiyaminin membran fonksiyonlarından çok, trikarboksilik asit siklisundaki aktivitesinin düşüşüne sebep olmaktadır (35,36).

## II.5. BESİN KAYNAKLI ANTİTIYAMİN FAKTÖRLER

Tayland'ın özellikle Kuzey ve Kuzeydoğu bölgelerinde yapılan araştırmalarda bu bölgede yaşayanların diyetle yeterli miktarda (0.5-0.44 mg/1000 cal/gün) tiyamin aldıkları halde ciddi beriberi belirtileri gösterdikleri ortaya

çıkıştır. Yapılan çalışmalar, bu bölgelerde yaşayanlarda gözlenen tiyamin eksikliğinin, yetersiz tiyamin alınmasına değil, beslenme alışkanlıklarına ve diyetle alınan bitkisel ve hayvansal kaynaklı antitiyamin aktiviteli bileşikleri içeren besinlere bağlı olduğunu göstermiştir (5-7,15,37,38).

#### II.5.1. Bitkisel kaynaklı antitiyamin faktörler ve etki mekanizmaları

Bitkisel materyaldeki enzimatik olmayan inaktivasyon faktörleri ilk kez 1946'da, yani tiyamin<sup>in</sup> kimyasal yapısının açıklanmasından 10 yıl sonra saptanmıştır (10). Bu ilk yayında diyetlerine % 40 oranında eğreltiotu eklenen sıçanlarda tiyamin eksikliği belirtilerine rastlanmış, "Antitiyamin aktivite=ATA" terimi de ilk kez bu olayı açıklamak üzere "eğreltiotu zehirlenmesi" ile eş anlamda kullanılmıştır. Daha sonra Kundig ve Somogyi (39) ATA'si olan bir dizi bitkiyi incelemişler ve bu aktivitenin genellikle renkli bitkilerde bulunduğunu gözlemişlerdir.

Yapılan çalışmalar birçok yeşil bitkide çeşitli yapılarda ısıya dayanıklı antitiyamin özellikli maddeler bulunduğunu göstermiştir. Bunların başlıcaları 3,4 dihidroksisinnamik asit (kafeik asit), kateşoller, kinonlar, pirogallol, kuarsetin, isokuarsitrin, rutin ve flavonoidlerdir (6,9,37,38). En önemli antitiyamin faktörlerden biri olan kafeik asit, eğreltiotu ve böğürtlende, çay yaprakları ve kahvede bulunmaktadır. Pamuk tohumundaki aktif madde 3,5 dimetoksisalisilik asit, pirinç kabuklarında bulunan ise, glukoz ve o-hidroksifenolden oluşan kompleks yapılu bir fenol bileşiğidir (8,40-43).

Tiyamin ve polihidroksifenol bileşikleri arasındaki etkileşim konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre fenolik bileşiklerin ATA gösterebilmeleri için şu koşullar gerekmektedir (6,11,38,43,44) :

a- ATA, iki OH grubu taşıyan fenol bileşiklerinden kaynaklanmaktadır.

- b- ATA için optimum pH 7'nin üstünde olmalıdır.
- c- Reaksiyon sistein ile inhibe olmaktadır.
- d- Optimum sıcaklık 50<sup>0</sup>C'nin üstünde olmalıdır.
- e- Reaksiyon için oksijen gereklidir.

Tiyaminin bozunması ile oluşan ürünler tiyokrom ve tiyamindisülfittir.

Somogyi ve Bonicke (38), 30 fenolik bileşiğin ATA'sini inceledikten sonra ATA için en önemli faktörün yapıdaki OH gruplarının sayısı ve yeri olduğunu bildirmişlerdir. Tek OH grubu içeren bileşiklerde hiç ATA görülmezken, OH grubunu para pozisyonunda bulunduranlarda orta derecede ATA gözlenmektedir. En fazla ATA ise OH grubunu orto pozisyonda taşıyanlarda bulunmuştur.

Tiyamin ile polihidroksifenol bileşikleri arasındaki tepkimenin mekanizması konusunda da birçok çalışma yapılmıştır.

Davis ve Somogyi (45) ile Murata ve diğ. (9) tiyamin ile kafeik asit ve diğer o-hidroksifenol bileşikleri arasındaki tepkimenin bifazik olduğunu bildirmişlerdir. Tepkimenin pH ve ısıdan bağımsız olarak redükleyici ajanlarla tersinir hale geçebilen çok hızlı bir başlangıç fazı, pH, ısı ve tepkimeye giren bileşiklere bağımlı tersinmez bir ikinci fazı vardır.

Bitkisel kaynaklı antitiyamin aktiviteli bileşiklerin biyolojik etkileri henüz kesin olarak aydınlatılmış değildir. Hayakawa, Murata ve Schaller (6), Hilker ve Somogyi (8), diyetlerinde kafeik asit veya tanen bulunan sıçanlarla kontrol grubu arasında vücut ağırlığı, idrar tiyamin düzeyi, ETK düzeyi veya TPPE açısından bir fark bulamazken (6), yapılan bazı araştırmalar tiyaminin kafeik asit ile tiyokrom-negatif forma geçtiğini, bu oluşan bileşiğin de aynen tiyamin gibi barsaktan absorblanarak tiyamin eksikliğine yol açtığını göstermiştir (46).



Sarkar (43) da tiyamince yetersiz bir diyetle beslediği sıçanlara tiyamin ve 3,5 dimetoksi salisilik asit karışımını enjekte etmiş, hayvanların kilo kaybetmeye başladıklarını ve iştah kaybı, halsizlik, bacaklarda kuvvet kaybı gibi tiyamin yetersizliği belirtileri gösterdiklerini saptamıştır. Bu belirtiler tiyamin verilmesinden birkaç gün sonra tamamen ortadan kalkmıştır. ATA gösteren bileşiklerle tiyamin eksikliği arasındaki bağıntının ayrıntıları henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, başta çay olmak üzere bu tip bileşikler içeren birçok bitkinin insanlarda tiyamin dengesini bozduğu gösterilmiştir (6).

a- Çay içiminin tiyamin eksikliğindeki rolü :

Beriberinin halen sıklıkla görüldüğü Uzakdoğu ülkelerinden Tayland'da bu hastalık özellikle Kuzey ve Kuzeydoğu bölgelerde halen etkinliğini sürdürmekte, TPPE'nin Kuzey Tayland'da % 21.6, Kuzeydoğunun kırsal kesimlerinde ise % 25 gibi yüksek bir değere ulaştığı bildirilmektedir (37). Kuzey bölgelerde yaşayan yetişkinlerin yaklaşık % 80'inin uyarıcı olarak fermente çay yapraklarını ve "Betel Nut" olarak bilinen yerel bir bitkiyi çiğnedikleri saptanmıştır. Yapılan çalışmalar çay ve fermente çay yapraklarında ATA'ye sahip bileşiklerin bulunduğunu göstermiştir (7). 100 ml kaynar suda 5 dakika demlenen 1 g kuru çay yaprağı saatte 0.21 mg tiyamini parçalayıp inaktif hale getirmektedir. Tayland'ın sözedilen bu bölgesinde günde kişi başına ortalama 1 g fermente çay yaprağı çiğnenmekte, bu miktar ise saatte gram yaş ağırlık başına 0.92 mg tiyamini etkisiz hale getirmektedir (5,7). Çay içiminin ve fermente çay yapraklarının çiğnenmesinin vücut tiyamin düzeyine etkisi Tablo I ve Tablo II'de özetlenmiştir.

Tablo I'de görüldüğü gibi bir haftalık çay içimi sonucunda TPPE %  $\pm 1.5$ 'dan %  $21.5 \pm 3.4$ 'e çıkmış ve deneklerde ciddi tiyamin yetersizliği belirmiştir. Deneklere 10 mg tiyamin verilmesi ile durum normale dönmüş, fermente çay yaprağı çiğneme alışkanlığı olanlarda ise günde 10 mg tiyamin verilmesi sonucu önce %  $22.6 \pm 2.7$  TPPE, %  $7.2 \pm 1.4$ 'e inmiştir (Tablo II).

Buhr ve Hilker (44) ise diyetlerini standardize ettikleri deneklerde çay içme periodu esnasında idrarla tiyamin atılımının azaldığını ve % TPPE değerinin tiyamin yetersizlik düzeyine ulaştığını göstermişlerdir. Yoo ve Hilker (8) 10 çeşit Kore çayını ATA açısından incelemişler ve tiyamin yetersizliğinin yaygın olarak gözleendiği Kore'de içilen bitkisel çayların hemen hepsinde ATA'ye sahip bileşikler bulunduğunu ve bu etkinin muhtemelen tanen yapısındaki maddelerden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Hilker ve diğerleri (11) çayın ATA'sinin  $60^{\circ}\text{C}$ 'de pH 7.5'da 3 saat inkübasyon sonucu ortaya çıktığını en az aktivitenin siyah çay ile instant çayda gözleendiğini belirtmişlerdir. Bu çayların ATA'leri, tanen içerikleri ile orantılı bulunmuş, ayrıca çayların hazırlanış biçimleri ve inkübasyon sürelerinin de ATA'yi etkilediği öne sürülmüştür (8,9).

Yapılan çalışmalar tanen yapısındaki maddelerin tiyamini inaktif modifiye tiyamin türevlerine dönüştürdüğünü gösterirken (6,11,38,40), bazı araştırmacılar da çaydaki ATA'nin yalnızca tanenlerden kaynaklanmadığını, bitkide bulunan diğer bazı fenolik yapıdaki bileşiklerin de ATA gösterdiklerini rapor etmişlerdir (8,9,38,47). Bu polifenolik yapıdaki bileşikler yüksek pH ve oksijenin etkisi ile tiyaminin tiyazol halkasını açmakta ve tiyaminin SH formu oluşmaktadır. Aktif kinonlar ise bu formu disülfid formuna oksitlemektedirler (5).

Özellikle çay içiminden kaynaklanan tiyamin eksikliğinin önlenmesi konusunda birçok çalışma yapılmış durumdadır. Vimokesant ve diğ. (5) yetersizlik durumunda 10 µg'lık minimum dozda oral olarak verilen tiyaminin, 3 saat içinde TPPE 'sini belirgin şekilde düşürdüğünü gözlemişlerdir. Aynı dozda tiyamin ile 1000 µg tannik asit birlikte verildiğinde TPPE tekrar yükselmekte ve tiyamin yetersizliği gözlenmektedir. Tannik asit verilisinden 60 dk sonra tiyamin verilirse TPPE tekrar düşüş göstermektedir. Bu nedenle özellikle çaydaki ATA'li maddelerden kaynaklanan tiyamin eksikliğini önlemek amacıyla çay içiminin yemeklerden en az 30 dk sonraya kaydırılması önerilmektedir (5). Bu durum Tablo III'de özetlenmiştir.

Ayrıca askorbik asidin (C vitamini) çayın ATA'sine karşı engelleyici etkisi olduğu bildirilmekte (6,48), bu vitaminin tiyamin ile polifenoller arasındaki etkileşmeyi engellediği öne sürülmektedir (5)(Tablo IV).

Rungruangsak ve diğ. (48) tiyaminin pH 8'de tannik asit ile modifiye olmasının askorbik asit tarafından önlendiğini ve bu etkinin askorbik asidin redükten özelliğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

b) Kahve içiminin tiyamin eksikliğindeki rolü :

Berutter ve Somogyi (37)'nin eğreltiotundan izole ettikleri 3,4-dihidroksisinnamik asit (kafeik asit)'in diğer ortofenoller gibi tiyamini inaktive ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar tepkimenin iki fazlı olduğunu ve kafeik asidin, tiyaminin siklik yapısını inaktive ederek ATA gösterdiğini ortaya koymuştur (45). Schaller ve Höller (42) ise kafeik asidin bir tiyamin antagonisti olduğunu ve tiyokrom-pozitif tiyamin miktarını azaltarak vitaminin barsak duvarından aktif taşınımını inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir.

Kafeik asidin bilinen bu etkisi nedeniyle kafeik asit ve yanısıra diğer bazı polifenolleri de içeren kahvenin ATA'si üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Somogyi ve Nageli (45) deneklere üç saat süresince yedi porsiyon halinde 1 lt kahve içirmişler, sonuçta ikinci ve beşinci saatler arasında idrarla tiyamin atılımının hızla azaldığını, kahve içme periodundan sonra ortalama tiyamin atılımının % 45.5 azalma gösterdiğini görmüşlerdir.

Kavrulmuş kahvenin ortodifenollerce zengin olduğu, kuru ağırlığının % 3.1-4.5 gibi büyük bir kısmını klorojenik asidin oluşturduğu, ayrıca kafeik asit ve diğer difenolleri de içerdiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, klorojenik asidin tavşanlarda antitiyamin etkiye yolaçtığını ve bu etkinin kafeik asidin antitiyamin etkisi ile hemen hemen aynı olduğunu ortaya koymuştur (45). Somogyi ve Schock kahvenin ATA'sinin kaynağını araştırmışlar, deneklere deneyden 1 saat önce oral olarak 10 mg tiyamin verip ardından su, kahve ve dekafeinize kahve uygulamışlardır. Hem kafeinli hem de kafeinsiz kahve içimi sonucunda tiyamin atılımı azalmakla birlikte, bu azalışın dekafeinize kahve içiminde daha belirgin olduğu gözle çarpmaktadır (6).

c) Betel nut bitkisinin çiğnenmesinin tiyamin eksikliğindeki rolü :

TPPE'nin % 25'e ulaştığı ve tiyamin eksikliği belirtilerinin sıklıkla görüldüğü Tayland'ın kuzey bölgelerinde fermente çay yaprağı çiğneme alışkanlığının yanısıra "betel nut" diye bilinen bitkiyi çiğneme alışkanlığı da yaygındır ve her iki bitkinin de ATA'ye sahip bileşikler içerdikleri gösterilmiştir (5,49). Betel nut bitkisinin içerdiği ATA'li bileşiklerin tamamı henüz tanımlanmamışsa da, bitkinin yüksek oranda tanen içermesi ve tanen endüstrisinde kullanılması dolayısıyla etkisinin tanenlerden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Ayrıca betel nut çiğneme alışkanlığının sıklıkla (49) gözleendiği bölgelerde aynı zamanda çiğ fermente balık yenmesi de yaygın olduğundan tiyamin eksikliğine hangisinin daha fazla neden olduğunu saptamak güçleşmektedir (5).

#### II.5.2. Hayvansal kaynaklı antitiyamin faktörler ve etki mekanizmaları

Hayvansal kaynaklı antitiyamin faktörlerin varlığı ilk kez diyetlerinde çiğ balık bulunan hayvanların B<sub>1</sub> avitaminozuna bağlı paralize benzer belirtiler göstermeleriyle tesadüfen bulunmuş, bu öldürücü hastalığa "Chastek paralizi" adı verilmiştir (50). Yapılan çalışmalar sözkonusu çiğ balıkta tiyamini inaktive eden bir enzim sisteminin bulunduğunu göstermiş, bu enzim grubuna "tiyaminazlar" adı verilmiştir. Daha sonra tiyaminazların yalnızca hayvanlarda değil, bazı bitkilerde de bulunduğu saptanmıştır (50,51).

Tiyaminaz I (EC 5.1.2) kabuklu balıklarda, tatlı ve tuzlu su balıklarında, eğreltiotu gibi bazı bitkilerde, Bacillus ve Clostridium gibi mikroorganizmalarda bulunmakta, bir baz değiştirme reaksiyonu ile tiyamini parçalamaktadır (50-52). Tiyaminaz II (EC 3.5.99.2) Bacillus Aneurindyticus, Trichosporon, Candida, Oospora ve diğer mikroorganizmalara üretilmekte ve tiyamini hidrolizleyerek pirimidin ve tiyazol birimlerine ayırmaktadır (50,51).

Tiyamini parçalayan bu enzimleri içeren besinler, memelilerde tiyamin eksikliğine bağlı belirtilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Gümüş renkli bitkilerde Tiyaminaz I alınmasına bağlı olarak "Chastek paralizi" denilen, beyin ve omurilikte kanamalarla karakteristik öldürücü bir hastalık ortaya çıkmakta, mikroorganizma kaynaklı tiyaminazlar da hayvanlarda beriberiye benzer belirtilere ve merkezi sinir sistemi defektlerine neden olmaktadır (50).

Tiyamin yetersizliği ve beriberinin sıklıkla görüldüğü Tayland'da fermente çiğ balık yeme alışkanlığı bulunmaktadır. Vimokesant ve diğ. (5) çiğ balık yiyenlerde ortalama % TPPE'nin  $16.4 \pm 3.7$  iken, balığı pişirerek diyete kattıklarında  $11.9 \pm 1.5$ 'a düştüğünü, pişmiş balıkla birlikte 10 mg tiyamin desteği verdiklerinde ise %  $7.8 \pm 1.4$ 'e kadar azaldığını gözlemişlerdir. Tiyaminazların ısı ile inaktive olduğunu ve deneklere pişmiş balık verildiğinde % TPPE değerlerinin düştüğünü gözönüne alarak bu araştırmacılar fermente çiğ balıkta tiyaminazların bulunduğu ve bu bölgede gözlenen tiyamin yetersizliği olgusunun betel nut çiğneme alışkanlığı kadar çiğ balığa da bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Dışardan verilen tiyaminin (10 mg/gün) % TPPE'ni normale döndürmesi de ilgi çekici bir sonuçtur.

## II.6. TIYAMIN EKSİKLİĞİNİN BİYOKİMYASAL TESPİTİ

Tiyaminin esansiyel bir besinsel faktör olduğunun ve beriberi ile ilişkisinin bulunduğunun anlaşılmasından itibaren tiyamin eksikliğinin tespiti için birçok biyokimyasal yöntem geliştirilmiştir (2,4).

Bunlar şöyle özetlenebilir :

### II.6.1. Tiyamin düzeyinin direkt ölçümü

#### II.6.1.1. Biyolojik tayin yöntemleri :

Tiyamin tayininde kullanılan ilk yöntemler biyolojik esasa dayananlardır. Bunların bir kısmı mikrobiyolojiktir. Ancak bu testler oldukça duyarsız ve zordurlar (3). 1980 yılında Ioke serum ve eritrositlerdeki tiyaminin tayini için atomize bir mikrobiyolojik yöntem geliştirmiştir (3).

#### II.6.1.2. Kimyasal yöntemler :

İlk kez Hennessy ve Gerecedo tarafından geliştirilen ve tiyamini

ferrisiyanür ile tiyokrom'a oksitleyerek verdiği mavi fluoresansı ölçmek esasına dayanan "tiyokrom-yöntemi", daha sonra birçok araştırmacı tarafından modifiye edilmiştir (3,53,54). Kolay ve kullanışlı bir yöntem olmasına karşın çok düşük miktardaki tiyamin için yeterli duyarlılıkta değildir.

Diğer bir yöntem ise tiyaminin p-aminoasetofenon ile oluşturduğu çözünmez mor-kırmızı kompleksin ölçümüne dayanan kolorimetrik yöntemdir. Ancak ortamda bulunan ürik asit, askorbik asit gibi bileşikler yöntemi enterfere edebilirler (3).

Ayrıca formaldehit-diazolanmış sülfanilik yöntemi ve bromtimol mavisi yöntemi gibi yöntemler de vardır (3,55).

#### II.6.1.3. İdrar yüklemesi testleri :

Tiyamin yüklemesi testleri çok çeşitli olmakla birlikte (3,56), en sık kullanılanlar, belli miktarda vitamin yüklenmesini takiben tiyaminin idrarla atılımının ölçülmesine dayanan testlerdir (3). Fakat bunların tiyaminin eksikliğini belirleme açısından fazla önemi yoktur.

#### II.6.1.4. Kromatografik tayin yöntemleri :

İnce tabaka kromatografisi, klasik iyon değiştirici kromatografi gibi teknikler tiyaminin ayırımı ve tayini için uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak bunlardan yalnızca bir ikisi rutin kan düzeyini ölçmeye uygundur (3,57). Son yıllarda bu konuda önerilen yöntemlerden biri de Sephadexiyon değiştirici kolon ile tiyamin fosforik esterlerinin ayırımı esasına dayanan bir testtir (58).

#### II.6.1.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayini :

Bu sistem ile 10-15 dakika gibi kısa sürede ölçüm yapılabilmektedir

ve mg düzeyindeki tiyaminin doğru ve hassas olarak tayin etmek mümkündür (3). Roser (59) HPLC ve tiyokrom yöntemlerini kombine olarak kullanarak idrar tiyamin düzeyini ölçmek için duyarlı ve özgül bir yöntem geliştirmiştir. Diğer bir yöntemle ise pmol düzeyindeki tiyamin ve onun fosfat esterlerinin tayini yapılabilmekte (60), ayrıca başka bir metodla 0.05 pmol'lük duyarlılıkta olmak üzere serum tiyamin düzeyinin ölçümü mümkün olmaktadır (61).

#### II.6.1.6. Yüksek voltaj kağıt elektroforezi :

Tiyokrom yönteminin enterferans yapan maddelerden etkilenmesi nedeniyle birçok araştırmacı tiyamin ayırımı için elektroforetik yöntemleri önermektedirler. Biyolojik materyalde çalışırken önce deproteinizasyon yapılmakta, daha sonra numune liyofilize edilip elektroforez uygulanmaktadır (52).

#### II.6.2. Tiyamin düzeyinin indirekt ölçümü :

##### II.6.2.1. Kan laktat, piruvat ve $\alpha$ -ketoglutarat düzeylerinin ölçümü :

Tiyamin, piruvat ve laktatın enzimatik yıkımlarında,  $\alpha$ -ketoglutaratın da dekarboksilasyonunda rol oynadığından bunların kan düzeylerinin ölçümünün tiyamin eksikliğini saptamakta kullanılabileceği ileri sürülmüş, ancak bu yöntemin tanı açısından fazla önemi olmadığı bildirilmiştir (3,4).

##### II.6.2.2. Glikolik ve oksalik asit düzeylerinin ölçümü :

Tiyamin pirofosfat, glioksalatın karbondioksit ve formata dönüşümünde kofaktör olarak görev yaptığından tiyamin eksikliğinde dokularda glioksalat birikimi olabileceği ve idrarla glioksalat ve oksalat atılımının artacağı öne sürülmüştür. Ancak bu konu henüz kesinlik kazanmamıştır (4).

##### II.6.2.3. Eritrosit transketolaz aktivitesinin ölçümü :

Transketolaz enzimi (EC 2.2.1.1) eritrositlerde, karaciğer, böbrek,



adrenal korteks, beyin, iskelet kası ve diğer dokularda bulunan TPP'a bağımlı bir enzimdir. Transketolaz reaksiyonunda ketosekerlerin keto grupları TPP ile glikoaldehit-enzim arabileşigi oluşturur ve bir alıcı aldehite transfer edilir. Memeli hücrelerinde transketolazın başlıca işlevi ribuloz-5-fosfat metabolizması ile ilgilidir (3,4).

Yapılan çalışmalar tiyamin eksikliğinde eritrosit transketolaz aktivitesinin (ETKA) düştüğünü ve bu durumun son derece spesifik olduğunu göstermiştir (25).

ETKA'nin ölçümü için birçok yöntem geliştirilmiştir. En çok kullanılan kolorimetrik tayinde hemoliz edilmiş kan numunesi 38°C de tamponlu ortamda riboz-5-fosfat'ın aşırı miktarı ile inkübe edilir, sonra ya kaybolan riboz-5-fosfat ya da oluşan sedoheptuloz-7-fosfat veya heksoz ölçülür. TPP eklenmesini takiben enzim aktivitesinde meydana gelen artışa "tiyamin pirofosfat etkisi (TPPE)" adı verilir (2,3,15,25,63,64). TPPE esas alınarak tiyamin eksikliğinin derecelendirilmesi yoluna gidilmiştir. Bu derecelendirmeye göre % TPPE 0-15 olanlar normal, 15-20 olanlar sınırda yetmezlik gösterenler ve 25 ve üzerinde olanlar ise ciddi yetmezlik gösterenler olarak kabul edilmektedir (15).

Tablo I.

Çay içiminin ETKA'nin TPP ile stimülasyonuna etkisi.

Süre	Uygulama	Kanın alındığı gün	% TPPE (Ort $\pm$ SH)	P değeri
0 ıncı gün	Normal (su)	0	11.0 $\pm$ 1.5	p < 0.01
1-7.gün	Çay	7	22.5 $\pm$ 3.5	
7-14.gün	Çay + 10 mg B <sub>1</sub> /gün	14	11.2 $\pm$ 2.4	p < 0.01
14-28.gün	10 mg B <sub>1</sub> /gün	21	9.7 $\pm$ 1.6	
21-28.gün	Su	28	10.3 $\pm$ 2.1	

Tablo II.

Çay yaprağı çiğnenmesinin ETKA'sinin TPP ile stimülasyonuna etkisi.

Süre	Uygulama	Kanın alındığı gün	% TPPE (Ort $\pm$ SH)	P değeri
0 ıncı gün	Normal (Fermente çay yaprağı)	0	20.6 $\pm$ 3.3	p < 0.01
1-7.gün	Çay yaprağı çiğneme yok	7	14.9 $\pm$ 2.6	
7-14.gün	Çay yaprağı+10 mg B <sub>1</sub> /gün	14	7.2 $\pm$ 1.4	p < 0.01
14-21.gün	Çay yaprağı + 10 mg B <sub>1</sub> /gün	21	22.6 $\pm$ 2.7	
21-28.gün	Çay yaprağı çiğneme	28	20.2 $\pm$ 3.7	

Tablo III.  
Zamanlamanın TPPE'ne etkisi.

Süre	Uygulama	Kanın alındığı gün	% TPPE (Ort $\pm$ SH)	p değeri
0 ıncı gün	Normal (Fermente çay yaprağı)	0	17.6 $\pm$ 1.5	p < 0.001 p < 0.01
1-7. gün	Çay çiğnemede yarım saat geciktirme	7	11.0 $\pm$ 1.4	
7-14. gün	Çay çiğnemede bir saat geciktirme	14	12.3 $\pm$ 0.91	

Tablo IV.  
C vitaminin tiyamin düzeyine etkisi.

Süre	Uygulama	Kanın alındığı gün	% TPPE (Ort $\pm$ SH)	p değeri
0 ıncı gün	Normal (Fermente çay yaprağı)	0	16.6 $\pm$ 1.85	p < 0.05
1-7. gün	Fermente çay yaprağı + 10 mg vit. C / öğün	7	12.0 $\pm$ 1.45	
0 ıncı gün	Fermente çay yaprağı	0	18.6 $\pm$ 2.6	p < 0.05
1-7. gün	Fermente çay yaprağı + portakal suyu veya ham papaya (100 mg C vit'e eşdeğer)	7	11.5 $\pm$ 1.1	

## BÖLÜM III

### ARAÇ , GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### III.1. KULLANILAN ALET VE ÇÖZELTİLER

##### III.1.1. Kullanılan Aletler :

Su banyosu (Köttermann), Santrifüj (Damon IEC PR-6000 Centrifuge), Vortex (Nuvemix. Type NVM), Spektroflorometre (Hitachi 650-40 Fluorescence), Spectrofotometre (Perkin-Elmer Coleman 6/8 Junior III Spectrophotometer), Hassas terazi (Sartorius), pH ölçer (Corning pH meter Model 7) kullanılmıştır.

##### III.1.2. Kullanılan Çözeltiler :

Kullanılan çözeltiler, kullanıldıkları deney sistemine göre sınıflandırılarak sunulmuştur. Bu çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

#### A. Türk çaylarında ATA tayininde kullanılan çözeltiler :

##### I- Tiyamin stok ve standart çözeltisi :

50 mg tiyamin HCl 200 ml 95<sup>0</sup> alkolde çözülür, 0.1 N HCl'den 5 ml eklenir, 500 ml'ye distile suyla tamamlanır.

100 µg/ml stoktan 2.5 ml alınarak 100 ml'ye distile suyla tamamlanır. 2.5 µg/ml tiyamin içeren standart elde edilir.

II. Fosfat tamponu (pH 7.5, 100 mM) :

$K_2HPO_4$  8.709 g/500 ml. 100 mM ve

$KH_2PO_4$  3.4 g/250 ml. 100 mM hazırlanır.

pH 7.5 olacak şekilde ayarlanır.

III. % 1  $K_3Fe(CN)_6$  :

1 g  $K_3Fe(CN)_6$  tartılarak 100 ml'ye distile suyla tamamlanır.

IV. % 30 NaOH :

30 g. NaOH tartılarak 100 ml'ye distile suyla tamamlanır.

B. ETKA'ne TPPE'nin tayininde kullanılan çözeltiler :

I- B Tamponu :

% 0.9 NaCl ..... 40 ml

% 1.15 KCl ..... 1030 ml

% 1.175  $K_2HPO_4$  ..... 200 ml

1 N HCl ile pH 7.4'e ayarlanır.

% 3.82  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10 ml eklenir ve pH 7.4 olacak şekilde ayarlanır.

II- TPP Stok solüsyonu :

1 mg TPP'a 1 ml B tamponu eklenip dondurularak saklanır.

TPP çalışma çözeltisi : 1 kısım stok TPP çözeltisine 8 kısım B tamponu eklenir, dondurularak saklanır.

III- Substrat Riboz 5-fosfat :

Riboz 5-fosfat Na tuzu distile suda çözülür. Solüsyondaki riboz miktarı orsino1 metoduyla ölçülür ve konsantrasyonu 7 mg riboz/ml olacak şekilde ayarlanır. 10 ml'lik küçük kaplarda dondurulur.

IV- % 7.5 TCA :

226 g TCA distile suyla 3 lt'ye tamamlanır, buzdolabında saklanır.

V- Orsinol reaktifi :

1 g orsinole 0.0832 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  eklenerek 25 ml'ye distile suyla tamamlanır. Karışım % 30 HCl ile 500 ml'ye tamamlanır.

VI- Pentoz standart solüsyonu :

1 mg D-Riboz 1 ml distile suda çözülerek buzdolabında saklanır. Pentoz çalışma çözeltisi : 1 ml Riboz stok alınarak distile suyla 100 ml'ye tamamlanır, buzdolabında saklanır.

### III.2. ÇALIŞMA MATERYALİ OLARAK KULLANILAN ÇAY VE KAN ÖRNEKLERİNİN SAĞLANMASI

III.2.1. Çay örneklerinin sağlanması :

Çalışmada Türkiye'de Çay Kurumu tarafından üretilmiş olan 10 farklı çay kullanılmıştır.

III.2.2. Kan örneklerinin sağlanması :

Çalışma, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı personelinden 5 kişilik bir grupla yürütülmüştür. Deneklere araştırma süresince günde 1800-2000 Kcal lik standart bir diyet uygulanmıştır. Kan örnekleri, her periyod sonunda sabah saat 10'da alınmıştır. Araştırma grubundan 4 periyodda kan toplanmıştır.

1. Periyod (0-7. gün) sırasında deneklerin çay içimi standardize edilmiş (250 ml/gün) ve 7. gün kan alınmıştır.

2. Periyodda (7-14. gün) deneklere günde 10 bardak (1lt/gün) olmak üzere çay yüklemesi yapılmış, 14. günde kan alınmıştır.

3. Periyod (14-21. gün) süresince deneklere günde 1 lt çay + 10 mg tiyamin HCl verilmiş ve 21. gün kan alınmıştır.

4. Periyodda (21-28. gün) ise çay içimi tamamen kesilerek deneklere yalnızca günde 10 mg tiyamin HCl verilmiş, 28. gün kan alınmıştır.

Toplanan kan numuneleri hemolize edildikten sonra plastik tüplerde dondurularak saklanmıştır.

### III.3. YÖNTEMLER

#### III.3.1. ATA tayin yöntemi (Tiyokrom yöntemi) :

Türk çaylarında ATA fluorometrik bir yöntemle tayin edilmiştir.

"Tiyokromyöntemi" olarak bilinen bu yöntemde (8,11) tiyamin, alkali ferrisiyanür ile oksidasyona uğratılıp tiyokrom'a dönüştürülür. Şiddetli mavi fluorensans veren bu bileşik isobütanol ile ekstre edilerek organik faza çekilir ve bu faz 367 eksitasyon - 410 emisyon dalga boylarında spektrofluorometrede okunur. Çalışmada standart tiyamin ve çay kökleri de paralel olarak işleme sokulmuş, sonuçlar gram çay başına parçalanmış mg tiyamin olarak ifade edilmiştir.

Deneyin yapılışı :

a- 2 g çay numunesi üzerine 100 ml kaynar su eklenir, karışım kaynar su banyosunda 5 dk tutulur.

b- Watman 2V süzgeç kağıdından süzülür.

c- 1 ml süzüntü distile su ile 100 ml'ye seyreltilir.

(İşlem her bir çay örneği için ayrı ayrı yapılır).

d- İnkübasyon karışımları aşağıdaki şekilde hazırlanır :

	$N_K$	$St_K$	N	N'	St	St'
$St_{2.5}$ $\mu\text{g/ml}$	-	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Dilüe çay	1 ml	-	1 ml	1 ml	-	-

Fosfat tamponu (pH 7.5) ile hepsi Folin-Wu tüplerinde 25 ml'ye tamamlanır.

e-  $60^{\circ}\text{C}$  de 3 saat inkübasyona bırakılır.

f- Inkübasyon karışımlarının herbiri inkübasyon süresi sonunda kapaklı tüplere aşağıdaki şekilde aktarılır :

	$N_K$	$St_K$	N	N'	St	St'
NaCl	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Inkübasyon Karışımı	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
$K_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
NaOH	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

g- 1 dakika sonra herbirine 5'er ml izobutanol eklenir ve 2'şer dakika vortekslenir.

h- Sonra 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

i- Her bir tüpten alınan 2 ml lik izobutanol fazı spektrofloreometrede 367 ex. ve 410 em. dalga boyunda okunur.

Sonuçların ifade şekli :

0.1 mg : Başlangıçtaki tiyamin konsantrasyonu

X : Tepkime bitiminde ortamda kalan tiyamin konsantrasyonu

$y = 0.1 \text{ mg} - X$  : yıkılan tiyamin miktarı

$(Y) \times (12.5) \times (10)$  : Yıkılan mg tiyamin / g. çay / 3 Saat

12.5 ve 10 : dilüsyon faktörleri.



III.3.2. ETKA'ne TPP'in etkisinin tayin yöntemi (15,16) :

Deneyin yapılışı :

a- Hemolizat Hazırlanışı :

Önceden tartılmış tüplere 5'er ml. heparinize kan konur. Santrifüj edilerek eritrositler paketlenir. Plazma ve buffy coat uzaklaştırılır. Paketlenmiş hücrelere eşit ağırlıkta distile su eklenir ve karıştırılarak süspande edilir. Karışım dondurulur. Hemolizi sağlamak amacıyla en az üç kez dondurulup çözülür (Hemolize edilmiş numune oda asısında birkaç saat, buzdolabında 2-3 gün, dondurulduğunda 3 ay dayanıklıdır).

b- ETKA tayini :

Her örnek için A, B, D ve R olmak üzere dört test tübü hazırlanır. Her tübün toplam hacmi 7.15 ml. dir.

A Tübü : Hemolizat içerir, TPP içermez, TPP olmaksızın ETKA'nin tayininde kullanılır.

B Tübü : Hemolizat ve TPP içerir, TPP varlığında ETKA'de meydana gelen değişimsaptamakta kullanılır.

D Tübü : Kör tübüdür ve örnekte bulunan endojen heksoz veya pentoz miktarını tayin etmekte kullanılır.

R Tübü : Yalnızca substrat içerir ve tepkimedede harcanan riboz miktarını tayin etmekte kullanılır.

Tüpler	Hemolizat	B tamponu	TPP (çal)	İnk. (38°C)	R.5P	İnk. (38°C)	TCA (% 7.5)
A	0.50	0.45	-	30'	0.20	60'	6
B	0.50	-	0.45	30'	0.20	60'	6
D	0.50	0.65	-	-	-	-	6
R	0.50 (S.F.)	0.45	-	-	0.20	-	6

TCA ile yapılan çöktürülmeden sonra herbir tüp süzülerek proteinsiz filtratlar elde edilir (Filtratlar buzdolabında 5 gün dayanıklıdır). Bu filtratlarda pentoz tayini yapılır.

c- Pentoz Tayini :

Tüp	Filtrat	Pentoz (Çalışma)	H <sub>2</sub> O(ml)	Orsinol (ml)	Kaynar su ban. (dk)	Soğuk su ban. (dk)
A,B,D	0.10	-	0.65	2.25	20'	5'
R	0.05	-	0.70	2.25	20'	5'
St <sub>2.5</sub> µg	-	0.25	0.50	2.25	20'	5'
St <sub>5</sub> µg	-	0.50	0.25	2.25	20'	5'
K	-	-	0.75	2.25	20'	5'

Çift olarak çalışılan bütün örnekler bu işlemlerden sonra spektrofloreometrede 670 nm. de okunur.

Sonuçların ifade şekli :

a) Dilüsyon faktörü :  $(1 / 0.5) \times (7.15 / 1) \times (1 / 0.1) = 143$

Kullanılan hemolizat miktarı      Her tüpteki total ml.      Kullanılan filtrat miktarı

b) SP = µg pentoz standardı başına düşen OD

2.5 µg için → Ortalama ölçüm = X<sub>1</sub>

5 µg için → Ortalama ölçüm = X<sub>2</sub>

$$SP = \frac{X_1 - X_2}{2}$$

c)  $KP = \text{sabit değer} = \text{Dilüsyon faktörü} / SP$

d)  $R = \frac{R_1 - R_2}{2}$  olarak bulunur.

$$1- \left| (2R + D) - A \right| \times KP = TP_1$$

$TP_1 =$  TPP yokken inkübasyon esnasında saatte ml. hemolizat başına kullanılan pentoz miktarı ( $\mu\text{g}$ ).

$$2- \left| (2R + D) - B \right| \times KP = TP_2$$

$TP_2 =$  TPP varlığında inkübasyon esnasında saatte ml. hemolizat başına kullanılan pentoz miktarı ( $\mu\text{g}$ ).

$$3- \% TPPE = \frac{TP_2 - TP_1}{TP_1} \times 100$$

## BÖLÜM IV

### B U L G U L A R

#### IV.1. TÜRK ÇAYLARINDA ATA TAYİN SONUÇLARI

Çayların ATA'leri optimum şartlar altında 1 g çay başına yıkılan mg tiyamin olarak ifade edilmiş ve 10 farklı Türk çayına ait ATA sonuçları Tablo V'de özetlenmiştir.

Tablodan da görüldüğü gibi 3 ve 6 nolu çayların ATA'leri diğerlerine oranla belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur. Ortalamalar arası farkın önem kontrol analizi Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır (66). 1 ile 10 no'lu ve 5 ile 7 no'lu çayların ATA ortalamaları arasındaki fark önemsiz ( $P > 0.05$ ), diğer tüm çayların ATA'lerinin ortalamaları arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

#### IV.2. DEMLEME SÜRESİNİN ÇAYIN ATA'Sİ ÜZERİNE ETKİSİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

Demleme süresinin çayın ATA'si üzerine etkisine ilişkin deneyler 6 no'lu çay numunesi ile yürütülmüş, sonuçlar Tablo VI'da, Şekil 1'de gösterilmiştir. 5, 10, 15, 30 ve 60 dak ılık demleme sürelerinin ATA üzerine etkisi, numunelerin pH 7.4'de ve 60°C de standart tiyamin ile 3 saat inkübe edilmesiyle incelenmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, 5, 10, 15 ve 30 dak demlenen çay numunelerinin ATA'lerinin optimum şartlarda değişmediği, 60 dak demlenen çay numunesinin ATA'sinin ise diğerlerine oranla yüksek olduğu gözlenmiştir.

#### IV.3. İNKÜBASYON SÜRESİNİN ÇAYIN ATA'Sİ ÜZERİNE ETKİSİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

İnkübasyon süresinin, çayın ATA'si üzerine etkisine ilişkin deneyler 6 no'lu çay numunesi ile yürütülmüş, sonuçlar Tablo VII ve Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar 5 dak demlenmiş çay numunesinin pH 7.4 de ve 60°C standart tiyamin ile sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 saat inkübasyonu ile elde edilmiştir. Tablo VIII ve Şekil 2'den de görüldüğü gibi, diğer şartlar (ısı, pH, demleme süresi) sabit tutulduğunda maksimum ATA'nin görüldüğü inkübasyon süresi 3 saat olarak saptanmıştır.

#### IV.4. pH'IN ÇAYIN ATA'Sİ ÜZERİNE ETKİSİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

Deneyler 6 no'lu çay numunesi ile yürütülmüş ve sonuçlar Tablo VIII ve Şekil 3'de gösterilmiştir. 5 dak demlenmiş çay numunesi standart tiyamin ile 60°C'de sırasıyla pH 5.5, 6.5, 7, 7.5 ve 8'de 3 saat inkübe edilmiştir. Tablo VIII ve Şekil 3'te de görüldüğü gibi, maksimum ATA pH 7.5'da gözlenmiştir.

#### IV.5. İNKÜBASYON SICAKLIĞININ ÇAYIN ATA'Sİ ÜZERİNE ETKİSİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

İnkübasyon sıcaklığının çayın ATA'si üzerine etkisine ilişkin deneyler yine 6 no'lu çay numunesi ile yürütülmüş ve sonuçlar Tablo IX ve Şekil 4'de gösterilmiştir. Sonuçlar 5 dak demlenmiş çay numunesinin pH 7.4 de sırasıyla 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C'lerde, standart tiyamin ile 3'er saat inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Tablo IX ve Şekil 4'den de görüldüğü gibi maksimum ATA'nin gözleendiği inkübasyon sıcaklığı 60°C olarak saptanmıştır.

#### IV.6. ÇAY İÇİMİNİN, ETKA'NIN TPP İLE STİMÜLASYONUNA ETKİSİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

Çay içiminin, ETKA'nin TPP ile % stimülasyonuna etkisine ilişkin sonuçlar Tablo X ve Şekil 5'de gösterilmiştir. Şekil 5'de görüldüğü gibi, 1. periyotta 5 deneğin hepsinin % TPPE değerleri % 15'den düşük bulunmuştur, bu değerler % 3-8.5 arasında değişmektedir. 2. periyotta 5 denekten 2'sinin % TPPE değerleri % 15'in altında, 1 tanesinin % 15-20 arasında, ikisinin de % 20'nin üstünde olduğu gözlenmiştir. 3. periyotta 5 deneğin % TPPE değerleri % 5-14.2 arasında bulunmuştur. Son periyotta ise deneklerin % TPPE değerlerinin % 1.8-5.4 arasında olduğu saptanmıştır. Bu değerlerin ortalamaları arası farkın önem kontrolü analizi Mann-Whitney U testi ile yapılmış, sonuçlar TabloXI'de gösterilmiştir. Deneklerin % TPPE ortalama değerlerinin periyotlara göre dağılımı incelendiğinde, çay içiminin 250 ml/gün olarak standarde edilmediği ilk periyotta ortalama % TPPE değeri  $6.160 \pm 0.927$  iken, çay yüklemesi ile ikinci periyotta bu değer  $15.060 \pm 2.827$ 'ye çıktığı gözlenmiştir. Çay + tiyamin (10 mg/gün) uygulanan üçüncü periyotta bu değer  $8.568 \pm 1.743$ 'e düşmüş, çay içiminin kesilip, yalnızca günde 10 mg tiyamin verildiği son periyotta ise ortalama % TPPE değerinin  $3.344 \pm 0.845$ 'e indiği görülmüştür.

Tablo V

(10) Türk çaylarının ATA değerleri.

(SH= Standart hata)

( n = Deney sayısı)

Çay no:	Yıkılan mg tiyamin /g. çay Ortalama $\bar{x}$ SH	n	Ortalamalar arası farkın önem kontrolü analizi
1	3.844 $\mp$ 0.122	8	<p>P &gt; 0.05      P &lt; 0.05</p>
2	2.625 $\mp$ 0.134	8	
3	5.313 $\mp$ 0.060	10	
4	3.281 $\mp$ 0.084	8	
5	2.052 $\mp$ 0.104	12	
6	4.659 $\mp$ 0.074	11	
7	1.979 $\mp$ 0.067	12	
8	3.427 $\mp$ 0.060	12	
9	4.344 $\mp$ 0.096	12	
10	3.833 $\mp$ 0.032	12	

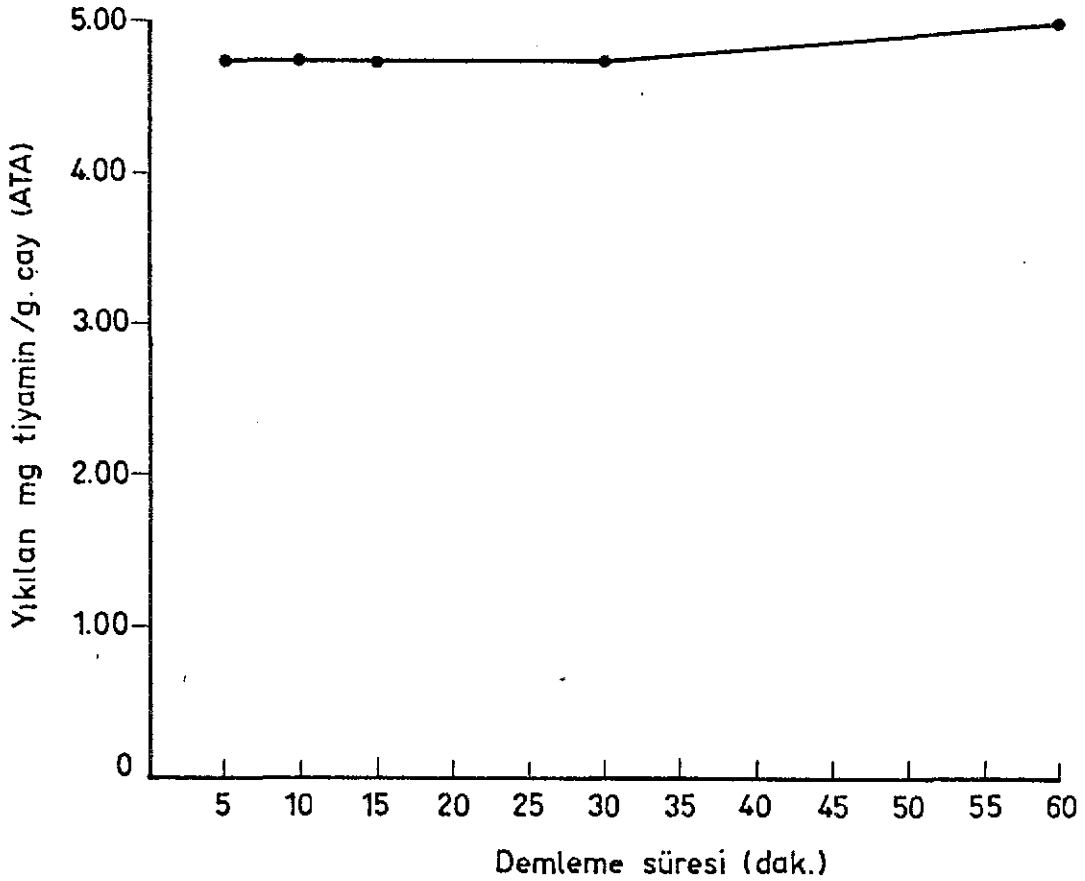
Sonuçların herbiri n tane deneyin, çift çalışmalarının ortalamasıdır.

Tablo VI

Demleme süresinin çayın ATA'si üzerine etkisi.

Demleme süresi (dakika)	5	10	15	30	60
Yıkılan mg tiyamin /g. çay	4.75	4.75	4.75	4.75	5.00

Yukarıdaki değerlerin herbiri çift olarak yürütülen altı çalışmanın ortalamasıdır.



Şekil 1: Demleme süresinin çayın ATA'si üzerine etkisi.

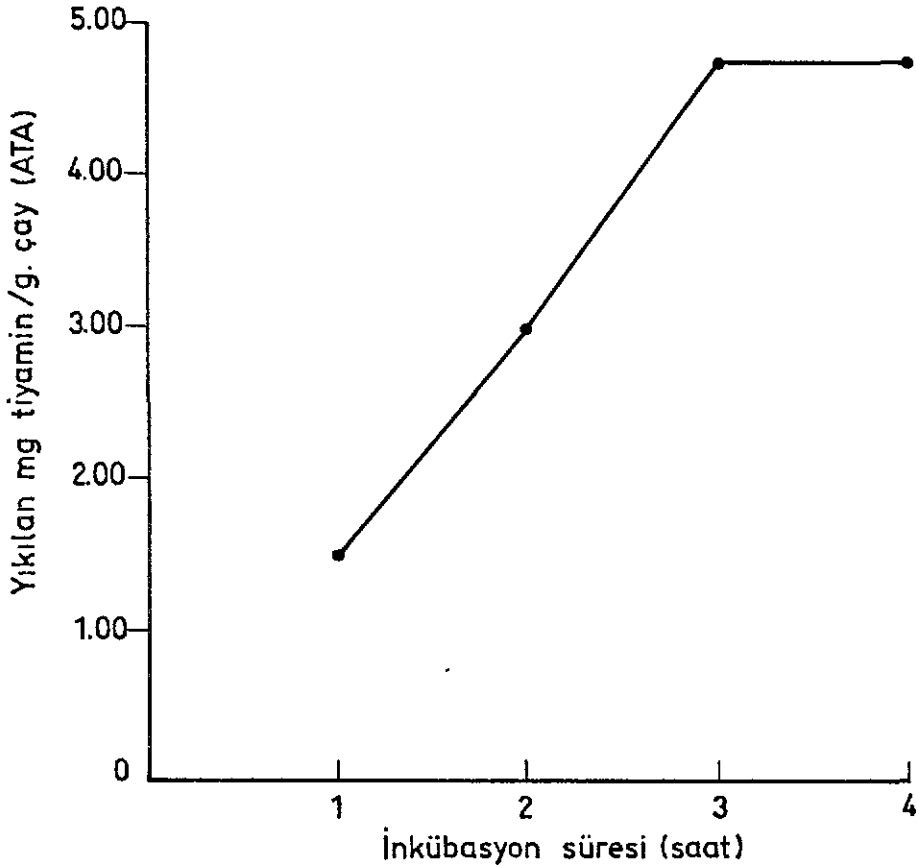


Tablo VII

İnkübasyon süresinin çayın ATA'si üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (saat)	1	2	3	4
Yıkılan mg tiyamin/g. çay	1.50	3.00	4.75	4.75

Yukarıdaki değerlerin herbiri çift olarak yürütülen altı çalışmanın ortalamasıdır.

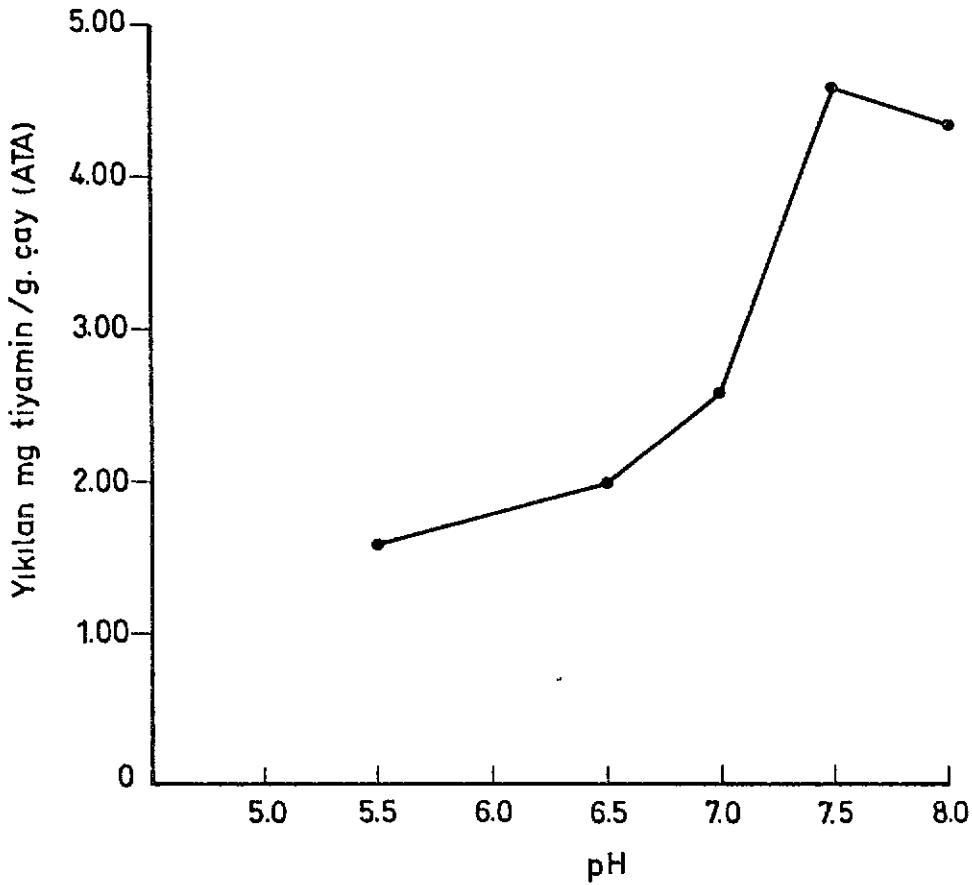


Şekil 2: İnkübasyon süresinin çayın ATA'si üzerine etkisi.

Tablo VIII  
pH'in çayın ATA'si üzerine etkisi.

pH	5.5	6.5	7	7.5	8
Yıkılan mg tiyamin /g. çay	1.58	2.00	2.58	4.62	4.33

Yukarıdaki değerlerin her biri çift olarak yürütülen altı çalışmanın ortalamasıdır.



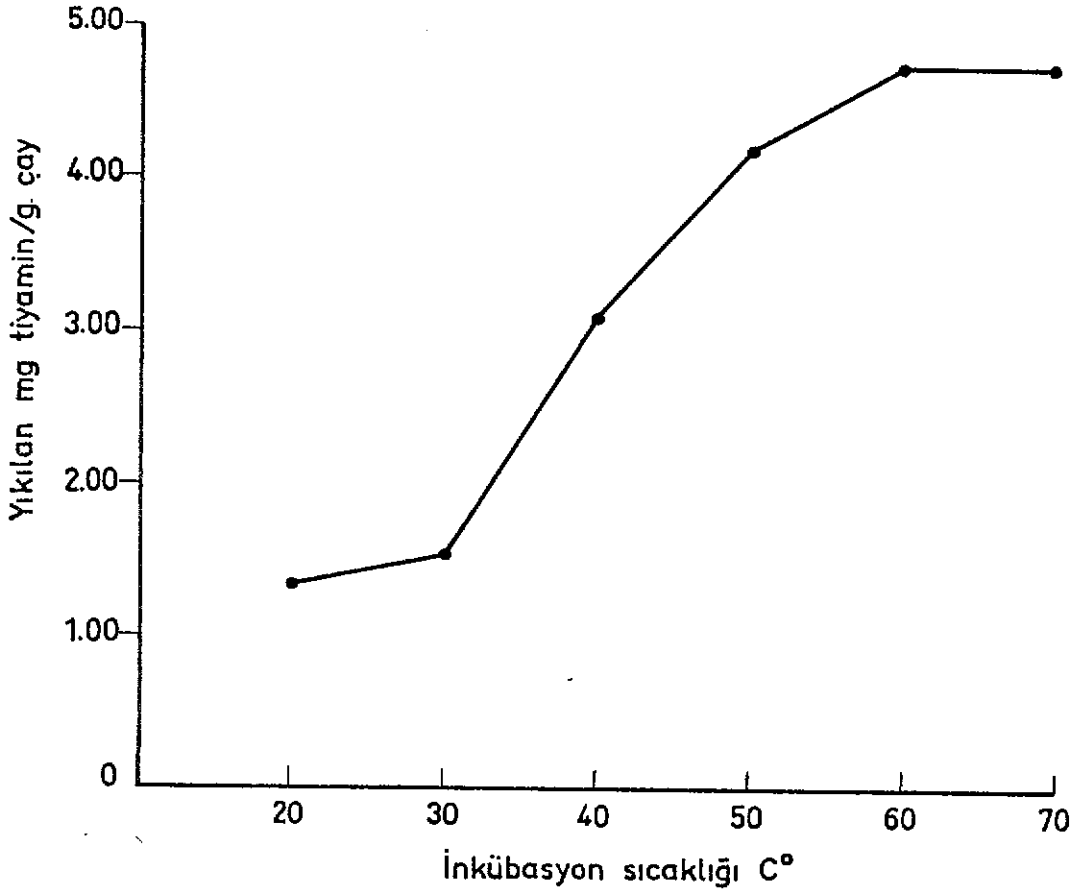
Şekil 3: pH'nın çayın ATA'si üzerine etkisi.

Tablo IX

İnkübasyon sıcaklığının çayın ATA'si üzerine etkisi.

İnkübasyon sıcaklığı C°	20	30	40	50	60	70
Yıkılan mg tiyamin /g. çay	1.33	1.54	3.08	4.20	4.75	4.75

Yukarıdaki değerlerin her biri çift olarak yürütülen üç çalışmanın ortalamasıdır.



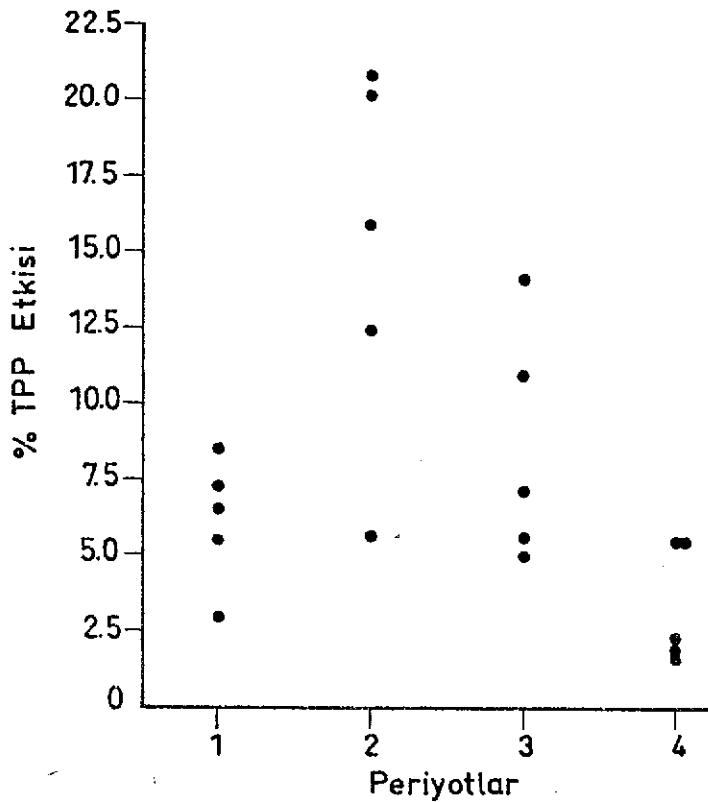
Şekil 4: İnkübasyon sıcaklığının çayın ATA'si üzerine etkisi.

Tablo X

Çay içiminin %TPPE değerleri üzerine etkisi.

Denekler Periyod (gün)	Denekler				
	N.S	G.Y	Ö.T	K.Ö	O.A
0-7	5.50	6.60	7.20	8.50	3.00
7-14	12.50	15.90	21.20	20.10	5.60
14-21	5.60	7.14	14.20	10.90	5.00
21-28	2.00	2.10	5.42	5.40	1.80

Yukarıdaki değerlerin herbiri paralel olarak yürütülen ikişer çalışmanın ortalamasıdır.



Şekil 5: Deneklerin % TPPE değerlerinin periyotlara göre dağılımı.

Tablo XI

Çay içiminin ETKA'nin TPP ile stimülasyonuna etkisi.

Süre	Uygulama	Kanın alındığı gün	% TPPE (Ort $\pm$ SH)	p değeri
0 - 7 gün	Çay içiminde standardizasyon (250 ml çay/gün)	7.	6.160 $\pm$ 0.927	P < 0.05
7 - 14 gün	Çay ( 1lt /gün)	14.	15.060 $\pm$ 2.827	
14 - 21 gün	Çay + 10 mg tiyamin/gün	21.	8.568 $\pm$ 1.743	
21 - 28 gün	10 mg tiyamin / gün	28.	3.344 $\pm$ 0.845	

Sonuçların herbiri 5 deneğin, çift çalışmalarının ortalamasıdır.

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA ve SONUÇ

#### V.1. UYGULANAN YÖNTEMLERE İLİŞKİN TARTIŞMA

Türk çaylarının ATA'lerini ve çay içiminin, ETKA'si üzerine etkisini ölçmek amacıyla uygulanan yöntemler seçilirken, bu yöntemlerin mevcut laboratuvar olanakları ile yapılabilir, duyarlı, ekonomik ve güvenilir olmalarına özen gösterilmiştir.

ATA tayininde çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte (3,53,55,57, 59-62), bizim kullandığımız "Tiyokrom yöntemi" (3), özellikle in vitro şartlarda ATA gösteren bileşiklerin varlığında yıkılan tiyamin miktarını saptamakta tercih edilen spektrofotometrik bir yöntemdir. Bu yöntemde tiyamin, ferrisiyanür ile tiyokrom'a oksitlenip oluşan mavi fluoresans ölçülmektedir. Yöntem kolay, ucuz, güvenilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle çalışmamızda tercih edilmiştir.

Tiyamin eksikliğinin biyokimyasal tesbitinde kullandığımız ETKA'sinin TPP ile stimülasyonu esasına dayanan yöntem (3,4,15,16,25,63,64), özellikle insanda tiyamin eksikliğinin özgül olarak saptanmasında en fazla tercih edilen kolorimetrik bir yöntemdir. Avantajları arasında tiyamin eksikliğinin klinik tanısı açısından son derece özgül olmasını, diğer plasma enzimlerindeki değişikliklerden etkilenmemesini, hem ETKA'sini, hem de TPPE'ni aynı anda gösterebilmesini, kolay ve güvenilir olmasını sayabiliriz (15).

## V.2. TÜRK ÇAYLARININ ATA BULGULARINA İLİŞKİN TARTIŞMA

Birçok yeşil bitkinin çeşitli yapılarda ısıya dayanıklı antitiamin aktiviteye sahip maddeler içerdiği, özellikle polihidroksifenolik yapıdaki bu bileşiklerin tiaminin tiyazol halkasını açarak vitamini inaktif forma dönüştürdüğü bilinmektedir (5,6,10,37,39).

Yapılan çalışmalar çay ve fermente çay yapraklarında da ATA'ye sahip polihidroksifenolik yapıda bileşiklerin bulunduğunu göstermiştir (5,6,9,11, 38). Yoo ve Hilker (8), 10 çeşit Kore çayını ATA açısından incelemişler ve tiamin yetersizliğinin yaygın olarak gözleendiği Kore'de içilen bitkisel çayların hemen hepsinde ATA'ye sahip bileşikler bulunduğunu bildirmişlerdir. Hilker ve diğ. (11) çayın ATA'sinin 60°C'de ve pH 7.5'da 3 saat inkübasyon sonucu ortaya çıktığını inceledikleri çayların hepsinde ATA bulunduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacıların bazıları çayın ATA'sinin tanen içeriği ile ilişkili olduğunu bildirirken (6,11,40), bazıları da çaydaki ATA'nin yalnızca tanenden kaynaklanmayıp bitkide bulunan diğer bazı fenolik yapıdaki bileşiklerin de ATA gösterdiklerini öne sürmüşlerdir (8,9,38,47).

Ülkemizde çay içimi yaygın olduğu, özellikle uzun süre demlenmiş çay kullanıldığı, ayrıca besinlerle birlikte çay içme alışkanlığı bulunduğu halde, bugüne kadar Türk çaylarında ATA'nin varlığı henüz gösterilmemiştir. Bu noktadan çıkarak ve yukarıda sözü edilen verilere dayanarak bu çalışmada Türk çaylarının ATA'leri incelenmiş, kullanılan çayların cinslerinin ve demlenme sürelerinin bu aktiviteye etkileri araştırılmıştır. Tablo V'deki bulgulardan da anlaşıldığı gibi incelenen 10 Türk çayının hepsinde ATA bulunmuştur ve en yüksek aktivite 3 ve 6 nolu çaylarda gözlenmiştir. Bu bulgularımızı bugüne kadar incelenen diğer bazı ülkelerin çaylarının bulgularıyla (8,11) karşılaştır-

dığımızda, Türk çaylarının ATA'lerinin, diğer ülkelerinkine nazaran daha yüksek olmadığını görmekteyiz. Nitekim ülkemizde en yaygın kullanımı olan 6 no'lu çayın optimum şartlar altında g çay başına 4.659mg tiyamini yıkan bir ATA'ye sahip oluşu dikkat çekicidir.

Ayrıca ATA'nin şiddetinin, bu aktiviteye sahip bileşiklerin yemeklerden sonra alınma süreleri ile yakından ilişkili olduğu; ATA'ye sahip bileşiklerin, özellikle çayın, yemeklerden hemen sonra alınması halinde vücut tiyamin düzeyinin belirgin şekilde düştüğü bildirilmektedir. Çay içimi yemeklerden yarım saat ve daha sonraya geciktirildiğinde ise tiyamin düzeyi değişmektedir (5). Bu bilgiler ışığında ve Türk toplumunda yemekle birlikte veya yemekten hemen sonra çay içme alışkanlığının yaygın olduğu gözönüne alındığında Türk çaylarında saptadığımız ATA'nin daha da etkin olabileceği düşünülebilir.

### V.3. DEMLEME SÜRESİNİN ATA ÜZERİNE ETKİSİNE İLİŞKİN TARTIŞMA

Çayların ATA'lerinin incelenmesi amacıyla bugüne kadar yapılan çalışmalarda çayların tüketildiği ülkelerin çay içme alışkanlıklarına bağlı olarak, demleme süreleri genellikle 5 dakika gibi kısa bir süre ile sınırlı tutulmuştur (8,11).

Ancak çay demleme süresinin ülkemizde 15 ile 60 dakika arasında değiştiği gözönüne alınarak, 5 dakikayı aşan demleme sürelerinin çayın ATA'si üzerine etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Bu çalışmada incelediğimiz çay numuneleri içinde en yüksek ATA'ye sahip olan 3 ve 6 no'lu çaylardan 6 no'lu numune, ülkemizde en yaygın kullanıma sahip olması nedeniyle tercih edilmiştir. Tablo VI ve Şekil 1 bulgularımızdan da anlaşılacağı gibi, çayın ATA'si 5, 10, 15 ve 30 dakikalık demleme süreleri ile değişmemekte, ancak 60 dakikalık



demleme süresinde bu aktivjete bir miktar artmaktadır. Buna dayanarak Türk çaylarının ATA gösterebilmeleri için 5 dakikalık bir demleme süresinin yeterli olabileceği ve daha uzun süreli demlemelerin ATA'yi değiştirmeyeceği söylenebilir.

#### V.4. İNKÜBASYON SÜRESİ, İNKÜBASYON SICAKLIĞI VE pH'IN ATA'YE ETKİSİNE İLİŞKİN TARTIŞMA

Çeşitli çayların ATA'sinin inkübasyon süresi ile değiştiği ve en yüksek ATA'nin 3 saatlik inkübasyon süresinde gözleendiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmekle birlikte (11,40), biz çalışmamızda 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon sürelerinin, Türk çaylarının ATA'sini ne ölçüde değiştirdiğini incelemeyi uygun bulduk. Tablo VI ve Şekil 2'den de anlaşılacağı gibi en yüksek ATA 3 saatlik inkübasyon süresinde gözlenmektedir. Bu bulgumuz, literatürde bildirilen optimum inkübasyon süresi bulgularıyla uygunluk göstermektedir.

Inkübasyon sıcaklığının Türk çaylarının ATA'si üzerindeki etkisine ilişkin sonuçlarımız Tablo IX ve Şekil 4'de özetlenmiştir. Bunlardan da görüleceği gibi en yüksek ATA diğer şartlar sabit tutulduğunda, 60°C'de ortaya çıkmakta, bu bulgumuz literatürde bu konuda bildirilen bulgulara uymaktadır (6,11,65).

ATA'ye sahip polifenolik bileşiklerle tiyamin arasındaki tepkimenin pH ile yakından ilişkili olduğu ve en yüksek ATA'nin pH 7.5 da gözleendiği bilindiğinden (9,11,40,65) çalışmamızda pH 5.5, 6.5, 7, 7.5 ve 8 de Türk çaylarının ATA'lerindeki değişme de incelenmiş ve Tablo VIII ve Şekil 3'den de görüleceği gibi, ATA pH 7'ye kadar doğrusal bir biçimde artarak pH 7.5'da en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu bulgularımızda literatürdeki ilgili bulgulara uygunluk göstermektedir.

#### V.5. ÇAY İÇİMİNİN ETKİSİNİN TPP İLE STİMÜLASYONUNA ETKİSİNE İLİŞKİN TARTIŞMA

ATA'ye sahip bileşikler içerdiği bilinen bazı besinlerle (çay, fermente çay, kahve, eğreltiotu, betel nut gibi bitkisel, fermente çiğ balık gibi hayvansal) beslenmenin yaygın olduğu Kore, Tayland, Filipinler gibi Uzakdoğu ülkelerinde, tiyamin eksikliğine bağlı olarak gelişen "beriberi" halen sıklıkla görülmektedir (5,8,10,39). Ülkemizde tiyamin eksikliği veya beriberinin görülme oranı ve derecesi hakkında yayınlanmış detaylı bir bilgi bulunmadığından ve çay içimi Türk toplumunda yaygın olduğundan çalışmamızda çay içiminin Türk toplumunun tiyamin düzeyine etkisini de araştırmayı uygun bulduk.

Bu araştırmanın sonuçları Tablo X, Tablo XI ve Şekil 5'de gösterilmiştir. Diyetleri ve çay içimleri standardize edilen deney grubu, çay ve tiyamin açısından 4 farklı uygulamaya tabi tutulmuş, bulgulardan da görüleceği gibi uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Günde 1 lt çay içiminin uygulandığı bir haftalık period sonunda (7-14 gün) ortalama % TPPE değeri  $6.160 \pm 0.927$ 'den  $15.060 \pm 2.827$ 'ye çıkmıştır. Bu değer tiyamin eksikliğinin göstergesi olarak ele alındığında sınırda bir değer olmakla birlikte, deneklerin % TPPE değerleri tek tek incelendiğinde, 5 denekten ikisinde ciddi tiyamin yetmezliği görülmüştür. Günde 1 lt çay ve 10 mg tiyamin uygulamasının yapıldığı üçüncü periodda ortalama % TPPE değeri  $8.568 \pm 1.743$ 'e düşmüş; çay içiminin tamamen kesilip günde 10 mg tiyamin verildiği son periodda ise bu değer  $3.344 \pm 0.845$ 'e kadar indiği gözlenmiştir. Bu bulgulardan da anlaşılacağı gibi günde 1 lt çay içimi vücut tiyamin düzeyini belirgin şekilde düşürmekte, vitamin ilavesi ile bu düzey normale dönebilmektedir. Bu bulgularımız literatürde bildirilen sonuçlara da uygunluk göstermektedir (7,17,44,63).

## V.6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmaların ışığında söyleyebiliriz ki, piyasada bulunan 10 farklı Türk çayının hepsi ATA'ye sahip bulunmaktadır ve bunlardan en yüksek ATA'ye sahip çaylardan biri de Türk toplumunda en yaygın olarak kullanılan çaydır.

Günde 1 lt (yaklaşık 10 bardak) çay içiminin insanda tiyamin düzeyini belirgin şekilde düşürdüğü, yemeklerden hemen sonra içilen çayın bu düzeyi daha da azalttığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (5). Türk toplumunda çay içimi genellikle yaygın olup bazı yörelerde günde içilen çay miktarı 1 lt'yi aşmaktadır. Ayrıca toplumumuzda yemeklerden hemen sonra ve hatta yemeklerle birlikte çay içme alışkanlığı bulunduğu için yukarıda sözedilen çaya bağlı tiyamin yetmezliği riski daha da artmaktadır. Nitekim araştırmamız sonucunda çay yüklemesi ile tiyamin düzeylerinin deney grubunda hızla düşüp yetmezlik sınırına ulaştığını gözlemiş bulunmaktayız.

Bulgularımız Türk çaylarının ATA'ye sahip olduğunu, çay içiminin yaygın olduğu toplumumuzda yoğun içime bağlı olarak tiyamin yetmezliği görülebildiğini ortaya koymakla birlikte, araştırmamızın sınırlı sayıda denekle yürütülmüş olmasını gözönüne alarak, konunun Türkiye'nin farklı yörelerinde daha geniş gruplarla ve daha detaylı olarak araştırılması gerektiğini öngörmekteyiz. Ayrıca Türk çaylarındaki ATA'den sorumlu olan bileşiklerin, bu bileşiklerin yapılarının ve ATA'ye katkı oranlarının araştırılmasının konuya ışık tutacağı kanısındayız. Çalışmamız, yukarıda sözü edilen konuların aydınlatılmasına yönelik bir ön araştırma niteliğindedir.

## Ö Z E T

Birçok yeşil bitkide, özellikle çayda, enzimatik olmayan, ısıya dayanıklı antitiamin özellikte maddelerin varlığı 1946'dan beri bilinmekte; çay içiminin yaygın olduğu bazı Uzakdoğu ülkelerinde halen bu alışkanlığa bağlı olarak ciddi tiyamin yetmezliği görüldüğü bildirilmektedir.

Çay içiminin yaygın olduğu ülkemizde Türk çaylarının ATA'leri ve çaydan kaynaklanan tiyamin yetmezliği bugüne kadar araştırılmadığından bu çalışmada Türk çaylarının ATA'leri, bu aktiviteyi etkileyen bazı faktörler ve çay içimine bağlı olarak ortaya çıkabilecek tiyamin yetmezliği araştırılmıştır.

Bulgularımız Türk çaylarının oldukça yüksek ATA'ye sahip olduğunu, denenen 10 farklı Türk çayından 3 ve 6 no'lu çay örneklerindeki ATA'nin diğerlerine nazaran daha yüksek bulunduğunu göstermiştir. Ancak Türk toplumunda yaygın kullanımı olması sebebiyle daha sonraki araştırmalar 6 no'lu örneklerle yapılmış, günde 1 lt (yaklaşık 10 çay bardağı) çay içiminin, vücut tiyamin düzeyini belirgin şekilde düşürdüğü saptanmıştır.

## S U M M A R Y

The existence of non-enzymatic thermostable antithiamine factors in green plants, particularly in teas, have been known since 1946 and it has been reported that severe thiamine deficiency, resulted from the habit of tea consumption, is still common in some Far east countries.

Since the ATA of Turkish teas and thiamine deficiency resulted from tea consumption were not been examined in our country in which tea drinking is common, in this study antithiamine activities of Turkish teas, some factors effecting this activity and thiamine deficiency which might be related to tea consumption were investigated.

Our data shows that Turkish teas have significantly high ATA and two of the ten different Turkish teas, which were investigated, have higher ATA than the others. Since the 6<sup>th</sup> sample is consumed widely in Turkey, further experiments were conducted on the 6<sup>th</sup> sample. Also 1 lt of daily tea drinking (approximately 10 glasses of tea) causes a significant decrease in body thiamine level.

## K I S A L T M A L A R

AMP	:	Adenosin monofosfat
ATA	:	Antitiyamin aktivite
ATP	:	Adenosin trifosfat
ETK	:	Eritrosit tansketolaz
ETKA	:	Eritrosit transketolaz aktivitesi
KoA	:	Koenzim A
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADP	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
TPP	:	Tiyaminpirofosfat
TPPE	:	Tiyaminpirofasfat etkisi

## K A Y N A K L A R

1. Florkin, M. ve Stotz, E.H., "Thiamin", Steyn-Parve, E.P. (ed),  
Comprehensive Biochemistry, Amsterdam, London, N.Y., Elsevier  
Publishing Company, vol. 11, 3-21 (1963).
2. Sebrell, W.H. Jr. ve Harris, R.S., "Thiamin", The Vitamine, New York,  
London; Academic Press, vol. 5, 97-164 (1972).
3. Davis, R.E. ve Lcke, G.C., Clinical Chemistry of Thiamin, Adv. Clin. Chem.,  
23, 93-130 (1983).
4. Sauberlich, H.E., Biochemical alterations in thiamine deficiency and their  
interpretation, Am. J. Clin. Nutr., 20 (6), 528-42 (1967).
5. Vimokesant, S., Kunjara, S., Rungruangsak, K., Nakarnchai, S. ve Panijpan,  
B., Beriberi caused by antithiamin factors in food and its prevention,  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 378, 123-37 (1982).
6. Hilker, D.M. ve Somogyi, J.C., Antithiamine of plant origin : their  
chemical nature and mode of action, Ann. N.Y. Acad. Sci., 378, 137-45  
(1982).

7. Vimokesant, S.L., Nakurnchai, S., Dhanamitta, S. ve Hilker, D.M., Effect of tea consumption on thiamin status in man, *Nutr. Rep. Int.*, 9(5), 371-76 (1974).
8. Yoo, Y.J. ve Hilker, D.M., A study on the antithiamin effects of Korean teas, *Kor. J. Nutr.*, 12(3), 33-9 (1979).
9. Murata, K., Tanaka, R. ve Masako, Y., Reaction mechanisms of thiamin with thermostable factors, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 20, 351-62 (1974).
10. Weswing, P.H., Freed, A.M. ve Haag, J.R., Antithiamine activity of plant materials, *J. Biol. Chem.*, 165, 737-38 (1946).
11. Hilker, D.M., King-cham, C., Chen, R. ve Smith, A., Antithiamine effects of tea, I. temperature and pH dependence, *Nutr. Rep. Int.*, 4(4), 223-27 (1971).
12. White, A., Handler, P. ve Smith, E.L. "Principles of Biochemistry", New York, St. Louis, San Francisco, Mc Graw-Hill Book Company, 1152 (1973).
13. Lehninger, A.L., "Principles of Biochemistry", New York, Worth Publishers Inc., 252-54 (1982).
14. Bhagavan, N.V., "Biochemistry", Philadelphia, Toronto, W.B. Lippincott Company, 723 (1973).



15. Mc Cormick, D.B. ve Wright, D.S., "Thiamine : phosphates and analogs 23: Transketolase and the TPP effect in assessing thiamin adequency", Methods in Enzymology, N.Y., London, Academic Press, vol. 18 (1970).
16. Dreyfus, P.M., Clinical application of blood transketolase determinations, N. Engl. J. Med., 267(12), 596-98 (1962).
17. Brin, M., Tai, M., Obtashever, A.S. ve Kalnsky, H., The effect of thiamine deficiency on the activity of erythrocyte hemolysate transketolase, J. Nutr., 71, 273-80 (1960).
18. Dancy, M. ve Evans, G., Blood thiamine and thiamine phosphate ester concentrations in alcoholic and non-alcoholic liver diseases, Br. Med. J. (Clin. Res.), 289(6437), 79-82 (1984).
19. Volpe, J.J. ve Marasa, J.C., A role for thiamine in the regulation of fatty acid and cholesterol biosynthesis in cultured cells of neural origin, J. Neurochem., 3, 975-81 (1978).
20. Chakrabarti, C.H. ve Pandit, V.L., Influence of thiamine on protein biosynthesis, J. Vitaminol., 15, 211-14 (1969).
21. Baba, A. ve Matsuda, T., Possible regulation of thiamin triphosphatase activity in rat brain microsomes by lipids, Biochim. Biophys. Acta., 482, 71-8 (1977).
22. Sklan, D. ve Trostler, N., Site and extend of thiamin absorption in the rat, J. Nutr., 107, 353-56 (1977).

23. Tomasula, P.A., Kater, R.M.H. ve Iber, F.L., Impairment of thiamin absorption in alcoholism, *Am. J. Clin. Nutr.*, 21(11), 1340-44 (1968).
24. Barchi, R.L. ve Braun, P.E., A membrane-associated thiamine triphosphatase from rat brain, *J. Biol. Chem.*, 247, 7668-73 (1972).
25. Briggs, M.H., "Vitamins in Human Biology and Medicine", Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 8-11 (1981).
26. Koatinge, A.M., Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> and C status in the elderly, *Ir. Med. J.*, 76(12), 488-90 (1983).
27. Bitsch, R., Thiamin metabolism in the rat during longterm alcohol administration, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 52(3), 253-59 (1982).
28. Victor, M., Deficiency diseases of the nervous system secondary to alcoholism, *Postgrad. Med.*, 50, 75-9 (1971).
29. Thomson, A. ve Baker, H., Thiamine absorption in alcoholism, *Am. J. Clin. Nutr.*, 21, 537-38 (1968).
30. Abe, T. ve Hokawa, Y., Effect of ethanol administration on thiamine metabolism and transketolase activity in rats, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 47, 307-14 (1977).
31. Read, D.J.C., The aetiology of the sudden infant death syndrome : current ideas on breathing and sleep and possible links to deranged thiamin neurochemistry, *Aust. N.Z. J. Med.*, 8, 322-36 (1978).

32. Waswani, K., Effect of neonatal thiamine and vitamin A deficiency on rat brain gangliosides, *Life Sci.*, 37, 1107-15 (1985).
33. Roecklein, B., Levin, S., Comly, M. ve Mukherjee, A.B., Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriethiamine during pregnancy in the rat, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 151(4), 455-60 (1985).
34. Cogan, D., Witt, E. ve Goldman, P., Ocular signs in thiamine deficient monkeys and in Wernicke's disease in humans, *Arch. Ophthalmol.*, 103, 1212-20 (1985).
35. Genlert, D.R., Morey, W.A. ve Wamsley, J.K., Alterations in muscarinic cholinergic receptor densities induced by thiamine deficiency, *J. Neur. Res.*, 13, 443-52 (1985).
36. Parker, W.D., Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency, *Neurology*, 34, 1477-81 (1984).
37. Beruter, J. ve Somogyi, J.C., 3,4 dihydroxycinnamic acid, an antithiamine factor of fern, *Experientia*, 23(12), 996-97 (1967).
38. Somogyi, J.C. ve Bönicke, R., Connection between chemical structure and antithiamine activity of various phenol derivatives, *Internat. J. Vit. Res.*, 39(1), 65-73 (1969).
39. Kundig, H. ve Somogyi, J.C., Antithiamine wirkstoffe in pflanzlichen nahrungsmitteln, *Int. J. Vit. Res.*, 34, 135-41 (1974).

40. Panijpan, B., Vilartsakdanon, P. ve Vimokesant, S.L., Resolution of the initial phase controversy in the thiamine-polyphenol reaction, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 48, 262-67 (1978).
41. Ratanaubolchai, K. ve Pikulkarntalert, S., A comparison of three reagents in converting thiamine to thiochrome in the presence of plant extracts and polyphenols, *Experientia*, 36, 825-26 (1980).
42. Schaller, K. ve Höller, H., Thiamin absorption in the rat. IV. effects of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) upon absorption and active transport of thiamin, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 46, 143-47 (1978).
43. Sarker, L., De, B.K. ve Chaudhuri, D.K., Nutritional studies of 3,5 dimethoxy salicylic acid on rats as well as on the growth of *S. aureus*, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 46, 412-16 (1976).
44. Buhr, S. ve Hilker, D., The effect of tea consumption on the thiamine status of human subjects, *Fed. Proc.*, 35, 443 (1976).
45. Somogyi, J.C. ve Nögeli, U., Antithiamine effect of coffee, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 46, 149-53 (1976).
46. Leveille, G.A., Modified thiochrome procedure for the determination of urinary thiamin, *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 273-74 (1972).
47. Hilker, D.M., Antithiamin factors in blueberries, *Internat. J. Vit. Res.*, 38, 387-91 (1968).

48. Rungruansak, K., Tosukhowong, P., Panijpan, B. ve Vimokesant, S.L.,  
Chemical interactions between thiamin and tannic acid, II. Kinetics,  
oxygen dependence and inhibition by ascorbic acid, *Am. J. Clin. Nutr.*,  
30, 1680-85 (1977).
49. Vimokesant, S.L. ve Hilker, D.M., Effect of betel nut and fermented fish  
on the thiamin status of northeastern Thais, *Am. J. Clin. Nutr.*, 28,  
1458-63 (1975).
50. Evans, W.C., Thiaminases and their effects on animals, *Vitamins and  
Hormones*, 33, 467-501 (1975).
51. Murata, K., Actions of two types of thiaminase on thiamin and its  
analogues, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 378, 146-56 (1982).
52. Murata, K. ve Ebata, J., The action of bacterial thiaminase I on thiamin.  
II. A decomposition product of thiamin, pyrimidinyl-nicotinic acid,  
*J. Vitaminol.*, 14 (1), 12-20 (1968).
53. Munson, P.L., Diozfalusy, E., Glover, J. ve Olson, R.E., "Vitamins and  
Hormones", San Francisco, London, Academic Press, vol. 33 (1975).
54. Shutz, A.L. ve Natelson, S., Studies on the distribution and concentration  
of thiamine in blood and urine, *Microchem. J.*, 17, 109-18 (1972).
55. Gupta, V.D. ve Cadwallader, D.E., Acid method for the analysis of thiamine,  
*J. Pharm. Sci.*, 57, 112-16 (1968).

56. Pearson, W.H., Biochemical appraisal of vitamin nutritional status in man, *JAMA*, 180, 49-55 (1962).
57. Bican-Fister, T., Drain, V., Quantitative analysis of water soluble vitamins in multi-component pharmaceutical forms, *J. Chromatogr.*, 77, 389-95 (1973).
58. Parkhomenko, J.M., Rybina, A.A., "Separation of thiamine phosphoric esters on sephadex cation exchanger", Mc Cormick, D.B., Wright, L.D., (ed), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, vol. 62, 59 (1979).
59. Roser, R.L. ve Andrist, A.H., Determination of urinary thiamine by high pressure liquid chromatography utilizing the thiochrome fluorescent method, *J. Chromatogr.*, 146, 43-53 (1978).
60. Ishi, K. ve Sarai, K., Analysis of thiamine and its phosphate esters by high performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 97, 191-95 (1979).
61. Kimura, M. ve Fujita, T., Differential fluorometric determination of picogram levels of thiamine monophosphate, diphosphate and triphosphate using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 188, 417-19 (1980).
62. Panjipan, H. ve Detkriangkraikun, P., High voltage paper electrophoresis as an alternative method for thiamin determination in the presence of substances capable of interfering with thiochrome formation, *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 723-25 (1979).

63. Knight, M.K., Waring, P.P. ve Skala, J.H., Assessment of thiamin status of rats using erythrocyte transketolase activity, Fed. Proc., 35, 443 (1976).
64. Kuriyama, M., Blood vit B<sub>1</sub> transketolase and thiamine pyrophosphate (TPP) effect in beriberi patients with studies employing discriminant analysis, Clin. Chim. Acta., 108(2), 159-68 (1980).
65. Davis, J.S. ve Somogyi, J.C., Reaction mechanism of the inactivation of thiamine by 3,4-dihydroxycinnamic acid, Internat. J. Vit. Res., 39, 401-6 (1969).
66. Sümbüloğlu, K., Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik, ağ Matbaası, Ankara (1978).

## Ö Z G E Ç M İ Ş

1962 yılında İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi İstanbul'da, orta ve lise öğrenimimi Ankara'da tamamladım. 1979-1983 döneminde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldum. 1984 yılında aynı fakültenin Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmalarına başladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.



