



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇÖZÜNÜR SİYAH ÇAYIN HEPATOSİT
HÜCRE SERİLERİNDE (HepG2)
PARAOKSONAZ-1 EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hamed HAJIZADEH TEKMEH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON-2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇÖZÜNÜR SİYAH ÇAYIN HEPATOSİT
HÜCRE SERİLERİNDE (HepG2)
PARAOKSONAZ-1 EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hamed HAJIZADEH TEKMEH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON-2015

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hamed HAJIZADEH TEKMEH'in hazırladığı **“Çözünür Siyah Çayın Hepatosit Hücre Serilerinde (HepG2) Paraoksonaz-1 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Birgül KURAL

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Asım ÖREM

Prof. Dr. Birgül KURAL

Yrd. Doç. Dr. Meltem MALKOÇ

Tarih: .../.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 08.05.2015

Hamed HAJIZADEH TEKMEH

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Birgül KURAL’a

Yüksek lisans eğitimimde büyük ve sayısız emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE’ye, Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN’a ve öğretim üyesi olan Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN’a,

110G028 kodlu “Fonksiyonel İntant Çay Gelştirmesi ve Sağlık Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” isimli projeden elde edilen instant (Çözünür Siyah Çay) çayı temin eden Doç. Dr. Cesarettin ALASALVAR’a, ve çözünür siyah çayı bize getirmede yardımcı olan Dr. Buket AKCAN ALTINKAYNAK’a.

GATA Kanser Kök Hücre ve Tıbbi Araştırma Laboratuvarı’ndan Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ferit AVCI’ya,

Biyokimya Anabilim Dalı’ndaki başta Dr. Selim DEMİR’e, Arş. Gör. Diler US ALTAY’a, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN’a, Arş. Gör. Sevil KÖR’e ve tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Her zaman bana destek olan, her türlü fedakârlığı ve sabrı gösteren anneme, babama ve kardeşlerime en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Hamed HAJIZADEH TEKMEH

Bu tez 13082 kodlu “Çözünür Siyah Çayın Hepatosit Hücre Serilerinde (HepG2) Paraoksonaz Ekspresyonuna Etkisi” adlı KTÜ BAP tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. ÇAY (<i>Camellia Sinensis</i>)	5
4.1.1. Çay Bitkisi ve Bileşimi	5
4.1.2. İşlem Farklılığına Göre Çay Tipleri	6
4.1.3. <i>Camellia Sinensis</i> Çaylarının Önemli Bileşenleri ve Biyolojik Özellikleri	7
4.1.4. Siyah Çay ve Çözünür Siyah Çay	12
4.1.4.1. Siyah Çay	12
4.1.4.2. Çözünür Siyah Çay	12
4.2. Lipoproteinler	14
4.3. HDL ve Apolipoprotein A-I (Apo A-I)	16
4.3.1. HDL	16
4.3.2. Apo A-I	22
4.4. Paraoksonaz (PON)	24
4.4.1. Paraoksonaz-1 (PON1)	24
4.4.2. Paraoksonaz 2 ve 3 (PON2 ve PON3)	26
5. GEREÇ ve YÖNTEM	27
5.1. Gereç	27
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	27

5.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
5.2.	Yöntem	30
5.2.1.	Çözünür Siyah Çay ve Kontrol Numunelerinin Hazırlanması	30
5.2.2.	Hücre Kültürü	31
5.2.2.1.	Hücrelerin Hazırlanması	31
5.2.2.2.	HepG2 Hücre serilerinin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması	32
5.2.2.3.	Sitotoksosite Deneyleri	33
5.2.3.	PON1 Gen Ekspresyonu	34
5.2.3.1.	Total RNA İzolasyonu	35
5.2.3.2.	cDNA Sentezi	36
5.2.3.3.	Gerçek Zamanlı PCR	37
5.2.4.	PON1 Aktivitelerinin Tayini	39
5.2.4.1.	HepG2 Hücre Lizatı Hazırlanması	40
5.2.4.2.	Paraoksonaz Aktivitesi Tayini	40
5.2.4.3.	Laktonaz Aktivitesi Tayini	42
5.2.5.	Apo A-I Tayini	44
5.2.6.	Protein tayini	45
5.3.	İstatistiksel Analizler	47
6.	BULGULAR	48
6.1.	Sitotoksosite Sonuçları	48
6.2.	Çözünür Siyah Çayın PON1 Gen Ekspresyonlarına Etkisi	48
6.3.	Çözünür Siyah Çayın PON1 Paraoksonaz ve Laktonaz Aktivitelerine Etkisi	50
6.4.	Çözünür Siyah Çayın Apolipoprotein A-I Düzeylerine Etkisi	52
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	54
8.	KAYNAKLAR	61
9.	ÖZGEÇMİŞ	72

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Çözünür siyah çayın ortalama içerikleri (100 g çözünür çay)	14
Tablo 2.	Lipoproteinlerin yapısal özellikleri	15
Tablo 3.	HDL’de bulunan proteinler	18
Tablo 4.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri, kodları ve üretici firmaları	27
Tablo 5.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, formülleri, ürün kodları ve üretici firmaları	29
Tablo 6.	Çözünür siyah çayın içinde bulunanlar	30
Tablo 7.	cDNA sentezi reaksiyon karışımı	36
Tablo 8.	Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon karışımı	37
Tablo 9.	RT-PCR protokolü	38
Tablo 10.	Paraoksonaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı	41
Tablo 11.	Laktonaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı	43
Tablo 12.	Protein tayini (Bradford) deney basamakları	46
Tablo 13.	HepG2 hücrelerinde % canlılık sonuçları (n=3)	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Çay bitkisi (<i>Camellia Sinensis</i>) filizleri	5
Şekil 2.	Farklı çay tiplerinin işleme süreçleri	6
Şekil 3.	Kateşinlerin antioksidan etkisi	9
Şekil 4.	Çay polifenollerinin hücresel etkilerini öneren model	9
Şekil 5.	Enzim katalizli teaflavin oluşumu	11
Şekil 6.	Çözünür siyah çay üretim aşamaları	13
Şekil 7.	Lipoproteinlerin genel yapısı	15
Şekil 8.	HDL'nin kompleks ve heterojen yapısı	17
Şekil 9.	HDL'nin olgunlaşması ve ters kolesterol taşınımı	19
Şekil 10.	HDL'nin fonksiyonları	20
Şekil 11.	PON1'in yapısı	24
Şekil 12.	PON1, PON2 ve PON3 genlerinde en fazla görülen polimorfizimler	25
Şekil 13.	HepG2 hücrelerinde PON1 gen ekspresyonu aşamaları	34
Şekil 14.	RT-PCR amplifikasyon eğrileri	39
Şekil 15.	Paraoksonun paraoksonaz enzimi ile ürünlerine dönüşmesi	41
Şekil 16.	Dihidrookumarinin laktonaz aktivitesi ile ürüne dönüşmesi	42
Şekil 17.	Apo A-I standart grafiği	45
Şekil 18.	Protein tayini standart grafiği	46
Şekil 19.	Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 48 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda PON1 gen ekspresyonlarına etkisi	49
Şekil 20.	Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 48 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda PON1 paraoksonaz aktivitelerine etkisi	50
Şekil 21.	Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 48 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda PON1 laktonaz aktivitelerine etkisi	51

Şekil 22. Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 48 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda Apo A-I protein seviyelerine etkisi

KISALTMALAR, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

C	Kateşin
GC	Gallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
EGC	Epigallokateşin
ECG	Epikateşin gallat
EC	Epikateşin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HDL-K	HDL Kolesterol
HL	Hepatik Lipaz
IDL	Orta Yoğunluklu Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-K	LDL Kolesterol
ŞM	Şilomikron
TG	Trigliserid
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
TF	Teaflavin
TR	Tearubigin
Apo A-I	Apolipoprotein A-I

Formüller

KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
CaCl₂	Kalsiyum klorür
C₆H₅Na₃O₇.2H₂O	Sodyum sitrat dihidrat
C₆H₈O₇.H₂O	Sitrik asit monohidrat

1. ÖZET

ÇÖZÜNÜR SİYAH ÇAYIN HEPATOSİT HÜCRE SERİLERİNDE (HepG2) PARAOKSONAZ-1 EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Çözünür siyah çay, siyah çayın (*Camellia Sinensis*) ilave işlemlerle toz haline getirilmiş şeklidir. Kendine özgü teaflavin ve tearubiginleri bulunduran siyah çay; antioksidan, antibakteriyal, antitoksin, antiviral, antimutajen, antikanser, antiinflamatuvar gibi özelliklere sahiptir. Siyah çayın kardiyovasküler hastalık riskini ve mortaliteyi azaltma potansiyeli olduğu belirtilmiş olsa da sonuçlar çelişkilidir. Bu çalışmada çözünür siyah çayın HepG2 hücre serilerinde HDL metabolizmasına etkilerinin araştırılması amaçlandı. Hücre kültürü MTT testi sonuçlarına göre sitotoksik olmayan konsantrasyonlar 50 µg/mL ve 100 µg/mL'lık çözünür siyah çay ve kontrol numuneleri olarak 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL'lik sitrik asit/sodyum sitrat (çözünür siyah çayın karışımında bulunur) ve 100 µM ve 250 µM'lık kateşin (*Camellia Sinensis* yapraklarından elde edilen çayların önemli bileşeni) olarak bulundu. RT-PCR ile yapılan paraoksonaz-1 (PON1) gen ekspresyonları negatif kontrol (herhangi bir numune ilave edilmeyen) hücre serileri ile karşılaştırıldığında çözünür siyah çay ve kontrol numuneleri ile inkübasyona maruz bırakılmış hücrelerde 12. saatte artış olduğu ancak ilerleyen 24. ve 48. saatlerde (kateşin hariç) bazal seviyeye azaldı. Spektrofotometrik yöntemlerle belirlenen PON1 paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde 48. saat hariç genel olarak tüm numunelerde artışlar gözlemlendi. Buna ek olarak, çay ve çay bileşeni numuneleri, sadece hücre kültüründe 12. saat'lik inkübasyonda apolipoprotein A-I (HDL'nin başlıca yapısal proteini, ELISA ile belirlendi) seviyesinin artmasına sebep oldu. Bu sonuçlar, kullanıma hazır çözünür siyah çay ve onun bileşenleri, HDL metabolizmasını düzenleyebilmekte ve böylelikle kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apolipoprotein A-I, Çözünür Siyah Çay, HDL, HepG2, Laktonaz, Paraoksonaz-1.

2. SUMMARY

EFFECT OF INSTANT BLACK TEA ON PARAOXONASE-1 EXPRESSION IN THE HEPATOCYTE (HepG2) CELL LINES

Instant black tea is the powdered form of black tea (*Camellia Sinensis*) with extra process. Black tea, which contains unique theaflavins and thearubigins, has antioxidant, antibacterial, antitoxin, antiviral, antimutagen, anticancer, antiinflammatory etc. properties. Although the reduction potential of the risk of cardiovascular disease and of mortality by black tea have been expressed, the results are conflicting. In this study it was aimed to investigate the effect of instant black tea on HDL metabolism in hepatocyte cell line (HepG2). According to MTT test in cell culture, noncytotoxic concentrations were found 50 and 100 µg/mL of instant black tea, and 18.25 and 36.5 µg/mL of citric acid/sodium citrate (found in instant black tea powder) and 100 and 250 µM of catechin (major component of teas produced from *Camellia Sinensis leaves*) as the control samples. When compared to negative controls (has not any additive sample) of cell line, a main antioxidant enzyme of HDL, paraoxonase-1 (PON1) gene expression determined by RT-PCR increased in cell cultures incubated with instant tea and with control samples at the hours of 12 but decreased following 24. and 48. hours up to basal levels except catechin. PON1 paraoxonase and lactonase activities, determined by spectrophotometric methods, of almost all samples increased except at 48. hour. In addition, tea and tea component samples caused to increase apolipoprotein A-I (major structural protein of HDL, determined by ELISA) at only the incubation hours of 12 in cell culture. These results indicated that ready to use instant back tea with constituents can be regulatory of HDL metabolism and thereby can be protective to cardiovascular diaseases.

Key Words: Apolipoprotein A-I, Instant Black Tea, HDL, HepG2, Lactonase, Paraoxonase-1.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Ülkemizde oldukça fazla miktarda tüketilen siyah çay, *Camellia Sinensis* yapraklarının çay fabrikalarında işlenmesi ile elde edilen sıcak tüketilen bir üründür. Siyah çaya özgü, siyah çaya rengini ve kokusunu kazandıran yapılar olan teaflavinler ve tearubiginler, kateşinlerin oksidasyonu ve polimerizasyonu ile oluşurlar. Teaflavinler kateşinlerin dimerleri, tearubiginler ise polimerleri olarak ifade edilirler (1, 2). Bu çay bileşenleri antioksidan, antibakteriyal, antitoksin, antiviral, antimutajen, antikanser, antiinflamatuvar özellikler gösterir (2, 4, 5). Teaflavinlerin serbest radikal yakalama ve metal şelatlama özelliklerine ilaveten antioksidan enzimleri de aktifleştirmektedir (6). Çay polifenollerinin kanserlere, kardiyovasküler hastalıklara, kronik inflamasyona, obeziteye, metabolik sendroma ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkileri vardır (3).

Çözünür siyah çay ise, tamamen toz haline getirilmiş, suda çözülebilen ve soğuk olarak da tüketilebilen bir üründür. Hazırlanışı kolay ve pratik olan bu tür çözünür çayların kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Çözünür siyah çay, çay ekstraktının uygun koşullar altında kurutularak toz haline getirilmesiyle elde edilen suda çözünebilir özellikteki çay olup siyah çayın ekstraksiyon, santrifüjleme, kurutma ve yığılma işlemleri sonucu elde edilmektedir. Minerallerden potasyum, vitaminlerden pantotenik asit, flavonollerden epigallo kateşin, fenoliklerden tearubiginler, alkaloidlerden kafein ve amino asitlerden teanin en yüksek miktarda bulunmaktadır (7).

Günümüzde kardiyovasküler hastalıklar oldukça artmıştır ve bu hastalıkların önlenmesine yönelik arayışlar devam etmektedir. Yüksek seviyede trigliserid, kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-kolesterol) ve düşük seviyede yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-kolesterol), kardiyovasküler hastalıkları için risk oluşturmaktadır (8).

HDL, en küçük ve en yoğun plazma lipoproteinidir. HDL, dokulardaki kolesterolü karaciğere taşıması yani ters kolesterol taşıma fonksiyonuna ilaveten, antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombotik, endotel koruyucu gibi rolleri de üstlenir. Ayrıca, tümör gelişimini ve metastazı da baskılayabilmektedir (66). HDL yapısında en fazla miktarda apolipoprotein A-I (Apo A-I) olmak üzere Apo E, Apo C'ler ve Apo M gibi apolipoproteinleri bulunmaktadır (9, 10). Apo A-I, LCAT aktivatörü, antioksidatif,

antiinflamatuvar ve antiaterosklerotik ajan olarak fonksiyon göstermektedir (61, 70). Lesitin kolesteril açıl transferaz (LCAT) diskoidal yapıdaki Apo A-I'de bulunan kolesterolü esterleştirir ve küresel yapıdaki HDL oluşur. HDL'nin antiaterojenik aktiviteleri yerine getirmede Apo A-I'in fonksiyonu vardır (61).

Paraoksonaz 1 (PON1) (EC 3.1.8.1) karaciğerde, böbrekte, iskelet ve kalp kasında, adipositlerde, midede, ince bağırsakta, beyinde, gözde, akciğerde ve aterosklerotik lezyonlarda bulunur. Karaciğerde HDL yapısına katılarak kana salınır. 354 amino asitlik ve 43 kDa'luk kalsiyum bağımlı (2 Ca iyonlu) bir enzimdir. PON1'in fizyolojik substratları homosistein tiyolakton, okside fosfolipidler, okside çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) türevleri ve spesifik lipid peroksitlerdir (10, 11, 12). PON1, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği, HDL'nin endotel kaynaklı nitrik oksit üretimini uyarmasında ve makrofajlardan kolesterol çıkışında rol almaktadır (13, 14).

Siyah çayın lipid ve lipoprotein metabolizması antiaterojenik yönde yani total ve LDL kolesterolü düşürdüğü, HDL kolesterolü arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (15, 16). Ancak lipoproteinlerin seviyelerini etkilemediğini belirten çalışmalar da vardır (17, 18). Siyah çayda paraoksonaz aktivitesinin etkilerine ait çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer taraftan Tas ver ark. (19), diyabetik sıçanlara 3 hafta yeşil çay verildiğinde paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinde anlamlı bir değişiklik görülmediğini ancak 6 hafta yeşil çay takviyesiyle sadece paraoksonaz aktivitelerinde artış belirlemişlerdir (19).

Literatürde çözünür siyah çayın lipid metabolizmasına etkilerine ait çalışmaya rastlanılamamıştır. Ancak bu projede kullanılmak üzere temin edilen çözünür siyah çayın kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkilerini, TÜBİTAK 110G028 projesi kapsamında araştırmış olup henüz yayına dönüştürülmemiştir. Diğer taraftan, bir çalışmada 1 g çözünür siyah çay içiminin postprandiyal glukoz konsantrasyonunu düşürdüğü belirtilmesine rağmen 3 g instant siyah çay içiminin gastrointestinal semptomlara neden olabileceği vurgulanmıştır (20).

Bu çalışmada HepG2 hücre serilerinde farklı konsantrasyonlarda çözünür çay ilave ederek HDL metabolizmasına etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu doğrultuda çay ilave edilen ve edilmeyen hücre serilerinde PON1 gen ekspresyonu, PON1'in paraoksonaz ve laktonaz aktivitesi ve HDL'nin ana proteini olan Apo A-I seviyeleri tespit edildi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Çay (*Camellia Sinensis*)

4.1.1. Çay Bitkisi ve Bileşimi

Çay bitkisi, Çin çayı (*Camellia Var. Sinensis*), Assam çayı, (*Camellia Sinensis Var. Assamica*) Kamboçya çayı (*Camellia Sinensis Var. Cambodiensis*) olmak üzere üç çeşittir (21). Çaygiller (*Theaceae*) familyasında olan çay bitkisinin dünyada ilk defa Çin ve Hindistan'da yaklaşık 5000 yıl önce yetiştirilmeye başlandığı, anavatanının ise Assam olduğu ifade edilmektedir (22). Türkiye'de ilk çay bitkisi 1888'de Bursa'ya ekilmiş fakat üretimde başarılı olunamamıştır. Daha sonra 1917 yılında botanikçi olan Ali Rıza Erten'in toprak ve iklim özellikleri bakımından Rize ve çevresinin uygun olduğu görüşü göz önüne alınarak çay tohumları dikilmek suretiyle çay bitkisi üretime başlanmıştır (23).

Çay bitkisi genellikle çalı formundadır. Yaprakları koyu yeşil renkte ve parlak, birbirlerine zıt yönde ve yuvarlak biçimdedir. Çiçekleri büyük, beyaz, pembe ya da kırmızı renkte olabilir (24). Çay bitkisi yaprakları toplanma zamanı çayın kalitesini etkiler. En iyi çaylar, ilkbaharda ve sürgün ucundan iki yaprak - bir tomurcuk şeklinde toplanan yapraklardan elde edilir (24, 25) (Şekil 1).



Şekil 1. Çay bitkisi (*Camellia Sinensis*) filizleri (TRT Türk'den, 26).

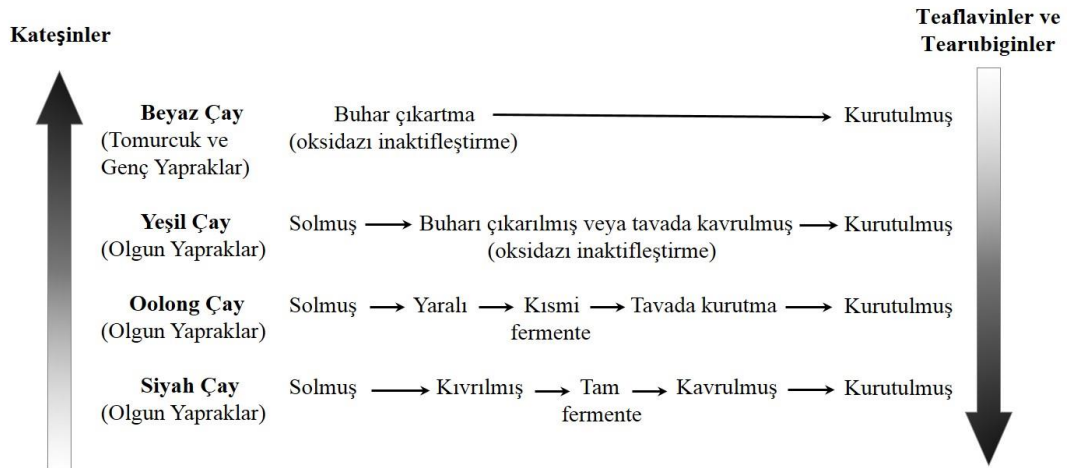
Dünyada, yaklaşık 40 ülkede çay tarımı yapılmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nın 2012 yılı tarım istatistiklerine göre; dünya çay üretiminde Türkiye ilk beş sırada yer almaktadır (27).

İşlem görmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi cins, çevresel etkiler, toplama standardı ve üretim yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte genel olarak taze çay yaprağının yaklaşık % 80'i sudur (28). Genç çay yapraklarının kuru maddesinin % 30-42'si kadar flavan-3-ol'lardan oluşmaktadır (1). Çay yaprağındaki polifenollerin ise yaklaşık % 75'ini flavanoller oluşturur (29). Çayın kalitesi taze çay yaprağının kateşin seviyesi ile orantılıdır (30).

4.1.2. İşlem Farklılığına Göre Çay Tipleri

Çay (*Camellia Sinensis*) yapraklarının farklı işlemleri sonucu yeşil çay, siyah çay ve oolong çay olarak bilinen çaylar elde edilmektedir. Bunların yanı sıra, bitkisinin bazı varyetelerinin tomurcuk ve genç yapraklarından yapılan özel bir çay grubu olan beyaz çay da vardır (22).

Taze toplanmış çay yaprakları farklı tipteki çayları elde etmek için; soldurma (nem muhtevasını azaltmak), kıvrırma, oksidasyon (çaya karakteristik lezzet kazandırma), kurutma (85–88 °C sıcaklıkta) ve sınıflandırma (yaprak parçacıkları büyüklüğüne göre) dâhil, bir veya pek çok işleme tabi tutulurlar (31) (Şekil 2).



Şekil 2. Farklı çay tiplerinin işleme süreçleri (Cooper'den, 25).

Yeşil çay eski çağlardan beri Çinliler tarafından bir profilaktik içecek olarak kabul edilir. Yeşil çay üretimi için taze çay yaprakları toplandıktan sonra kurutma ve buharlama aşamalarından geçirilip daha sonra hiçbir fermentasyona uğratılmaz. Yani yeşil çayın başlıca fenolik bileşiklerini oluşturan kateşinlerin okside edilmez. Uygulanan ısı ve

buharlama sonucunda polifenol oksidaz enziminin aktivitesi durdurulur. Yeşil çayın rengi oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir. Bunun nedeni işlem esnasında kateşinlerin oksidasyona uğramamasıdır (31, 32). Yeşil çay kuru ağırlıkça % 15-20 protein, % 5-7 çözüner karbohidratlar, % 5 mineraller ve eser elementler ve % 1-4 amino asit içeriği ile karmaşık bir yapıya sahiptir (31).

Yeşil çay kalp damar hastalıklarını azaltma, matriks metaloproteinazlarının inhibisyonu, vücut ısısının düzenlenmesi, kan şekeri düzenleme ve sindirim sistemini destekleyici, uyarıcı etki ve antimikrobiyal aktivite gibi çeşitli sağlık yararı sağlayan potansiyele sahiptir (31).

Oolong çay esas olarak Çin ve Güney Çin’de yaygın olarak üretilen ve tüketilen çay çeşididir (33). Oolong çay yarı fermente çay olup karakteristik özellikleri açısından fermente olmamış yeşil çay ve tam fermente olan siyah çayın arasında yer almaktadır. Eşsiz bir süreç boyunca üretilen bu tip çay kıvrıma ve bükülmeden önce şiddetli güneş ışığı altında soldurmaya ve oksidasyona maruz bırakılır (31).

Beyaz çay, bitkinin genç tomurcuklarının soldurmanın ardından kurutmakla elde edilen bir başka çay çeşididir (31). Yeşil çaya çok benzemektedir fakat istisna olarak yılda bir kere ilkbaharın erken dönemlerinde tam açılmamış tomurcuklardan ve genç yapraklardan elde edilir (34). Beyaz çayın bazı varyeteleri güçlü antitümör aktivite gösterip uyarılmış güneş radyasyonu ile indüklenen oksidatif DNA hasarı önlemede fotokoruyucu ajanlar gibi davranırlar (31).

4.1.3. *Camellia Sinensis* Çaylarının Önemli Bileşenleri ve Biyolojik Özellikleri

Çay çok çeşitli biyolojik ve farmasötik yararlarla sahip olduğu gösterilen flavonoidler ve diğer polifenollerce zengindir ki bunlarda antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antialerjik, antitümör etkiler göstermektedir (35, 36). Serbest radikal temizleme ve metal şelatlama yeteneği gibi faydalı etkiler çayın antioksidan aktivitesine atfedilmiştir (35).

Çayda bulunan polifenollerin miktarı; olgunluk derecesi, çeşit, ışık, yağmur, iklim, sıcaklık ve besin miktarı gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir ve yaprak yaşı, çayı işleme metodu ve işleme derecesine göre değişmektedir (29).

Flavonidler, bir heterosiklik piran halkası (C) ile bağı olan iki benzen halkası (A ve B) oluşan 2-fenil-benzo γ -piran çekirdeği bulunur (36). Bu bileşikler, içerdikleri C halkasındaki farklılıklara göre sınıflandırılır (37). Çay polifenollerı gallik asit ve kateşinin türevleri halinde bulunmaktadır (29).

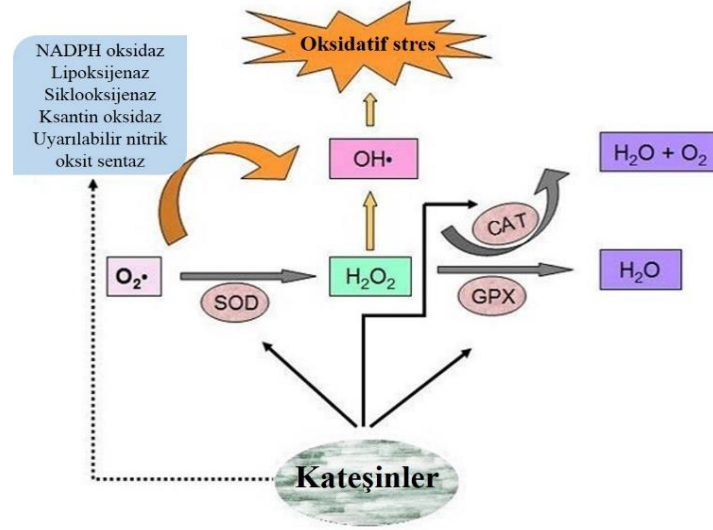
Flavan-3-ollar (**kateşinler**), flavonoid grubunun bir üyesi olup taze çay yapraklarının bileşikleri arasındaki en bol miktarda bulunan gruptur (1). Renksiz bileşiklerdir. Suda çözünür ve sert-acı bir tada sahiptirler. Rahatlıkla okside olurlar ve metil ksantinlerin de dahil olduğu birçok diğer maddeler ile kompleks oluştururlar (30).

Çayda en fazla miktarda bulunan başlıca kateşinler (+)-kateşin (C), (-)-epikateşin (EC), (-)-epikateşin gallat (ECG), (-)-epigallokateşin (EGC) ve (-)-epigallokateşin gallat (EGCG)'tır. Çayda bulunan diğer flavan-3-ollar ise (-)-Gallokateşin (GC), (-)-kateşin gallat (CG) ve (-)-gallokteşin gallat (GCG)'tır (38).

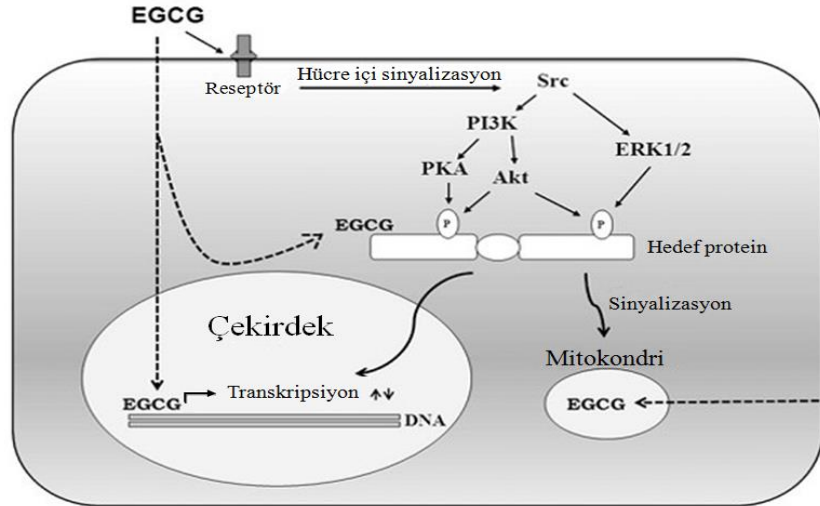
Yeşil çayda polifenoller yüksek konsantrasyona sahiptirler. Bunlardan en fazla olanı kateşinler, kateşinlerden de epigallokateşin gallat (EGCG) fazla miktarda bulunmaktadır. Bunu sırasıyla EGC, ECG, EC, CG, GC ve C izlemektedir (31). Oksidasyon işlemi kateşin miktarında büyük ölçüde azalmaya neden olduğu için yeşil çayda kateşin miktarı oolong ve siyah çaya göre fazla bulunur. Kateşinler yeşil çayın ağırlıkça % 20'sini oluşturup ve böylelikle antioksidan ve antikarsinojenik özelliklere sahip bileşenleri arasında yer almaktadırlar. Ayrıca Yeşil çayın toplam antioksidan potansiyelinin % 68'inin kateşinlerden kaynaklandığı bilinmektedir ki bunun % 30'u EGCG'a aittir. Fakat yeşil çay işlenmesi sırasında bunların yaklaşık % 15'ini kaybeder (25, 49).

Beyaz çayda polifenoller, kafein, teogallin, gallik asit, teaflavin, flavanol glikozitler ve kateşinler özellikle EGC, EGCG ve ECG gibi biyoaktif bileşiklerin çeşitli türleri bulunmaktadır. Beyaz çayda çay polifenollerı ve kateşinler konsantrasyonu ve ilgili antioksidan aktiviteleri yeşil ve siyah çaya göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca beyaz çaydaki toplam polifenol, toplam kateşin, kafein ve epigallokateşin gallat konsantrasyonları yeşil çaya göre önemli derecede yüksek olduğu bilinmektedir. Ancak yeşil çayda fakat EGC ve flavanol glikozitleri beyaz çaya göre yüksek bulunmuştur (34). Ayrıca oolong çayın EGCG ve toplam kateşin miktarları açısından yeşil çaydan sonra ikinci sırada yer aldığı saptanmıştır (28).

Kateşinler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzimleri aktive ederler. Diğer taraftan oksidatif strese sorumlu olan NADPH oksidaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz gibi enzimleri inhibe eder (Şekil 3) (39).



Şekil 3. Kateşinlerin antioksidan etkisi (Bhardwaj'dan, 39).



Şekil 4. Çay polifenollerinin hücresel etkilerini öneren model (Lorenz'den, 40).

Akt, Akt kinaz; *EGCG*, Epigallokateşin-3-gallat; *ERK1/2* ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz1/2; *P*, fosforilasyon noktaları; *PI3K*, fosfatidil inozitol-3-hidroksi kinaz; *PKA*, siklik AMP bağımlı protein kinaz, *Src*, *Src* kinaz.

Şekil 4’de kateşinlerden EGCG örnek verilerek çay polifenollerinin hücresel etkileri gösterilmektedir. Polifenoller DNA ve RNA’ya bağlanabilir. Çay polifenollerinin gen transkripsiyonuna etkileri için iki alternatif yol önerilmiştir: 1. Transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonu ile, 2. Çekirdekte çay polifenollerinin DNA’da düzenleyici dizilere doğrudan bağlanarak gen transkripsiyonu aktive edebilir veya durdurabilirler.

Çay polifenollerini çekirdekdeki transkripsiyonel aktivatörler veya baskılayıcılar ile etkileşime girebilirler. Siyah çay polifenollerini karmaşık kimyasal yapılarında ve özellikle büyük moleküler boyutlarından dolayı büyük bir olasılıkla hücre membranından geçemeyip ve hücre içine giremezler. Bu nedenle polifenoller hücre membranındaki reseptörler ile etkileşime girerek hücre içi sinyalizasyonunu başlatırlar. Hücre çeşidine ve polifenol miktarına bağlı olarak hücresel süreçler aktive olabilir veya baskılanabilir (40).

Çayın toplam flavonoidleri arasında <% 10 oran ile yer alan **flavonollar**; kamferol, kuersetin ve mirisetin bileşiklerini içermektedir (41). Flavonollar yapısal olarak kateşinlerden daha kararlılar ve çay, bu bileşiklerin büyük bir diyet kaynağı olduğu gösterilmiştir (42).

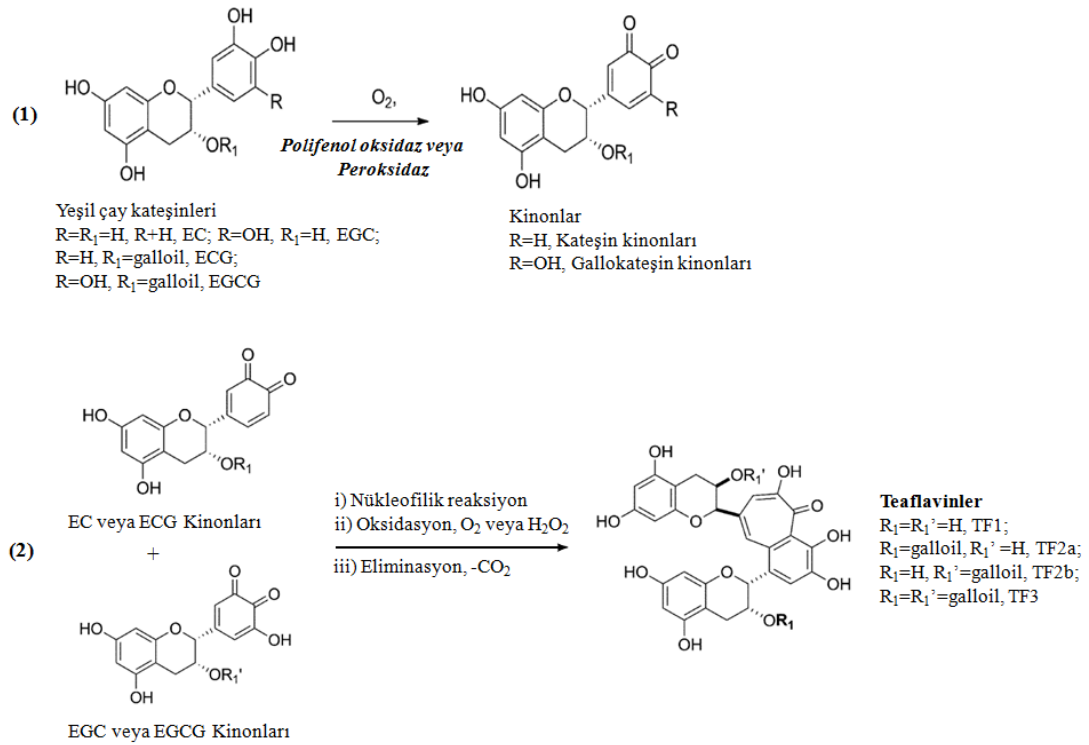
Teaflavinler ve tearubiginler, siyah çaya kokusunu ve rengini kazandıran en önemli bileşenlerdir (2). Siyah çay polifenollerinin oluşumu oksidasyon ve polimerizasyon sonucunda olur. Birinci reaksiyon aşamasında şekil 8’da görüldüğü gibi yeşil çay kateşinleri polifenol oksidaz (EC 1.14.18.1) veya peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimlerinin enzimatik kataliz altında kinonlara kısmen oksitlenir. Polimerizasyon adıyla bilinen ikinci reaksiyon aşamasında bir nükleofilik katılma reaksiyonu sonunda gallokateşin kinonlar kateşin kinonlara ilave edilip, oksijen veya hidrojen peroksit ile başka bir oksidasyon gerçekleştirilip, bir CO₂ molekülü giderilmesi ile siyah çay polifenollerinin çekirdeği olan benzotropolon sentezi tamamlanır (43) (Şekil 5).

Oolong çayın yapısında bulunan kateşinlerin polimerizasyonu sonucunda oluşan polifenol bileşikler, yeşil ve siyah çaydan farklılıklar gösterir ve kateşin, teaflavin ve tearubiginlerin karışımından oluşmaktadır (28). Oolong çayın bileşiminde bulunan proantosiyanidin, oolong homobisflavan, teasinensin ve teaflavin gibi polimerize polifenollerin pankreastan salgılanan lipaz enziminin aktivitesini engellemede yeşil çayın başlıca polifenollerinden olan EGCG’dan daha etkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle

oolong çayın insan vücudunda yağ absorpsiyonunu azaltarak obeziteyi önleyeceği düşünülmektedir (28).

Leung ve ark. (44) kateşinlerin ve teaflavinlerin bakırla indüklenmiş LDL oksidasyonunu inhibe etme kapasitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında antioksidan aktivite sıralanışını $TF_3 > ECG > EGCG \geq TF_2B \geq TF_2A > TF_1 \geq EC > EGC$ şeklinde vermişlerdir.

Kafein, teobromin ve teofilin gibi **alkaloitler** ksantin türevleri olarak sınıflandırılır. Kafein, çaydaki ksantin molekülleri arasında en fazla bulunanı olup çok kararlı bir moleküldür, fermentasyon işlemi sırasında değişmeden kalır. Diğer bir deyişle, içeriği maruz kaldığı tüm işlemlerde hemen hemen sabittir. Çay ürünlerinde teofilin ve teobromin miktarı uygulanan işlemlere göre değişir (43).



Şekil 5. Enzim katalizli teaflavin oluşumu (43).

L-teanin (gama glutamiletilamid veya 5-N-etil-glutamil veya 2-amino-4-(etilkarbamoyl) butirik asit), çay bitkilerinde doğal olarak bulunan protein yapısına katılmayan amino asittir. Umami tadını ve çaya özgü kokusunu vermektedir. Ayrıca çayın

kalitesini de belirler (45). Çay yapraklarının kuru ağırlığının yaklaşık % 1-3'ünü, toplam aminoasitlerin ise % 50'sini oluşturur (46, 47).

L-teanin, rahatlamaya; konsantrasyon ve öğrenme yeteneğinin gelişmesine; antitümör aktiviteye; vasküler hastalıkları engelleyici, kan basıncını düşürücü, kafeinin olumsuz etkisini engelleyici etkilere sahiptir. Ayrıca nöroprotektif obeziteyi önleyici ve immün sistemi güçlendirici etkileri de vardır (45). Bir glutamik asit analogu olan L-teanin, nöroprotektif etkiler göstermesi bakımından önemlidir (6). Fizyolojik stres parametrelerini düşürücü etkiye sahip olan L-teanin glutamat reseptörlerine ve kainit reseptörlerine bağlanabilme afinitesine sahiptir. Ancak L-teanin glutamat reseptörlerine afinitesi, glutamik asitten daha düşüktür. Serotonin, dopamin ve gama amino bütirik asit nörotransmitterler ile etkileşerek duygusal durumları etkiler (47). L-teanin ve kafein kardiyovasküler hastalıkları azaltma yönünden değerlendirildiğinde L-teaninin kan basıncını düşürmede kafeine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir. L-teanin ve kafein birlikte kullandığında kardiyovasküler hastalıkları azaltmada daha belirgin etkiler gösterdiği ifade edilmiştir (48).

4.1.4. Siyah Çay ve Çözünür Siyah Çay

4.1.4.1. Siyah Çay

Siyah çay, dünyadaki çay üretiminin yaklaşık % 78'ini oluşturur. Esas olarak Kuzey Amerika, Avrupa ve Kuzey Afrika'da tüketilir. Siyah çay, üretim esnasında yapraklar ezilir ve fermentasyon denilen enzimatik oksidasyon işlemine tabi tutulur (6).

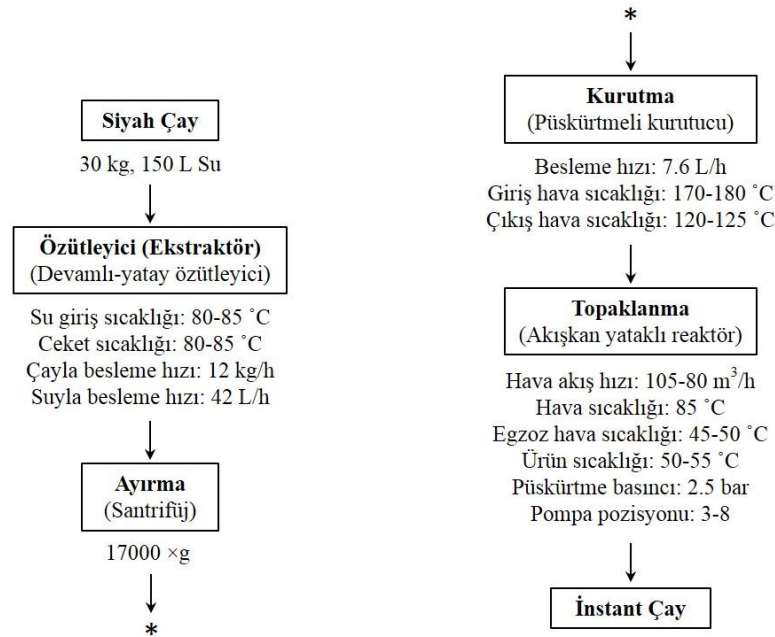
Türkiye'de üretilen Çaykur'a ait 7 farklı derecedeki (1-3. derece, yüksek kaliteli; 4.-7. derece, düşük kaliteli) çaylar analiz edildiğinde kateşinlerden epigallokateşinin; alkaloidlerden kafeinin; fenoliklerden tearubiginlerin ardından da sırasıyla teaflavin ve teaflavin 3,3'-gallatin; vitaminlerden pantotenik asitin; minerallerden potasyumun ardından onu takiben kalsiyum, fosfor ve magnezyum en fazla bileşenler olduğu, belirlenmiştir (50).

4.1.4.2. Çözünür Siyah Çay

Çözünür (instant) siyah çay tamamen çözünür formda oluşturulmuş çaydır. Alasalvar ve ark. (7) tarafından üretilen çözünür siyah çayın üretim aşamaları Şekil 6'da, kimyasal bileşenlerinin önemlileri ise Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu çay, siyah çaydan

işlenmiş yapraklar, çay atıkları veya kurumamış fermente yaprakların deminin ekstraksiyonu ile üretilir. Çay karışımından ayrılmış sıcak su ekstraksiyonunda aromasını kaybetmeyen, yüksek konsantrasyonlarda bile çabucak çözünebilen ve dehidrate olabilen bir ürün olarak ortaya çıkmıştır. Fermente yapraklar baskılanarak suda çözülebilen ekstratların konsantrasyonu yükselmesine neden olurlar. Bunun için özüt vakum ve ısı altında santrifüj edilip, kurutulur ve çözünür çay granülleri elde edilir. 20 ± 2 g çözünür çay 220 ± 20 g çay yaprağından elde edilir (51).

Çayın temel kimyasalı olan polifenoller, normal çay granülünde % 6.61 oranda iken çözünür siyah çayda % 19.63 gibi bir değere; kateşin miktarı % 3.73 iken % 12.21 gibi üç katı bir değere; teafavin ve tearubiginlerin değerleri sırasıyla % 0.566 ve % 6.86 iken % 0.915 ve % 9.88 gibi değerlere çıkmaktadır. Diğer taraftan kafein miktarı siyah çayda % 3.36 iken çözünür siyah çayda % 2.02 gibi bir değere düşmektedir. Ayrıca toplam renk maddeleri de çözünür siyah çayda daha düşüktür. Çözünür siyah çay normal çay ile karşılaştırıldığında daha düşük kafein miktarı ile daha düşük uyarıcı etkiye ve daha yüksek kateşin, EC, ECG, EGCG gibi flavonoidleri ile daha yüksek antioksidan etkiye sahiptir (52).



Şekil 6. Çözünür siyah çay üretim aşamaları (Alasalvar'dan, 7).

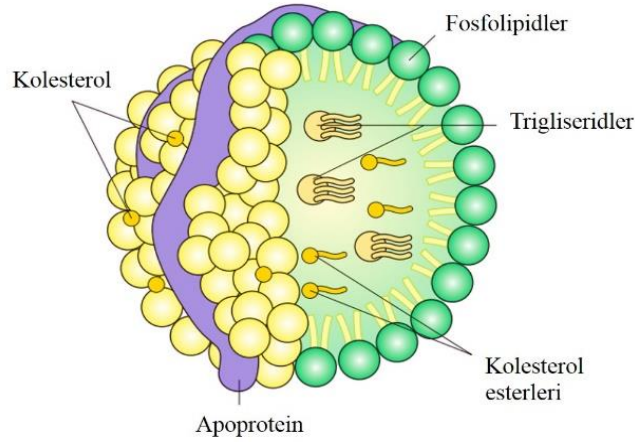
Tablo 1. Çözünür siyah çayın ortalama içerikleri (100 g çözünür çay) (Alasalvar'dan, 7).

	Ünite	Düşük kalite	Yüksek kalite
Kalsiyum	mg	73	103
Magnezyum	mg	280	179
Mangan	mg	151	166
Fosfor	mg	431	376
Potasyum	mg	4625	3928
Niasin	mg	20.64	20.85
Pantotenik asit	mg	62.38	59.08
Fenolik ve alkaloid içerikler			
Kateşin	mg	288	316
Epikateşin	mg	889	524
Epikateşin gallat	mg	428	315
Epigallokateşin	mg	3460	2004
Epigallokateşin gallat	mg	176	173
Gallokateşin	mg	506	397
Teaflavin	mg	56	124
Tearubigin	mg	10161	12701
Gallik asit	mg	751	697
Kafein	mg	4398	3964
Çayın tadındaki etkili bileşenler			
Malik asit	g	2.07	2.32
Tannik	g	21.89	20.43
Alanin	mg	92.7	105.1
Arginin	mg	231.9	255.4
Aspartik asit	mg	209.7	181.8
Glutamik asit	mg	241.1	219.9
Serin	mg	109.3	87.1
Teanin	mg	572.2	512.9

4.2. Lipoproteinler

Lipidler ve proteinler kovalent olmayan bağlar ile bir araya gelerek kan plazmasındaki hidrofobik apolar özellikte olan lipidlerin taşınmasında aracılık yapan

lipoproteinleri oluşturmaktadır (53). Bunlar ayrıca yağda eriyen vitaminleri (A ve E vitamini gibi) de taşırlar (55).



Şekil 7. Lipoproteinlerin genel yapısı (Baynes'den, 55).

Triaçilgliseroller, kolesterol ve kolesterol esterleri suda çözünemedikleri için lenfte veya kanda serbest molekül olarak taşınamazlar. Bunun yerine bu lipidler fosfolipidler ve amfipatik lipid bağımlı proteinler ile birleşerek lipoprotein adı ile bilinen küresel makromolekülleri oluşturmaktadır (54). Lipoproteinlerin nötral olan iç kısmında triaçilgliserol ve kolesterol esterleri bulunurken dış yüzeyinde ise amfipatik fosfolipidler, serbest kolesterol ve apolipoproteinler bulunurlar (Şekil 7) (55).

Tablo 2. Lipoproteinlerin yapısal özellikleri (60).

Plazma lipoproteinleri	Yoğunluk (g/mL)	Çap (nm)	Apolipoprotein	İçerik (%)				
				TAG	KE	K	FL	P
ŞM	<0.95	75-1200	B-48, C, E	86	3	1	8	2
VLDL	0.95-1.006	30-80	B-100, C, E	52	14	7	18	8
IDL	1.006-1.019	15-35	B-100, E	38	30	8	23	11
LDL	1.019-1.063	18-25	B-100	10	38	8	22	21
HDL	1.063-1.21	7.50-20	A	5-10	14-21	3-7	19-29	33-57

TAG, Triaçilgliserol; KE, Kolesterol esterleri; K, Kolesterol; FL, Fosfolipid; P, Protein.

Apolipoproteinler, lipoproteinlerin suda çözünürlüğünü arttırmak; normal lipoproteinlerin metabolizması için gereken bazı enzimlerin aktifleştirmesinde rol alırlar; periferel dokularda lipoproteinlerin reseptörleri ile etkileşirler (57). Lipoproteinlerin fonksiyonel ve fiziksel özelliklerine göre, lipid ve protein kompozisyonları, büyüklük ve yoğunluk açısından sınıflandırılması Tablo 2’de gösterilmektedir (53, 56).

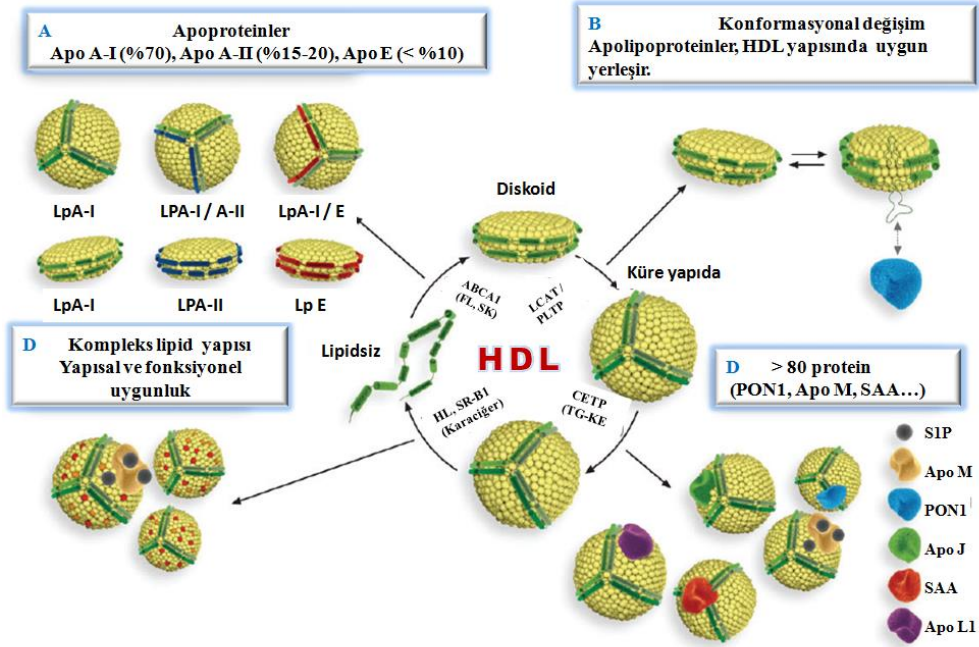
İnce bağırsak epitel hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenen ve en büyük lipoprotein olan **şilomikronlar (ŞM)**, triağılgliceroller (TAG) ve kolesterolü lenf veya kan yolu ile bağırsaktan adipoz doku (depolama için) veya kas dokusu (oksidasyon için) gibi dokulara taşırlar (54). Karaciğerin parankimal hücrelerinde üretilen çok düşük dansiteli lipoprotein çok düşük dansiteli lipoprotein (**VLDL**), triağılglicerolleri, yağ asitleri olarak adipoz dokudan salınan depolanmış yağlardan; karaciğerde karbohidratların yağ asitlerine dönüşümü ile; ve karaciğerde ve endotel kapillerde lipoprotein triağılglicerollerin hidrolizi ile elde edilir (58). Orta yoğunluklu lipoprotein (**IDL**), VLDL kalıntısı olarak tanınmaktadır. VLDL’nin trigliseridlerini dokulara vermesi sonucunda oluşur. Bu kalıntılar karaciğer tarafından tutulmaması durumunda LDL’ye dönüşüp karaciğer veya diğer dokular tarafından tamamen metabolize edilir (58). Düşük yoğunluklu lipoprotein (**LDL**), VLDL’den daha fazla triağılglicerolün uzaklaştırması sonucunda LDL partikülleri üretilir. Kolesterol (K) ve kolesterol esterlerince (KE) zengin olan LDL, Apo B-100’ü algılaması için plazma membranında spesifik reseptörlerine sahip olan dokulara kolesterolü taşır (59). Hücre içi kolesterol bolluğu, kolesterol biyosentezinde bir anahtar enzim olan ve aynı zamanda LDL reseptörü sentezini inhibe eden HMG-CoA redüktaz sentezini baskılar. LDL reseptörü eksikliği olan kişilerde ailesel hiperkolestrolemi hastalığı meydana gelir ki bu hastalık kolesterolün kanda birikmesi ve cilt ve arterlerde depolanması sonucu ortaya çıkar. Bu tür hastalar genç yaşlarda kalp hastalığından ölüyorlar (54).

4.3. HDL ve Apolipoprotein A-I (Apo A-I)

4.3.1. HDL

HDL, 8-10 nm boyutlarında, küçük, yoğun (1.063–1.21 g/mL), proteince zengin lipoproteindir (61, 62). HDL, yapısal, kimyasal ve biyolojik özellikleri ile yüksek heterojenlik gösterir. Ultrasantrifüjasyon ile ayırmaya göre az yoğun (1.063–1.125 g/mL) lipidce zengin HDL₂ ve çok yoğun (1.125–1.21 g/mL) proteince zengin HDL₃ olarak

sınıflandırılır. Poliakrilamid jel elektroforezi ile HDL₂ ve HDL₃'ü de alt sınıfına ayırmak mümkündür: HDL_{3c} (7.2–7.8 nm); HDL_{3b} (7.8–8.2 nm); HDL_{3a} (8.2–8.8 nm); HDL_{2a} (8.8–9.7 nm) ve HDL_{2b} (9.7–12.0 nm). Protein içeriğine göre ise yapısında bulunan apolipoproteinleri gösterir şekilde LpA-I, LpA-II, Lp E vs. şeklinde sınıflandırılır (61). Şekil 8'de HDL'nin kompleks ve heterojen yapıları gösterilmektedir.



Şekil 8. HDL'nin kompleks ve heterojen yapısı (Kratzer'den, 63).

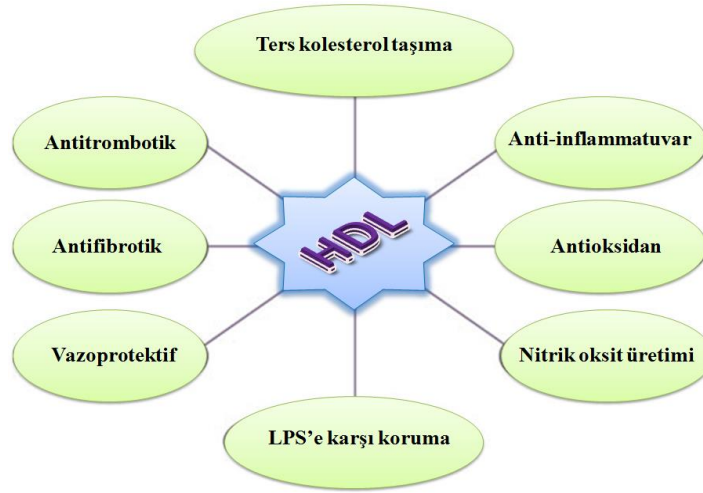
HDL, diğer lipoproteinlerden taşıdığı çok sayıda molekülünden dolayı yani kargo özelliğinden dolayı ayrılır. Çok sayıda protein bulundurur (57, 61): Apolipoproteinler, enzimler, lipid taşıyıcı proteinler, akut faz proteinleri, kompleman bileşenleri ve proteinaz inhibitörleri gibi çok sayıda molekülü taşır (61). HDL proteinleri ve lipidleri kandaki diğer lipoproteinler ile değiş tokuş yapmaktadır. HDL'deki proteinler, molekül ağırlıkları (MA) ve başlıca fonksiyonları Tablo 3'de özetlenmiştir (57).

HDL'nin yapısal ve fonksiyonel en önemli proteini HDL proteinin % 70'lik kısmını teşkil eden Apo A-I'dir (61). Karaciğer ve ince bağırsaktan salınan Apo A-I, ABCA1 ile etkileşerek fosfolipidler ve kolesterolü lipidce fakir olan Apo A-I'e aktarılır. Lipidleşmiş Apo A-I diskoidal yapıya dönüşür. Diskoid haldeki HDL (preβ HDL) plazmada bulunur ancak LCAT'ın mükemmel substratları olduklarından dolayı ömürleri kısadır (61).

Tablo 3. HDL’de bulunan proteinler (Kontush’dan, 61).

	MA, kDa	Başlıca Fonksiyonu
Apolipoproteinler		
Apo A-I	28	Başlıca yapısal protein, LCAT aktivatörü
Apo A-II	17	Yapısal ve fonksiyonel apolipoprotein
Apo A-IV	46	Yapısal ve fonksiyonel apolipoprotein
Apo C-I	6.6	CETP aktivitesinin modülatörü, LCAT aktivatörü
Apo C-II	8.8	LPL aktivatörü
Apo C-III	8.8	LPL inhibitörü
Apo C-IV	11	TG metabolizmasının düzenleyicisi
Apo D	19	Küçük hidrofobik moleküllerin bağlayıcısı
Apo E	34	Yapısal ve fonksiyonel protein, LDLR / LRP ligandı
Apo F	29	CETP inhibitörü
Apo H	38	Negatif yüklü molekülleri bağlayıcı
Apo J	70	Hidrofobik molekülleri bağlayıcı, hücre reseptörleri ile etkileşim
Apo L-I	44/46	İnsan serumunun tripanolitik faktörü
Apo M	25	Küçük hidrofobik molekülleri bağlayıcı
Enzimler		
LCAT	63	Kolesterolün kolesterol esterlerine esterifikasyonu
PON1	43	Kalsiyum bağımlı laktonaz
PAF-AH (LpPLA2)	53	Kısa zincirli oksitlenmiş fosfolipidlerin hidrolizi
GSPx-3	22	Hidroperoksitlerin glutatyon ile indirgenmesi
Lipid taşıyıcı proteinler		
PLTP	78	HDL’nin daha büyük ve daha küçük partiküllere dönüşümü, LPS’nin taşınımı
CETP	74	HDL ile Apo B’li lipoproteinler arası KE ve TG’in hetero değişimi ve FL’nin homo değişimi
Akut faz proteinleri		
SAA1	12	Başlıca akut faz reaktantı
SAA4	15	Minör akut faz reaktantı
Alfa-2-HS-glikoprotein	39	Negatif akut faz reaktantı
Fibrinojen α zincir	95	Fibrinin öncülü, trombosi agregasyonunun kofaktörü
Komplement bileşenler		
C3	187	Komplement aktivasyonu
Proteinaz inhibitörler		
Alfa-1-antitripsin	52	Serin proteinazın inhibitörü
Hrp	39	Proteolizi önlemek için yalancı substrat
Diğer proteinler		
Transtiretin	55	Tiroid hormonunu bağlayıcı ve taşıyıcı
Serotransferrin	75	Demir bağlayıcı ve taşıyıcı
Vitamin D bağlayıcı protein	58	D vitaminin bağlayıcı ve taşıyıcı
Alfa-1 β -glikoprotein	54	-
Hemopeksin	52	Hem grubu bağlayıcı ve taşıyıcı

CETP: kolesterol ester taşıyıcı protein; FL: fosfolipid; GSPx-3: glutatyon selenoperoksidaz 3; Hrp: haptogloblin ile ilişkili protein; KE: kolesterol ester; LDL-R: LDL reseptörü; LCAT: lezitin kolesterol açıltransferaz; LPL: lipoprotein lipaz; LpPLA2: lipoprotein ile ilişkili fosfolipaz A2; LRP: LDL reseptörü ile ilişkili protein; PAF-AH: trombosit aktifleştirici faktör asetil hidrolaz; PLTP: fosfolipid taşıyıcı protein, PON1: paraoksonaz 1; SAA: serum amiloid A; TG: trigliserid.



Şekil 10. HDL'nin fonksiyonları (Navab'dan, 64). *LPS: Lipopolisakkarit.*

HDL ters kolesterol taşınımının bütün basamaklarında rol alır.

1. Kolesterol akışında: Hücrelerden fazla kolesterolü alır
2. Lipoprotein modellenmesinde: HDL fonksiyonlarına etki edecek şekilde yapısal değişikliklere uğrar
3. Hepatik lipid alımı, HDL kolesterolü karaciğere aktarır.

Ters kolesterol taşınımında, arter duvarından kolesterolün alınımı aterom oluşumu ve gelişimine yol açan patojenik olayları engeller (65).

HDL, dokulardaki kolesterolü karaciğere taşıması yani ters kolesterol taşıma fonksiyonuna ilaveten, antiinflammatuvar, antioksidan, antitrombotik, endotel koruyucu gibi rolleri de üstlenir. Ayrıca, tümör gelişimini ve metastazı da baskılayabilmektedir (66) (Şekil 10).

Küçük ve yoğun HDL₃ yapısında bulunan fosfatidil serin kolesterol aktarımında rol almasına ilaveten, HDL'nin antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflammatuvar etkilerinde de rol oynar (61). LDL'yi ve trigliseridlerce zengin diğer kalıntı lipoproteinleri oksidatif stresten korur. Hem lipidlerin hem de proteinlerin serbest radikal yollu oksidasyonunu engeller. LDL'de lipid hidroperoksit birikimini engeller. Fosfolipid hidroperoksitler LDL'den HDL'ye transfer olur. Burada Apo A-I de görev alır. Hidroperoksil grubunun fosfolipid ve kolesterol esterlerine aktarılması, hidrofobikliği artırır. HDL'deki lipid hidroperoksitler, redoks reaksiyonu ile HDL proteinleri ile etkileşerek inaktive olur.

HDL'nin lipid hidroperoksitleri ve bunların hidroksitlerinin uzaklaştırma yeteneği karaciğerdeki SRB1 aracılığı ile olmaktadır. HDL, ayrıca eritrositlerin ve astrositlerin hücre membranından da lipid hidroperoksitleri uzaklaştırabilir HDL lipid hidroperoksitlerinin ve lipid peroksidasyonun karalı son ürünleri olan F₂-izoprostanların önemli taşıyıcısıdır (68). HDL'nin enzimatik bileşikler olan PON1, PAF-AH ve LCAT okside fosfolipidlerin hidrolizinde rol almaktadır. HDL tarafından taşınan glutatyon peroksidaz da lipid hidroperoksitleri hidroksitlerine indirgemektedir. HDL'nin çok yüksek yoğunluklu alt grubunda bulunan tripanozomlitik faktör peroksidaz, benzer aktivite sergiler (68). HDL'nin antioksidan özelliği HDL_{2b} < HDL_{2a} < HDL_{3a} < HDL_{3b} < HDL_{3c} şeklinde artmaktadır (67).

HDL'nin endoteldeki SR-B1'i bağlanması ile eNOS aktif olur (63, 69, 70). Endotelial Akt aktivasyonu ile eNOS fosforile olur ve aktive edilir. Lipidce yoksun olan Apo A-I, SR-B1'e bağlanmasına rağmen eNOS'u aktive edemez. eNOS aktivasyonu için Apo A-I'in konformasyonunu destekleyen diğer HDL bileşenlerine de ihtiyaç vardır (70). HDL ile ilişkili sfingolipidler de (örneğin sfingozin-1 fosfat) eNOS artışına neden olur. HDL yapısındaki Apo M sfingozin-1 fosfatı bağlayarak G proteinleri üzerinden sinyal mekanizmasını tetikler. Bu da NO ve prostaglandin-I₂ salınımıyla vazodilatasyona yol açar (69,70). Diğer taraftan PON1 de endotelial NO üretimini uyarır (70).

HDL trombin ve kollajenin antagoniste olarak trombositlerin aktivasyonunu engeller. HDL trombositlerin üzerinde olan SRB1'e de bağlanır ve böylece trombositlerin agregasyonun, granüllerden salınımı, fibrinojenin bağlanmasını ve hücre içi kalsiyum miktarını etkiler. HDL'nin trombositlerdeki SRB1'e bağlanmasıyla hücre içi ikincil haberci mekanizması indüklenir. Plazma membranındaki fosfatidil kolinden diaçilgliseol açığa çıkar ve protein kinaz C aktive olur. HDL, Na⁺/H⁺ taşıyıcısının uyarılmasına, sitoplazmik bileşenlerinin alkalizasyonuna ve kalsiyumun hücre içi depolarından salınmasına yol açar (69). HDL, antikoagulan olan protein C ve onun kofaktörü olan protein S'nin etkisini artırır. Plazma Apo A-I seviyesi protein C ve S ile pozitif korelasyon gösterir (71).

Plazmada Apo E'nin en büyük kısmı HDL'de bulunuyor ve bu yüzden HDL bu apoprotein için bir depodur (57). HDL'de bulunan Apo E lipid çekirdeğinin oluşumunu kolaylaştırır ve LDL reseptörü için mükemmel bir ligandır (61). Apo E, triglisridce

zengin lipoproteinlerin temizlenmesinde ve HDL-E yapısının oluşumuna da katılır. HDL-E, Apo A-I ihtiva eden HDL'de olduğu gibi antioksidan ve antiinflamatuvar fonksiyonlarını sergileyerek ateroprotektik özellikler gösterir (70, 72). HDL'nin diğer proteini olan Apo IV de antioksidan, antiinflamatuvar ve antiaterosklerotik özellikler gösterir. Ayrıca Apo J de LDL oksidasyonuna karşı koruyucudur (70). HDL yapısındaki Apo M, NO ve prostaglandin- I_2 salınımını tetikleyerek vazodilatasyona, kaspazları inhibe ederek apoptozun engellenmesine, reaktif oksijen türleri ve sitokinlerin üretimini engelleyerek inflamasyonun engellenmesine yol açar (69).

Yukarıda bahsedildiği gibi hücre içi sinyal yollarında ve kolesterol ve/veya oksisterollerin Apo A-I/HDL'ye akışında üç hücre yüzey proteini rol alır. Bunlar ABCA1, ABCG1 ve SR-BI'dir (73).

HDL-kolesterolün düşük olması sadece aterosklerozda değil, pisorazis, romatoid artrit, karaciğer fibrozu, kanserler ve böbrek hastalığı gibi durumlarda da görülür. Karbohidratlar ve sigara HDL-kolesterol seviyesini düşürürken omega-3 yağ asitleri ve fiziksel aktivite artırır. HDL-kolesterolün düşük olması kronik arter risk oluşturduğu bilinmesine rağmen yüksek olduğunda aynı ölçüde ateroprotektif olacağı söylenemez. HDL-kolesterolün 10 mg/dL veya 0.38 mmol/mL artması iskemik felç oranını % 11-15 azaltır (67).

4.3.2. Apo A-I

Apo A-I, 28-kDa ağırlığında, 243 amino asit'lik ve HDL proteinlerinin yaklaşık % 70'lik kısmını teşkil eden apolipoproteindir. Apo A-I geni APOA1/C3/A4/A5 kompleksinin bir parçasıdır. Esas olarak karaciğer ve bağırsakta sentezlenir (55). Dolaşımdaki Apo A-I, disulfid bağları bulunmayan, glikozilasyondan yoksun, 22 amino asitlik sekiz tane alfa sarmal domaini ve 11 amino asitlik tekrar birimi bulunan amfipatik proteindir (61).

Apo A-I lipidlere bağlanarak deterjan benzeri özellik gösterir (61). Apo A-I'in asıl fonksiyonu LCAT'ı aktive etmektir. LCAT diskoidal yapıdaki Apo A-I'de bulunan kolesterolü esterleştirir ve küresel yapıdaki HDL oluşur. ABCA1 ve LCAT'taki herhangi bir mutasyon Apo A-I ihtiva eden HDL'nin oluşumunu engeller. Bunun yanında hücre reseptörlerle etkileşime girebilmektedir. HDL'nin anti-aterojenik aktiviteleri yerine getirmede Apo A-I'in fonksiyonu vardır (61). Apo A-I, ABCA1 vasıtasıyla hücre sinyal

mekanizmasında da rol oynar. Apo A-I'nin ABCA1'e bağlanması, trimerik G proteinleri aracılığıyla fosfolipaz C veya D'nin aktivasyonunu ve adenilaz siklazin aktivasyonuna yol açar. Bu mekanizma sonucu tetiklenen kolesterol akışı antiinflamatuvar mekanizmaları tetikler. Ayrıca Apo A-I'nin beta-ATPaz'a bağlanması, ATP'nin hidrolizini indükler ve ADP oluşumu da hücre içi sinyal mekanizmasını başlatır (69). Lipid hidroperoksit moleküllerinin LDL'den uzaklaştırılmasında lipidce yoksun Apo A-I de rol oynar. Apo A-I'deki 112'ci ve 148'inci amino asit olan metiyonin lipid hidroperoksitleri inaktif lipid hidroksidlere indirger. Böylelikle lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller. Lipid hidroperoksitler lipidce zengin Apo A-I tarafından da inaktif edilir ama bu daha düşük ölçüdedir. Bu indirgenme esnasında metiyonin sulfoksitler oluşur. Bu metiyonin sulfoksitler de metiyonin sülfoksit reduktaz enzimi tarafından tekrar metiyonine dönüştürülür. Metiyonine ilaveten Apo A-I'nin sistein rezidüsü de antioksidan özellikleri bakımından önemlidir. Ayrıca Apo A-I'deki histidin de LDL'deki lipid hidroperoksitlerinin birikimini engeller. Burada histidin metal şelatlayıcı özellik gösterir (68, 70).

Apo A-I farklı izoformlarda bulunur. Bu izoformlar, Apo A-I'nin % 75 ini teşkil eden en büyük izoform ve daha bazik olan Apo A-I'nin % 5-10'unu teşkil eden preApo A-I'dir. Asidik A-I şekli, metiyonin oksidasyonuna daha yatkındır. Aterosklerotik inflamasyon esnasında salınan proteazlar tarafından N ve C terminalleri kesilebilir. Tyr42, Phe57, Tyr216 ve Phe253 kısımlarına kinaz tarafından kesildiğinde oluşan yapıda kolesterol aktarma yeteneği daha düşüktür. Miyokard infarktüs hastalarında dimerik Apo A-I formu gözükür. Ancak bu form sağlıklı kişilerin HDL'sinde de görülebilir (61).

Miyeloperoksidaz (MPO) aracılıklı inflamasyon da Apo A-I'de oksidasyona yol açar (61). İnflamasyon durumunda Apo A-I, pozitif akut faz proteini olan SAA ile yer değiştirir. SAA, SR-B1 aracılıklı seçici kolesterol aktarımını inhibe ederek HDL katabolizmasını hızlandırır. Bu da plazmadaki Apo A-I seviyesinde azalmaya neden olur (68, 70). Bazı bireylerde Apo A-I'deki mutasyonlar düşük HDL kolesterol seviyelerine neden olur ki bu da ciddi bir şekilde prematüre kalp hastalıklarına yol açır (74).

Özet olarak, Apo A-I, HDL proteinlerinin en önemli bileşeni, LCAT aktivatörü, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiaterosklerotik ajandır (61, 70).

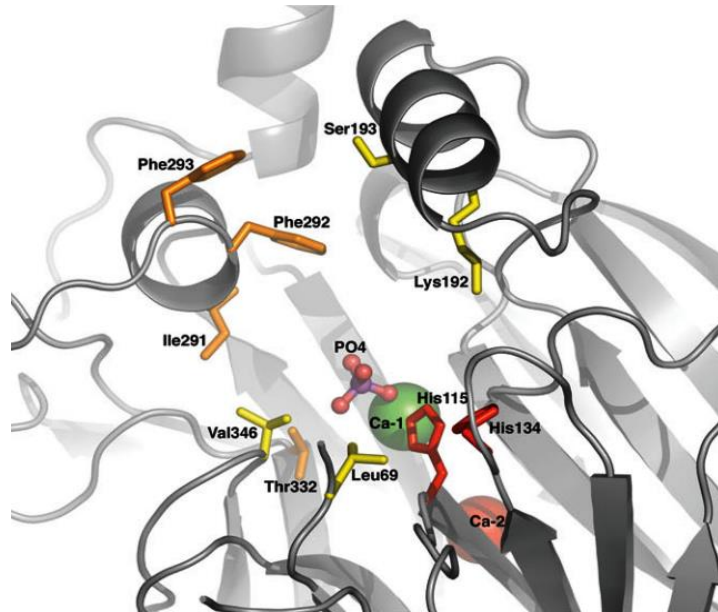
4.4. Paraoksonaz (PON)

Paraoksonaz (PON) ailesi, genleri insanda kromozom 7 uzun kolunda (q21.22) bulunan ve nükleotid dizisinde % 70 ve amino asit düzeylerinde % 60 benzerlik gösteren PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeden oluşan enzimdir. Amino asit düzeyinde % 60 benzerlik göstermektedir (12, 75). PON1, PON2 ve PON3, dokuz eksona sahiptir ancak PON1’de ekson 4’te pozisyon 106’ya denk gelen ekstra bir kodon (lizin) vardır (76).

Paraoksonaz enzimi, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu engellerler; bağışıklık sistemine katkıda bulunur; reaktif molekülleri detoksifiye eder; ilaçların biyoaktivasyonunda rol alır; endoplazmik retikulum stresini azaltır ve hücre proliferasyonunu / apoptozonu düzenler (75).

4.4.1. Paraoksonaz 1 (PON1)

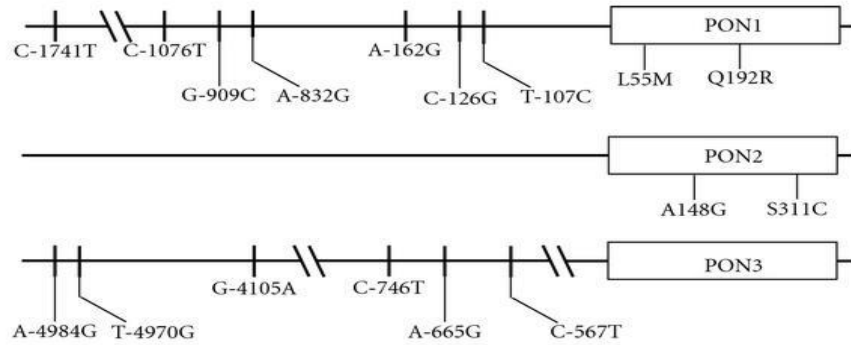
PON1 (E.C.3.1.8.1) 43-47 kDa ağırlığında ve 354 amino asitten oluşan 6 adet β -kırmalı tabakaya sahip bir glikoproteindir (76). PON1 mRNA’sı karaciğerde, böbrekte, kolonda ve fetal karaciğerinde eksprese edilir (77). Yapısında, kofaktör olarak yapısal ve katalitik aktivitede rolü olan iki kalsiyum atomu bulundurur. Katalitik bölgesinde yer alan histidin - histidin çifti de (H115 - H134), katalitik mekanizmada rol oynar (78, 79) (Şekil 11).



Şekil 11. PON1’in yapısı (Harel’den, 79).

PON1, paraoksonaz, laktonaz ve arilesteraz aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. Bu aktiviteleri belirlerken farklı substratlar örneğin paraoksonaz aktivitesi için paraokson; arilesteraz aktivitesi için fenil asetat veya 4 (p)-nitrofenil asetat ve laktonaz aktivitesi için 5-tiyobutil butirolakton veya dihidrokumarin kullanılır (75).

PON1'in önemli bir kısmı (% 80'inden fazlası) HDL ile dolaşsa da VLDL ve şilomikronların yapısında da çok düşük miktarda bulunmaktadır. PON1, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğine ilaveten, HDL'nin endotel kaynaklı NO üretimini uyarmakta ve makrofajlardan kolesterol çıkışını arttırmaktadır (13, 14). İnflamasyon durumunda MPO, PON1 ve HDL üçlü kompleksi oluşur. PON1, MPO aktivitesini kısmen engeller. Ancak MPO'da PON1 aktivitesini azaltır. PON1 de MPO'ya bağlanarak aktivitesini azaltırken inflamasyon durumunda MPO, HDL'ye bağlanır ve oksidatif stresi artırır ve ateroskleroza neden olur (14, 80) . MPO, PON1'i tirozin 71'i (Tyr71) okside eder ki bu rezidü HDL'ye bağlanma ve fonksiyonunu yerine getirmede özelliği bakımında önemlidir (80).



Şekil 12. PON1, PON2 ve PON3 genlerinde en fazla görülen polimorfizimler (Camps'dan, 82).

PON1'in biri lösin metiyonin (L55M) diğeri glutamin arginin (Q192R) yer değişimi ile oluşan iki polimorfik formu vardır (81, 82) (Şekil 12). PON1 (L55M) polimorfizmi, PON1'in HDL-C ile bağlanmasında rol oynayan N-terminal kısmında görülür (83). 55. rezidü olarak metiyonin bulunan PON1 daha düşük aktiviteye sahiptir. 192. rezidü arginin olan PON1, paraoksonu ve homosistein tiyolaktonu daha etkin hidrolizlerken glutamin olan PON1 sarin, soman, δ-valerolakton ve 2-kumaranon daha etkin hidrolizler. Glutamin bulunduran PON1 allosizi LDL oksidasyonunu engelleyici özelliği arginin

bulundurandan daha fazladır (81). PON1'in lipid peroksitleri ve homosistein tiyolaktonu hidroliz etme yeteneği onu güçlü bir antiaterosklerotik enzim yapmaktadır. HDL'nin LDL oksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini engelleme özelliği PON1'e bağlanmaktadır (77).

PON1 (L55M) polimorfizmi, daha çok total ve LDL kolesterol düzeyleri, koroner arter hastalığı, inme, Parkinson hastalığı gibi hastalıklarla ilişkisi; PON1 (Q192R), ailesel hiperkolesterolemi, koroner arter hastalığı, inme, tip 2 diyabet ve parkinson hastalığı ile ilişkisi incelenmiştir (84). Diyet yağları ve yağ asitleri, antioksidan vitaminler, polifenoller, polifenol açısından zengin besinler, ilaçlar, genetik faktörler ve yaşam tarzı PON1 aktivitesini etkilemektedir (85).

4.4.2. Paraoksonaz 2 ve 3 (PON2 ve PON3)

PON2, 43 kDa ağırlığındadır ve 355 amino asitten oluşur (86). PON2 mRNA'sı, beyinde, kalpte, kalpte, dalakta, karaciğerde, kolonda, akciğerde, ince bağırsakta, kasta, midede testiste, plasentada tükürükte, tiroid ve böbrek üstü bezlerinde, pankreasta, deride, kemik iliğinde, fetal beyin ve karaciğerinde eksprese edilir (77). PON2 mRNA'sı aynı zamanda endotel hücresi, düz kas hücresi ve makrofaj içeren arter duvar hücreleri içinde de bulunur (76). PON2 özellikle immün etkili hücrelerde eksprese olur ve kronik inflamasyon durumlarında makrofaj fonksiyonlarını düzenlemede rol oynar. Açıl homoserin lakton tüm PON'ların substratıdır ancak PON2 en yüksek spesifik aktivite göstermektedir (14). Tüm PON'lar, LDL oksidasyonunu engelleyebilme özelliği gösterirken PON2 hücrel oksidatif stresi azaltma ve vasküler endotel hücrelerinde apoptozu engelleme özelliğine sahiptir (87). PON2, biri alanin glisin (G148A) diğeri sistein serin (C311S) yer değişimi ile oluşan iki polimorfik formu vardır (82, 86).

PON3, 40 kDa molekül ağırlığında, ağırlıklı olarak karaciğerde, daha az seviyede de böbrekte eksprese edilen, HDL ile ilişkili fakat bu ilişki PON1'e göre çok daha düşük seviye olan antioksidan özellikli enzimdir (76, 88).

PON1 ve PON3, esas olarak HDL'ye bağlı iken PON2 oldukça geniş yayılım gösteren hücrel antioksidandır. PON1 esterase ve laktonaz aktivitesine sahipken PON2 ve PON3 sadece laktonaz aktivitesine sahiptir (87). Ancak PON3 kısıtlı arilesteraz aktivitesi de göstermektedir (88).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri, kodları ve üretici firmaları.

Cihazlar	Üretici Firma	Kod	Üretici Ülke
Spektrofotometre	Molecular Devices Paradigm	33270-1195	Avusturya
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-visible	A10753680896	Avustralya
Spektrofotometre	Molecular Devices Versa max	BNR06078	A.B.D
LightCycler 480 II	Roche	27479	İsviçre
Sonikatör	Sonics Vibra-Cell	42174L	A.B.D
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow	40475981	Almanya
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse, TS100	604279	Japonya
CO ₂ inkübatör	Hera Cell 240, Heraeus	301896	A.B.D
Santrifüj	Eppendorf 5804	11259	Almanya
Hassas terazi	Mettler Toledo	AB204S	İsviçre
pH metre	Hanna Instrument	HI2211	Romanya
Derin dondurucu -80 °C	Thermo Electron Corporation	808045-504	A.B.D
Vorteks	IKA Vortex Genius 3	01. 493782	Almanya
Etüv	Heraeus	40474483	Almanya
Nanodrop	Thermo Scientific 2000	6902	A.B.D
Sarf Malzemeler	Üretici Firma	Kod	
Mikropipetler			
10 µL	Genex Beta	CQ62419	
20 µL	Socorex	18121097	
100 µL	Socorex	14072249	
1000 µL	Socorex	14082460	
Steril falkon tüpler			
15 mL	CELLSTAR	188 271	
50 mL	CELLSTAR	227 261	

Steril Pipet uçları		
10 µL	Axygen	301-03-301
20 µL	Axygen	A14021YJ
100 µL	Axygen	301-02-411
1000 µL	Greiner bio-one	A120503Y
96 Kuyucuklu pleyt	Costar	3599
Cam malzemeler		
(beher, erlen, balon		
joje, cam şişe)		

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, formülleri, ürün kodları ve üretici firmaları.

Kullanılan kimyasal maddeler	Formül	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Penisilin-streptomisin	-	Biological Industries, 1245637
Fetal Bovin Serum	-	Biochrom, S 0115
Tripsin EDTA Solüsyonu	-	Biological Industries, 1302762
Bovin Serum Albumin (BSA)	-	Sigma, Lot#058K0726
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	Sigma, Lot#34870, %99,8
Metanol	CH ₃ -OH	Merck, K27905808, %99.5
Hidroklorik asit	HCl	Merck, WN 1789, %37
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	Merck, A678671, %98
diPotasyum hidrojen fosfat.trihidrat	K ₂ HPO ₄	Merck, A676299, %99
Triton X-100	-	Sigma, Lot#MKBH7028V
diSodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	Merck, K16290176, %98.5
Sodyum dihidrojen fosfat	NaH ₂ PO ₄	Merck, K12917045, %98
Potasyum klorür	KCl	Merck, TA771535, %99
Sodyum klorür	NaCl	Merck, K33224404, %99.5
RPMI 1640	-	Lonza, BE 12-115F
Kalsiyum klorür	CaCl ₂	Sigma, 124K1484, %98
Kateşin	-	Sigma, Lot#SLBC4830V, %99
Dihidroksümarin	C ₉ H ₈ O ₂	Aldrich, Lot#S36575-346, %99
Paraokson	-	Sigma, D9286-1G, %90
Commasie Brilliant Blue	-	Serva, 35050, %91
Tripan Blue	-	Sigma, T8154
MTT boyası	-	Sigma, M2128

5.2 Yöntem

5.2.1. Çözünür Siyah Çay ve Kontrol Numunelerinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan çözünür siyah çay, 1007 TÜBİTAK projesi kapsamında Doç. Dr. Cesarettin Alasalvar ve ark. tarafından üretilmiş, kimyasal içerikleri belirlenmiş ve insanların içimine (şeker hariç) hazır hale getirilmiş çaydır. Çözünür siyah çay tozunun kimyasal bileşimi daha önce genel bilgiler kısmında verilmiştir. Tablo 6’da çözünür siyah çayın içime hazır bileşenleri verilmiştir.

Tablo 6. Çözünür siyah çayın içinde bulunanlar.

İçindekiler	(g)
Toz siyah çay	0.875
Sitrik asit	0.45
Sodyum sitrat	0.125
Siyah çay aroması	0.1
Şeftali aroması	0.025
Toplam	1.575

Çözünür siyah çay çözeltisi: Bu çalışmanın ana numunesidir. 0.5 g çözünür siyah çay 10 mL 45 °C’de ısıtılmış suyla çözülerek 50 mg/mL’lik konsantrasyonda hazırlandı. 0.22 µm’lik filtreden geçirildi. Sitotoksisite çalışmaları için 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2500 µg/mL çözünür siyah çay konsantrasyonları olarak kullanıldı. Ardından sitotoksisite sonuçları göz önüne alınarak 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonları ile devam edildi.

Sitrik asit/sodyum sitrat çözeltisi: Çözünür siyah çayın etkisine, karışımı oluşturan toz siyah çaydan sonraki en fazla bileşen olan sitrik asit ve sodyum sitratın etkisini de tespit etmek için oluşturulan kontrol numunesidir. Çözünür siyah çay karışımında 0.45 g (% 25.57) sitrik asit ve 0.125 g (% 7.94) sodyum sitrat olduğundan ikisi birlikte karışımın % 36.51’ini oluşturmaktadır. 0.14 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ve 0.04 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 10 mL deiyonize suda çözüldü. Sitotoksisite çalışmaları için çözünür siyah çayın içeriğine denk gelen 18.25, 36.5, 91.25, 182.5, 365 ve 912.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat kullanıldı. Sitotoksisite sonuçlarına göre hücre kültürü ortamına 18.25 µg/mL (50 µg/mL’lik

çözünür çayın % 36.51'i) ve 36.50 µg/mL (50 µg/mL'lik çözünür çayın % 36.51'i) olacak şekilde ilave edilerek ilerleyen çalışmalar yapıldı.

Kateşin çözeltisi: Siyah çayın da dahil olduğu *Camellia Sinensis* çaylarının ana kimyasallarından biri olan kateşin kontrol numunesi olarak kullanılmıştır. 29 mg 1 mL etanolde çözündü. Daha sonra bu çözeltiden 50 µL alınıp 450 µL etanolde tekrar çözöldü.

Sitotoksisite çalışmaları için 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 µM kateşin kullanıldı. Sitotoksisite sonuçları göz önüne alınarak 100 µM (27.3 µg/mL) ve 250 µM (68.25 µg/mL) konsantrasyonları ile çalışmanın ilerleyen aşamaları yapıldı.

5.2.2. Hücre Kültürü

Kullanılan Çözeltiler

Besiyer çözeltisi: 442.5 mL RPMI 1640 konsantre çözeltisine 50 mL FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

PBS (Fosfat tamponu), 0.01 M, pH 7.4: 10 adet PBS tableti içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözöldü, pH'sı 7.4'e ayarlandı ve son hacmi 1 L'ye tamamlanarak otoklavlandı.

5.2.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde steril ortamda gerçekleştirildi. Her çalışma öncesi ve sonrası kabin ve kullanılacak malzemeler % 70'lik etanol ile silindi. Çalışmalar sonunda hücre kültürü odası UV ışığa maruz bırakılarak tekrar kullanıma hazır halde bırakıldı.

HepG2 hücreleri, GATA Kanseri Kök Hücre ve Tıbbi Araştırma Laboratuvarı'ndan, Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ferit AVCI aracılığı ile temin edildi.

- HepG2 hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve son hacim L-Glutaminli, % 10 FBS ve % 1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
- Hücre süspansiyonları 130 x g'de 6 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonunda süpernatant kısımları son 1 mL'si hariç uzaklaştırıldı. Hücre çökelekleri tüpün ucuna parmak ucuyla vurulmak suretiyle hareketlendirilerek kendi besiyerinde çözüldü.
- Çözülen hücrelerin üzerine 15 mL RPMI 1640 besiyeri eklendi ve hücreler % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de, T-75'lik flasklarda inkübatörde çoğaltıldı.

5.2.2.2. HepG2 Hücre Serilerinin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması

Çoğalan hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

- Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
- 8 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 75 cm²'lik flasklara, 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyon sonrası 9 mL % 10 FBS içeren RPMI 1640 ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- Tripsinizasyon sonrası 1 mL besiyeri içinde sulandırılmış hücre süspansiyonundan 10 µL'si 0.5 mL hacimli kapaklı tüpe alınarak 10 µL tripan blue ile karıştırıldı karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışım pipetajlanarak 10 µL alındı ve neubauer hematositometre lamına aktarıldı.
- İnvert mikroskop ile bakıldığında hematositometre lamı üzerinde 16'ya bölünmüş dört ayrı kare vardır. Çapraz iki kare içerisinde bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı; "sayılan hücre sayısı × seyreltme oranı × 10⁴" formülü kullanılarak hesaplandı (89).
- Tripan blue ile boyama metodunda; ölü hücreler işlev görmeyen Na⁺/K⁺ ATPaz pompaları nedeniyle boyayı absorblanmakta ve dışarı atamamakta, dolayısıyla canlı hücreler sarı-yeşil renkte gözükürlerken, ölü hücreler mavi renkte gözükmetedirler (90).
- Sayımı yapılan hücreler içerisinde 15 mL besiyeri bulunan 75 cm²'lik flasklara 2000-10000 hücre/cm² olacak şekilde hücre kültürü sürecine devam edildi.

Her hücre serisinin her sağlıklı pasajından ilerleyen süreçlerde olası kontaminasyonlara karşı önlem olması açısından yedeklemeler yapıldı. Bu amaçla sayımı yapılan her hücre serisinden 10^6 hücre süspansiyonu kriyoviallere aktarıldı, son hacim besiyeri ile 950 μL 'ye tamamlandı ve üzerine % 5 olacak şekilde 50 μL steril DMSO ilave edildi. Kriyovialler $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 gün bekletildi ve sonrasında uzun süre saklanmak üzere sıvı azot tankına alındı.

5.2.2.3. Sitotoksite Deneyleri

Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyasını mor renkli formazan ürününe dönüştürürler. Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri DMSO ile çözündürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır (91).

Kullanılan Çözelti

MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL): 1000 mg MTT boyası 6 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldükten sonra hacmi steril PBS ile 200 mL'ye tamamlandı. İşlemler manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı. Tamamen çözüldükten sonra 0.22 μm 'lik filtreden geçirilerek 1'er mL (5 mg/mL) hacimlerde sonraki deneylerde kullanılmak üzere $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

MTT testi

- Tripsinizasyon ile flasklardan kaldırılan HepG2 hücreleri sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 5000 hücre düşecek şekilde 200 μL besiyeri eklendi.
- 24 saat sonra pleytler inkübatörden alınarak içerikleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200'er μL taze besiyeri eklendi. Taze besiyerleri üzerine son konsantrasyonları (50, 100, 250, 500, 1000 ve 2500 $\mu\text{g/mL}$ çözünür siyah çay; bunun içeriğine denk gelen 18.25, 36.5, 91.25, 182.5, 365 ve 912.5 $\mu\text{g/mL}$ sitrik asit/sodyum sitrat; 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 μM kateşin) uygun hacimlerde ilaveler yapıp hücrelerin bu maddeler ile $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 12, 24 ve 48

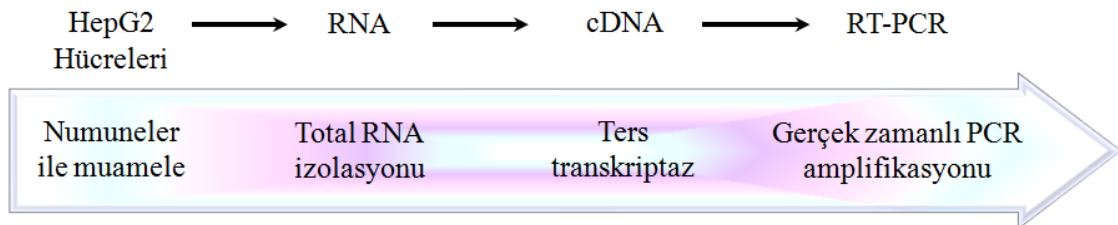
saat inkübasyonları sağlandı. Hücre serisi için kullanılan maddelerin tüm konsantrasyonları 6 kuyucuk olarak planlandı, 3 kuyucuk sonucu işleme alındı.

- İnkübasyondan sonra pleyt içerikleri uzaklaştırıldı ve bütün kuyucuklara 190'ar µL taze besiyeri eklendi. Her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde 10'ar µL MTT boyası eklendi ve pleytler 2 saat 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200'er µL DMSO eklendi ve pleytler formazan kristallerin çözünmesi için 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
- Süre sonunda kuyucuklardaki kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği invert mikroskop altında kontrol edildi.
- Her bir kuyucukta oluşan mor rengin absorbansı mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda okundu. Her örneğin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin, kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak her bir maddenin her bir konsantrasyonu için % hücre canlılığı bulundu. MTT testi sonucunda numunelerin her bir konsantrasyonu için aşağıdaki formüle göre % hücre büyüme inhibisyonu değerleri optik dansitelerine göre hesaplandı.

$$\% \text{ hücre büyüme inhibisyonu} = [100 - (\text{OD}_{\text{numune}}/\text{OD}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

5.2.3. PON1 Gen Ekspresyonu

PON1 gen ekspresyonlarının tayini için Şekil 13'de şematize edilmiş işlem serisi uygulandı.



Şekil 13. HepG2 hücrelerinde PON1 gen ekspresyonu aşamaları.

5.2.3.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, ref:11.828.665.001) kullanıldı. Kit, liziz/bağlama tamponu, DNAaz, DNAaz inkübasyon tamponu, yıkama tamponları (1 ve 2) ve elüsyon tamponunda oluşmakta idi.

Tüm numunelerle 12, 24 ve 48 saatlik muamele edilen ve hücre kültürü ortamından alınan hücreler (1×10^6 hücre) $130 \times g$ 'de 6 dakika santrifüj edildi. Ardından aşağıda sıralanan uygulamalar ile RNA izolasyonu yapıldı.

- RNA izolasyonundan önce hücre kültürü ortamından alınan hücreler (1×10^6 hücre) $130 \times g$ 'de 6 dakika santrifüj edildi.
- 200'er μL PBS ile çözülen hücre pelletleri üzerine 400'er μL liziz/bağlama tamponu ilave edildi ve karışım 15 saniye vortekslendi.
- 600'er μL karışım fitreli tüplere aktararak $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlendi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Her bir filtre üzerine 90'ar μL DNase 1 inkübasyon tamponu ve 10'ar μL DNase 1 ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- Filtrelere 500'er μL yıkama tamponu 1 ilave edildi ve tüpler $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlendi.
- Toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 500'er μL yıkama tamponu 2 ilave edildi ve tüpler $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlendi.
- Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 200'er μL yıkama tamponu 2 çözeltisinden ilave edildi ve tüpler $13000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlendi.
- Filtreler dikkatli bir şekilde toplama tüplerinden çıkarılarak yeni steril tüplere aktarıldı. Her bir filtre üzerine 50'şer μL elüsyon tamponu ilave edildi ve tüpler $8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi.

Filtrelerden tüplere geçen RNA örneklerinin saflık dereceleri spektrofotometrik (NanoDrop 2000, Thermo) olarak absorbans değerleri A260/A280 oranı ve dolayısı ile

kalitesi belirlendi. Tüm numuneleri için bu oran 2'nin üzerinde olanlar saf RNA olarak kabul edildi. Elde edilen RNA'lar cDNA dönüşümü yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

5.2.3.2. cDNA Sentezi

cDNA (komplementer DNA) sentezi için cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Cat. No:04 896 866 001) kullanıldı. Reaksiyon karışımı Tablo 7'de verilen bileşenlerden oluşmakta idi.

Tablo 7. cDNA sentezi reaksiyon karışımı.

	Hacim
Transkriptör ters transkriptaz	50 µL (20 U/µL)
Transkriptör reaksiyon tamponu (5×)	1 mL
Koruyucu RNaz inhibitörü	100 µL (40 U/µL)
Deoksinükleotid karışımı	200 µL
Bağlı-oligo(dT) ₁₈	200 µL (50 µM)
Random hekzamer pirmeri	200 µL (600 µM)
Su, PCR-saflığında	2 mL

- Total RNA'lar oda sıcaklığına getirildikten sonra ısı bloğunda 65 °C'de 10 dakika bekletildi ve tekrar A260/280 oranı ölçüldü. Bu oran göz önüne alınarak tüm konsantrasyonlar en düşük konsantrasyondaki örneğin değerine yakın olacak şekilde elüsyon tamponu kullanılarak eşitlendi.
- 250 µL'lik PCR tüplerine Tablo 7'e göre hazırlanan karışımdan 10 µL konulup üzerine 10 µL izole edilen total RNA numuneleri eklendi.
- Gen amplifikasyon cihazında (Gen Amp PCR System 9700) 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 1 saat ve 85 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

Elde edilen numunelerin absorbansı nanodrop ile ölçülerek A260/A280 oranları belirlendi. Bu oranlar yaklaşık 1.8 civarında idi. Gruplar arasında konsantrasyon farkı olmaması için cDNA konsantrasyonları eşitlendi ve sonrasında RT-PCR aşamasına geçildi.

5.2.3.3. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR: RT-PCR)'da PON1 geni ve internal kontrol geni olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni ekspresyonu için Real Time Ready Catalog Assay (PON1 gene, Roche, ref:05532957001, config. no:100079078; GAPDH gene, Roche, ref: 05532957001, config. no:100079087) ve Light Cycler 480 Probes Master (Cat no:04 707 494 001) kullanıldı.

Primer dizileri

Roche Real time ready PON Assay ID: 105300,

İleri primer dizisi: 5'-CCCTCATGGGATTAGCACA-3',

Geri primer dizisi : 5'- ACTTGGCATCTGGATGGTTC-3'

Roche Real time ready GAPDH Assay ID: 141139,

İleri primer dizisi: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

Geri primer dizisi : 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3')

Spesifik olarak üretilen UPL proplar kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche LightCycler 480 II marka cihaz ile RT-PCR gerçekleştirildi.

Tablo 8. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon karışımı.

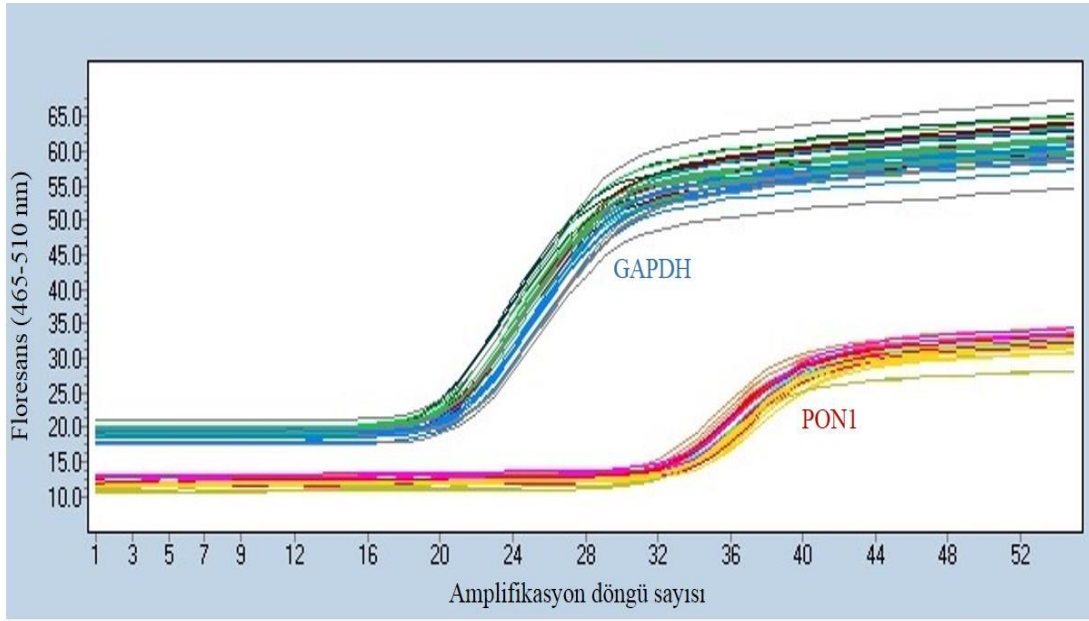
Reaktif (PON1 ve GAPDH için)	Hacim (µL)
LightCycler 480 Probes master	10
Real time ready assay	1
PCR saflığında su	4

- RT-PCR pleytlerinin her bir kuyucuğuna Tablo 8'de belirtilen reaksiyon karışımı (15 µL) ilave edildi. Üzerine 5'er µL cDNA'lar ilave edildi. Her bir numune 3 kez çalışıldı.
- Pleytin üzeri şeffaf folyo (LightCycler 480 Sealing Foil, Cat. no: 04 729 757 001, Lot no:13048402) ile hava almayacak şekilde kapatıldı. Sonra 1500 x g'de 2 dakika santrifüj edilip cihaza verildi.

- Cihaz ayarları Tablo 9’da verilen şablona göre düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 9. RT-PCR protokolü.

Program	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	-	
Amplifikasyon	Kantifikasyon	
Soğutma	-	
Hedef Sıcaklık °C	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon		
95	10 dakika	4.4
Amplifikasyon		
95	10 saniye	4.4
60	30 saniye	2.2
72	1 saniye	4.4
Soğutma		
40	30 saniye	2.2



Şekil 14. RT-PCR amplifikasyon eğrileri.

Roche LightCycler 480-II cihazı ile ölçüm yapılarak Advanced Relative Quantification programı ile sonuçlar analiz edildi. Bu program ile amplifikasyon döngüsüne karşılık floresans değişimi grafiği oluşturuldu (Şekil 14). Hedef genin (PON1) floresans sinyali artışına başlaması için geçen amplifikasyon döngü sayıları internal kontrol genin (GAPDH) döngü sayılarına oranlandı. Daha sonra çözünür siyah çay, sitrik asit/ sodyum sitrat ve kateşin ilaveleri ile hazırlanan numunelerin verileri, negatif kontrol numunelerin verilerine oranlandı. Böylece nispi gen ekspresyon değerleri elde edilmiş oldu.

5.2.4. PON1 Aktivitelerinin Tayini

PON1 aktiviteleri için önce hücre hemolizatlari hazırlandı. Sonra bu hücre lizatlarında PON1'in paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri tayin edildi.

5.2.4.1. HepG2 Hücre Lizatı Hazırlanması

Kullanılan çözeltiler

PBS (Fosfat Tamponu), 10 mM, pH 7.4: 8.02 g NaCl, 0.18 g KCl, 0.863 g Na₂HPO₄, 0.471 g NaH₂PO₄ tartılarak 900 mL kadar saf su ile çözünmesi sağlandı. pH'sı 7.4'e ayarlanarak saf su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. 0.22 µm'lik steril filtre ile süzüldü ve +4 °C'de saklandı.

Liziz tamponu: 10 mM'lık PBS'den 10 mL boş bir behere aktarılıp üzerine 20 µL Triton X-100 ilave edilip iyice çözünmesi sağlandı.

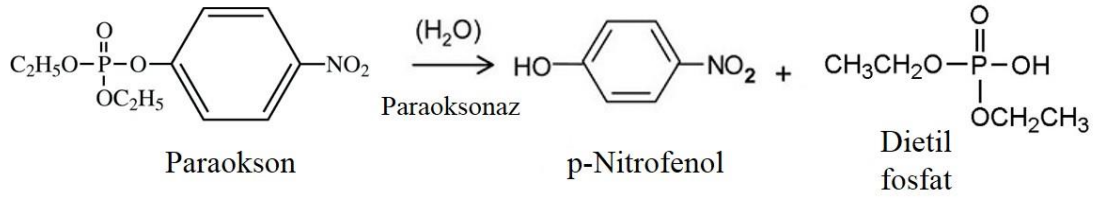
Hücre lizatlarının hazırlanması

1×10⁶ HepG2 hücreleri son konsantrasyonları 50 ve 100 µg/mL çözünür siyah; 18.25 ve 36.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat; 100 ve 250 µM kateşin olacak şekilde ilave edilerek 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı ve hücre kültürü sitotoksisite çalışması basamakları aynen uygulandı. Ardından:

- HepG2 hücreleri alınıp 15 mL'lik falkonlara aktarıldı, 130 x g'de 6 dakika santrifüj edildi ve üzerlerindeki sıvı atılıp sadece hücreler kaldı.
- Hazırladığımız soğuk PBS'den 500'er µL falkonlara ekleyip iyice pipetaj yapıldı ve 1.5 mL'lik ependorflara aktarıldı.
- Ependorfları santrifüj cihazına yerleştirip 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atılıp, 500'er µL soğuk PBS eklendi ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Tekrar süpernatantlar atılıp ependorflara 1 mL liziz tamponundan eklendi ve 1 dakika 80 kHz ile sonike (Sonics Vibra-Cell, 42174L) edildi.
- Ependorflar 20 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı aktivite tayinlerinde kullanıldı.

5.2.4.2. Paraoksonaz Aktivitesi Tayini

PON1 enzimi paraoksonaz enzim aktivitesi ile paraoksonu (O,O-dietil-Op-nitrofenol fosfat) hidrolize ederek dietil fosfat ve p-nitrofenole ayırır (Şekil 15). P-nitrofenolün 405 nm'deki absorbanşı, PON1'in paraoksonaz aktivitesi ile doğru orantılıdır (95).



Şekil 15. Paraoksonun paraoksonaz enzimi ile ürünlerine dönüşmesi (92).

Kullanılan Çözeltiler

Tampon (100 mM Tris - 2 mM CaCl₂, pH:8.0): 1.454 g Tris ve 0.0266 g CaCl₂ tartılıp üzerine 80 mL saf su ilave edildikten sonra iyice çözülmesi sağlandı. pH'sı HCl ile 8'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Paraokson: Boş bir ependorfa 493 µL etanol konuldu ve üzerine 7 µL paraokson ilave edilip iyice vortekslendi. Karanlık ortamda muhafaza edildi.

Aktivite Tayini

Aktivite ölçümü için Tablo 10'da belirtilen pipetlemeler uygulandı.

Tablo 10. Paraoksonaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı.

	Numune (µL)	Kör (µL)
Hücre lizati	50	-
Tris baz + CaCl ₂	240	240
Paraokson	10	10
dH ₂ O	-	50

Versamax Microplate Reader cihazında, 37 °C'de, 412 nm dalga boyunda, 3 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve aşağıdaki formüle göre enzim aktiviteleri hesaplandı (93).

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dakika}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times f \times V_s}$$

V_t : Toplam hacim (μL)

V_s : Numune hacmi (μL)

ϵ : Molar absorbtivite sabiti (412 nm için $18050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

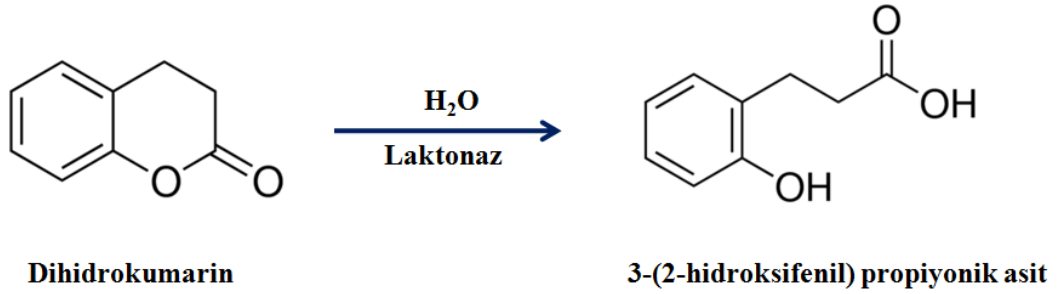
f : Işık yolunun uzunluğu (cm)

ΔA : 1 dakikadaki absorbans farkı ($A_{2. \text{okuma}} - A_{1. \text{okuma}}$).

PON1 paraoksonaz aktivitesi, toplam protein değerlerine oranlandı ve mU/mg protein olarak sonuçlar verildi.

5.2.4.3. Laktonaz Aktivitesi Tayini

PON1 enzimi laktonaz enzim aktivitesi ile dihidrokumarini hidrolize ederek 3-(o-hidroksifenil) propiyonik aside çevirir (Şekil 16).



Şekil 16. Dihidrokumarinin laktonaz aktivitesi ile ürüne dönüşmesi.

3-(o-hidroksifenil) propiyonik asidin 270 nm'deki absorbansı, PON1'in laktonaz aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözütiler

50 mM Tris, pH:8.0: 0.647 g Tris 80 mL saf suda çözöldü. pH'sı HCl ile 8'e ayarlanıp son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM'lık CaCl_2 : 0.261 g CaCl_2 tartılıp 80 mL saf suda çözöldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Dihidrookumarin: 974.4 µL metanol üzerine 25.6 µL dihidrookumarin ilave edilip iyice vortekslendi. Karanlıkta muhafaza edildi.

Aktivite Tayini

Aktivite ölçümü için Tablo 11’de belirtilen pipetlemeler uygulandı.

Tablo 11. Laktonaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı.

	Numune (µL)	Kör (µL)
Hücre lizatu	5	-
Dihidrookumarin	10	10
CaCl ₂	85	85
Tris-baz	900	900
dH ₂ O	-	5

Aktivite ölçümleri için SHIMADZU UV-1601 cihazında, 37 °C’de, 270 nm dalga boyunda, 3 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbands alınarak aşağıdaki formüle göre numunelerdeki enzim aktivitesi hesaplandı (94).

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dakika}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times f \times V_s}$$

V_t: Toplam hacim (µL)

V_s: Numune hacmi (µL)

ε: Molar absorbtivite sabiti (270 nm için 1295 M⁻¹ cm⁻¹)

f: Işık yolunun uzunluğu (cm)

ΔA: Son absorbands ile ilk absorbands arası fark (A₂ – A₁).

PON1 laktonaz aktivitesi, toplam protein değerlerine oranlandı ve U/mg protein olarak sonuçlar verildi.

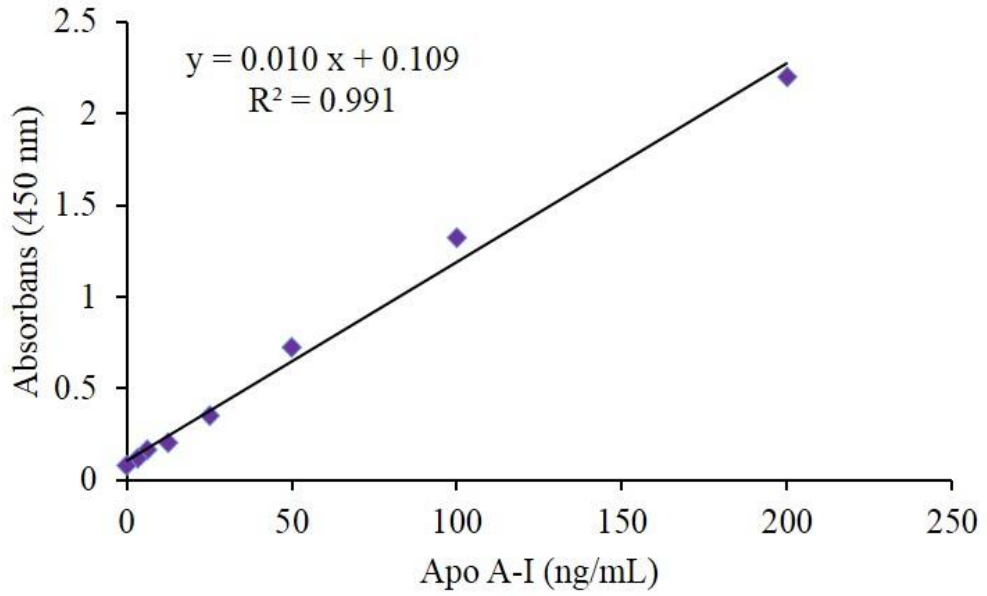
5.2.5. Apo A-I Tayini

Apo A-I tayini için önce hücre lizatları PON1 aktivite tayininde anlatıldığı gibi hazırlandı. Daha sonra ticari ELISA Kiti (Elabscience, E-EL-H0125) aşağıda belirtilen şekilde kullanılarak Apo A-I seviyeleri belirlendi. Kitte Apo A-I'in 19-267. amino asitlerde bağlanma gerçekleşmekte idi.

İnkübasyonlar karanlık ortamda ve çalkalayıcıda yapıldı.

- 96'lık pleyt kuyucuklarına 100'er μL standartlardan, körden ve numunelerden ilave edilerek 90 dakika, 37 °C'de bekletildi.
- Kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile yıkanarak 100 μL biyotinli antikor ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- Kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 μL HRP (Horseradish peroxidase) konjugatı ilave edildi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 90'ar μL substrat çözeltisi eklenip 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 50'şer μL reaksiyon durdurma çözeltisi ilave edilerek hemen 450 nm'de absorbansları okundu.

Standart grafik (Şekil 17) yardımıyla numunelerdeki Apo A-I konsantrasyonları hesaplandı. Apo A-I değerleri, protein değerlerine göre standardize edilmek için protein tayini sonucu elde edilen protein değerlerine bölündü. Dolayısı ile her bir numune için Apo A-I değerleri ng/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 17. Apo A-I standart grafiği.

5.2.6. Protein tayini

HepG2 hücrelerinden elde edilen lizatın protein tayini Bradford metodu (95) ile yapıldı. Bu metodun prensibi; organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

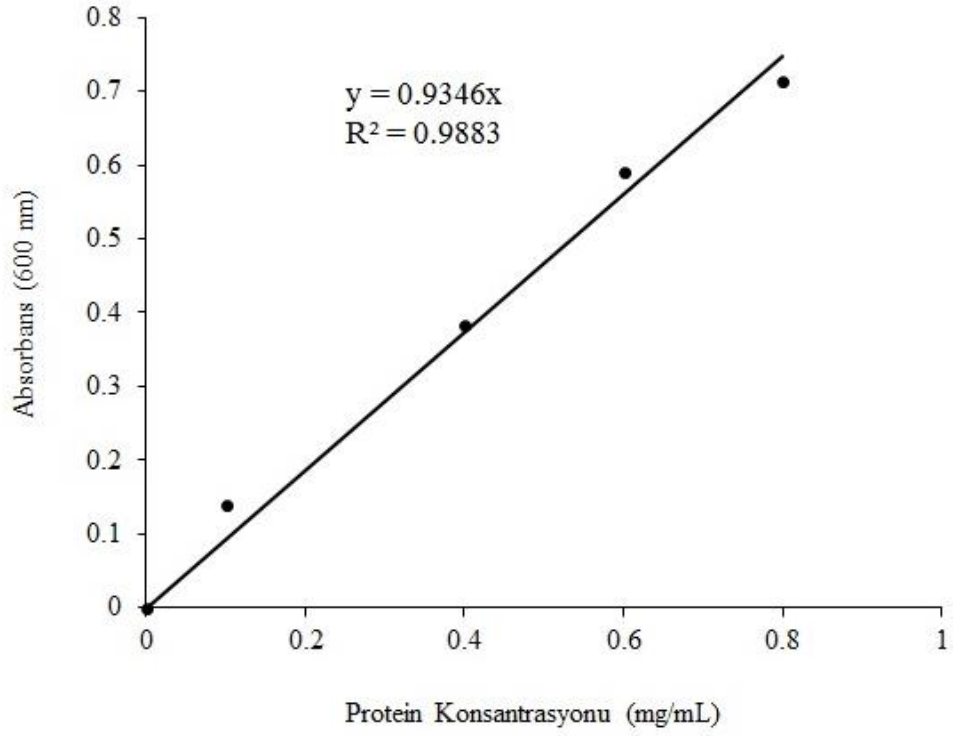
Bradford reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 mL % 95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 10 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sığır Serum Albümini: 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 ve 0.05 mg/mL konsantrasyonlarında albümin standartları hazırlandı.

Bradford metodunun hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Bu nedenle hazırlanan hücre lizatı 2 kat distile su ile seyreltilmiştir. Tablo 12'e göre pipetlemeler yapıldı ve 600 nm'de absorbansları okunarak standart grafik (Şekil 18) yardımıyla sonuçlar hesaplandı.

Tablo 12. Protein tayini (Bradford) deney basamakları.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Distile Su	10	-	-
Standart	-	10	-
Numune	-	-	10
Bradford Reaktifi	100	100	100
Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.			
600 nm’de absorbanları okundu.			



Şekil 18. Protein tayini standart grafiği.

5.3. İstatistiksel Analizler

Her gruba ait değerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu “Kolmogorov-Simirnov” testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan parametreler “One way ANOVA” testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için “Post-hoc Tukey” analizi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Sitotoksosite Sonuçları

Tablo 13’de çözünür siyah çayın, sitrik asidin ve kateşinin farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine sitotoksik etkileri gösterilmektedir.

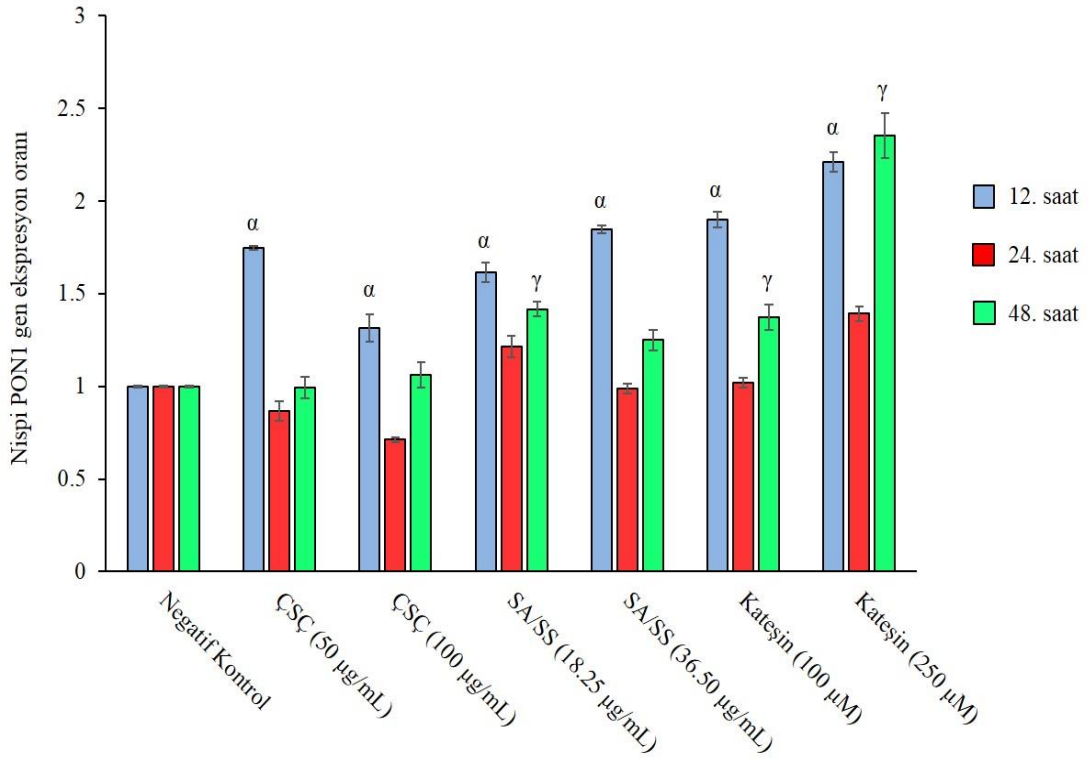
Tablo 13. HepG2 hücrelerinde % canlılık sonuçları (n=3).

ÇSÇ	(µg/mL)	50	100	250	500	1000	2500
	% canlılık	119±1,28	100±1,57	55±0,95	30±1,47	24±0,27	25±0,28
SA/SS	(µg/mL)	18,25	36,50	91,25	182,5	365	912,5
	% canlılık	109±3,60	114±1,59	116±1,14	115±1,79	107±0,84	84±1,58
Kateşin	(µM)	25	50	100	250	500	750
	% canlılık	123±1,61	115±1,74	116±1,71	106±1,63	98±0,46	89 ±0,99

ÇSÇ: çözünür siyah çay; SA/SS: sitrik asit/sodyum sitrat. Ortalama ± standart hata. 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık oranları en yüksek veriler göz önüne alındığında 50 µg/mL ve 100 µg/mL çözünür siyah çay (ÇSÇ); bunun bileşimine denk gelen 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS); 100 µM ve 250 µM kateşin konsantrasyonları çalışmanın ilerleyen evrelerinde kullanılmıştır.

6.2. Çözünür Siyah Çayın PON1 Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Şekil 19’da iki farklı konsantrasyonda hazırlanan çözünür siyah çay, sitrik asit/sodyum sitrat ve kateşin numunelerinin HepG2 hücre serilerindeki PON1 gen ekspresyonlarına etkileri nispi oran olarak gösterilmektedir.



Şekil 19. Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 24 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda PON1 gen ekspresyonlarına etkisi. ^α 12. saatte, ^γ 48. saatte negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0.05$ (n=3).

Negatif kontrol (herhangi bir numune ilave edilmeyen) HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında 12. saatte tüm numunelerin, PON1 gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu görüldü ($p < 0.05$). En fazla artış 250 µM'lık kateşin inkübasyonu ile tespit edildi. Artış miktarları yüksekten düşüğe doğru sıralaması ise 100 µM'lık kateşin, 36.5 µg/mL'lik SA/SS, 50 µg/mL'lik ÇSÇ, 18.25 µg/mL SA/SS ve 100 µg/mL ÇSÇ şeklinde idi. Kateşin 250 µM, kateşin 100 µM'e göre istatistiksel olarak daha fazla artışa neden olduğu ($p < 0.05$) ancak SA/SS'nin 2 farklı konsantrasyonları arasında anlamlı farkın olmadığı gözlemlendi ($p < 0.05$). ÇSÇ ise düşük konsantrasyonu 50 µg/mL'lik konsantrasyonu 100 µg/mL'lik konsantrasyona göre daha yüksek artış gösterdi ($p < 0.05$).

24. saatte numunelerin hiçbirisi PON1 ekspresyonları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi ($P > 0.05$).

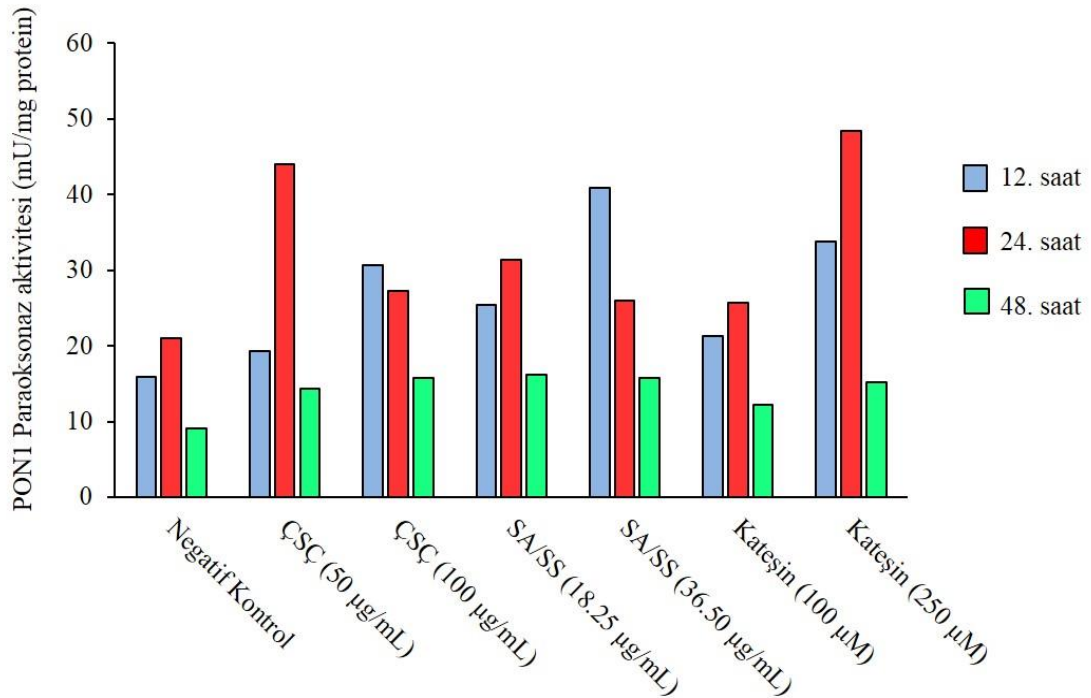
48. saatte 18,25 µg/mL’lik SA/SS, 100 ve 250 µM’lık kateşin numunelerinin ekspresyon artışına neden olduğu belirlendi ($p<0.05$).

İnkübasyon saati farklılığına göre PON1 ekspresyonları incelendiğinde 250 µM’lık kateşin hariç, diğer numuneler 12. saatte daha yüksek ekspresyon gösterirken 24. ve 48. saatte ise daha az ekspresyon gösterdiği tespit edildi.

Bu veriler göz önüne alındığında 250 µM’lık kateşinin en etkili PON1 gen ekspresyon artışına neden olduğu ifade edilebilir.

6.3. Çözünür Siyah Çayın PON1 Paraoksonaz ve Laktonaz Aktivitelerine Etkileri

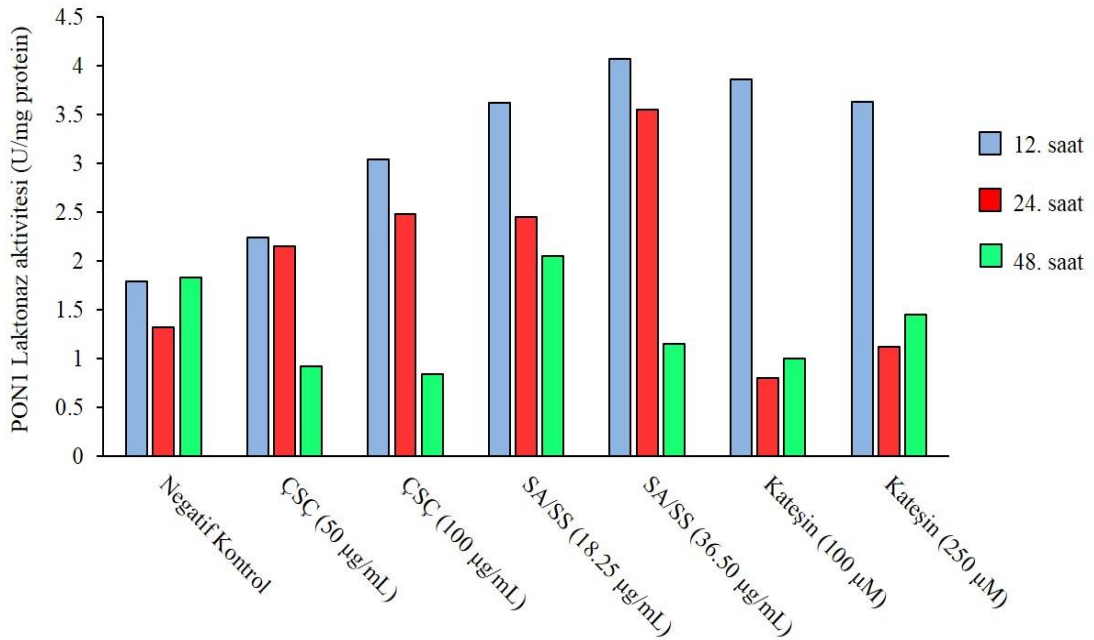
Çözünür siyah çay, sitrik asit/sodyum sitrat ve kateşinin iki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücre serilerindeki PON1 paraoksonaz aktivitelerine etkileri Şekil 20’de, PON1 laktonaz aktivitelerine etkileri Şekil 21’de gösterilmektedir.



Şekil 20. Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 24 ve 48 saat’lik inkübasyonu sonucunda PON1 paraoksonaz aktivitelerine etkisi. Ortalama değere göre çizilmiştir (n=2).

Şekillerde paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri toplam protein değerlerine oranlanarak verilmiştir. Numunelerin negatif kontrol ile karşılaştırma sonucunda kaç kat değişim gösterdiği de aşağıda açıklanmıştır.

HepG2 hücrelerinin 50 µg/mL ve 100 µg/mL ÇSÇ; 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL SA/SS; 100 µM ve 250 µM kateşin numuneleri ile inkübasyonları sonucu negatif kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında PON1 paraoksonaz aktivite verilerinde sırasıyla 12. saatte 1.2, 1.9, 1.6, 2.6, 1.3 ve 2.1 kat; 24. saatte 2.1, 1.3, 1.4, 1.2, 1.2 ve 2.3 kat; ve 48. saatte 1.6, 1.7, 1.8, 1.7, 1.3 ve 1.6 kat artış gözlemlendi. 12. saatte daha yüksek konsantrasyonlu numuneler daha fazla PON1 aktivitesi artışına neden olmuşken 24. ve 48. saatlerde dahil olmak üzere tüm veriler göz önüne alındığında PON1 aktivitesi arttırmada 250 µM kateşinin en etkili numune olduğu söylenebilir.

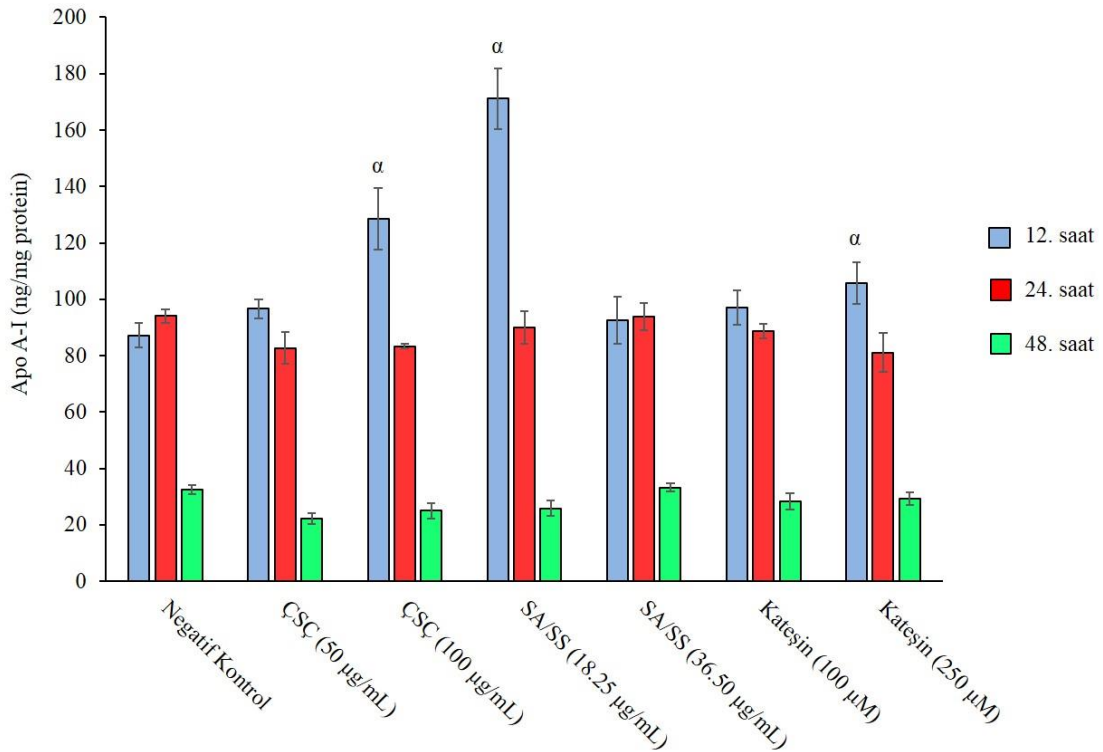


Şekil 21. Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 24 ve 48 saat'lik inkübasyonu sonucunda PON1 laktonaz aktivitelerine etkisi. Ortalama değere göre çizilmiştir (n=2).

Şekil 21’de görüldüğü gibi, HepG2 hücrelerinin 50 µg/mL ve 100 µg/mL ÇSÇ; 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL SA/SS; 100 µM ve 250 µM kateşin numuneleri ile inkübasyonları sonucu negatif kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında PON1 laktonaz aktivite verilerinde sırasıyla 12. saatte 1.2, 1.7, 2.0, 2.3, 2.1 ve 2.0 kat; 24. saatte 1.6, 1.9, 1.9 ve 2.7 kat artış gösterirken kateşin numuneleri azalış gösterdi. 48. saatte 18,25 µg/mL SA/SS numunesinde 1.1 kat artış hariç diğer numunelerde azalış gözlemlendi. SA/SS numunelerinin daha PON1 laktonaz aktivitesi artışına neden olduğu söylenebilir.

6.4. Çözünür Siyah Çayın Apolipoprotein A-I Düzeylerine Etkisi

Şekil 22’de iki farklı konsantrasyonda hazırlanan çözünür siyah çay, sitrik asit/sodyum sitrat ve kateşin numunelerinin HepG2 hücre kültür serilerindeki Apo A-I protein seviyelerine etkileri gösterilmektedir.



Şekil 22. Çözünür siyah çay (ÇSÇ), sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS) ve kateşin numunelerinin HepG2 hücrelerinde 12, 24 ve 48 saat’lik inkübasyonu sonucunda Apo A-I protein seviyelerine etkisi. ^α 12. saatte, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı, p<0.05 (n=3).

Kontrol HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında 12. saatte 100 µg/mL’lik çözünür siyah çay, 18,5 µg/mL’lik sitrik asit/sodyum sitrat ve 250 µM’lık kateşin numunelerinin, Apo A-I seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu tespit edilirken 24. ve 48. saatlerde numunelerin istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

Bu çalışma sonuçlarına bakıldığında genel olarak 12. saatte en belirgin artışlar gözlenirken 48. saate doğru gittikçe PON1 gen ekspresyonlarının ve paraoksonaz ve laktonaz aktivetelerinin azaldığı gözlenmektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çözünür siyah çay, özel işlemlerle tamamen toz haline getirilmiş, suda çözülebilen ve soğuk olarak da tüketilebilen bir siyah çay ürünüdür. Ülkemizde oldukça yüksek miktarda tüketilen siyah çay, *Camellia Sinensis* yapraklarının çay fabrikalarında işlenmesi ile elde edilmektedir. Çözünür toz haldeki çayın kolay çözünmesi ve soğuk olarak da tüketilebilmesi bir avantajdır.

Bu çalışmada kullanılan çözünür siyah çay, daha önceden Doç. Dr. Cesarettin Alasalvar tarafından TÜBİTAK 110G028 projesi kapsamında kimyasal analizleri yapılarak bileşenleri belirlenmiş ve insanlar üzerine kardiyovasküler etkileri değerlendirilmiş ancak kardiyovasküler etkileri henüz yayına dönüştürülmemiş bir çaydır. Çözünür siyah çay, siyah çayın ekstraksiyon, santrifüjleme, kurutma ve yığışma işlemleri sonucu elde edilmektedir. Bu çayda karbohidrat bileşimi oldukça yüksek olduğu, minerallerden potasyum, vitaminlerden pantotenik asit, flavonollerden epigallo kateşin, fenoliklerden tearubiginler, alkaloitlerden kafein, amino asitlerden teaninin yüksek miktarda bulunduğu belirtilmiştir (7).

Camellia Sinensis yapraklarından elde edilen çayların sağlık üzerine etkilerini değerlendiren çalışmalar mevcut olmasına rağmen çözünür siyah çayın lipid metabolizmasına etkilerine ait çalışmaya araştırdığımız kadarı ile rastlanılamamıştır.

Bu çalışma *in vitro* bir çalışma olup çözünür siyah çayın hepatosit hücre (HepG2) serilerinde kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir parametre olan HDL'nin en önemli antioksidan enzimi yani PON1 ekspresyonuna ve aktivitelerine (paraoksonaz ve laktonaz) ve HDL'nin en önemli bileşeni ve en fazla proteini olan Apo A-I seviyelerine etkileri incelendi.

Bu çalışmada çözünür siyah çaya ilaveten kontrol numuneleri olarak içilebilir çözünür siyah çay yüksek oranda bulunan sitrit asit/sodyum sitrat karışımı ve *Camellia Sinensis* bitkilerinden elde edilen çayların önemli bileşeni olan kateşin kontrol numuneleri olarak kullanıldı.

İlk önce MTT testi ile numunelerin HepG2 hücre serilerindeki sitotoksitesisi belirlendi. Bu amaçla hücre ortamına son konsantrasyonları 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2500 µg/mL ÇSÇ; bu çay konsantrasyonlara denk gelen 18.25, 36.5, 91.25, 182.5, 365 ve 912.5 µg/mL SA/SS; ve 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 µM kateşin olacak şekilde ilave

edilerek 48 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılık oranları belirlendi. MTT sonucuna göre canlılık oranları en yüksek veriler göz önüne alındığında (Tablo 13) 50 µg/mL ve 100 µg/mL çözünür siyah çay (ÇSC); bunun içeriğine denk gelen 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat (SA/SS); 100 µM ve 250 µM kateşin konsantrasyonlarının çalışmanın ilerleyen evrelerinde kullanılmasına karar verildi.

HepG2 hücre serilerinde PON1 gen ekspresyonları RT-PCR ile belirlendi ve nispi ekspresyon şeklinde değerlendirildi. Şekil 19’da gösterildiği gibi negatif kontrol HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında 12. saatte tüm numuneler, PON1 gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu ($p < 0.05$). Ekspresyon artışı oranı en fazla olandan en aza doğru sıralanışı 250 µM’lık kateşin > 100 µM’lık kateşin > 36.5 µg/mL’lik SA/SS > 50 µg/mL’lik ÇSC > 18.25 µg/mL SA/SS > 100 µg/mL ÇSC şeklinde idi. Ayrıca 250 µM’lık kateşinin, 100 µM’lık kateşine göre istatistiksel olarak daha fazla artışa neden olduğu ($p < 0.05$) ancak SA/SS’nin 2 farklı konsantrasyonları arasında anlamlı farkın olmadığı ($p < 0.05$), 50 µg/mL’lik ÇSC’nin 100 µg/mL’lik konsantrasyonuna göre daha fazla artış yönünde etki gösterdiği ($p < 0.05$) belirlendi. Diğer taraftan 24. saatte numunelerin hiçbirisi PON1 ekspresyonları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermezken ($P > 0.05$) 48. saatte 18.25 µg/mL’lik SA/SS, 100 ve 250 µM’lık kateşin numunelerinin PON1 ekspresyonunun artışına neden olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Inkübasyon saati farklılığına göre PON1 ekspresyonları incelendiğinde 250 µM’lık kateşin hariç, diğer numuneler 12. saatte daha yüksek ekspresyon gösterirken 24. ve 48. saatte ise daha az ekspresyon gösterdiği tespit edildi. Inkübasyon zamanı arttıkça ekspresyon etkisinin azalması ise zamanla ekspresyonu inhibe eden moleküllerin açığa çıkabileceğine veya mRNA’nın inkübasyon süresi artışıyla yıkılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bilgiler göz önüne alındığında 250 µM’lık kateşinin en etkili PON1 gen ekspresyon artışına neden olduğu ifade edilebilir. PON1 ekspresyona etki yönünden siyah çayda ziyade içilebilecek konumdaki siyah çay tozunda bulunan sitrik asit ve sodyum sitratın ve çay bitkisinin temel bileşenlerinden olan kateşinin çözünür siyah çaya göre daha etkili olduğunu söylemek mümkündür.

Hamelet ve ark. (97) çalışmalarına göre, hiperhomosisteinemili farelere kateşin verilmesi PON1 gen ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Ayrıca naringenin, kateşin ve kuersetin gibi diyet polifenoller, aril-hidrokarbon-reseptörü bağımlı mekanizma ile

PON1 gen ekspresyonlarını arttırdığı tespit edilmiştir (104). Nar suyu ve onun önemli polifenollerini olan punikalajin, gallik asit ve elajik asit ile hepatoma hücre serisi HuH7'ye DMEM medyumda 24 saat inkübasyonu ile yapılan bir çalışmada nar suyu ve polifenollerinin PON1 mRNA ekspresyonunu ve protein ekspresyonunu arttırdığı ancak fazla ekspresyon artışının gallik asit ve ardından punikalajin polifenollerini ile olduğu, nar polifenollerinin cAMP - Protein kinaz A yolu ile hepatositlerde PON1 gen ekspresyonunu uyardığı ifade edilmiştir (105). HepG2 ve HuH7 hepatositlerini bir alkoloid olan berberin ile muamele edildiğinde PON1 ekspresyonunun transkripsiyon seviyesinde arttığı ve burada JNK/c-Jun sinyal mekanizmalarının rol aldığı belirlenmiştir (106). Jaichander ve ark. (96), 0.25 mM ve 0.5 mM alkolik aspirin çözeltisinin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonu sonrası PON1 ekspresyonunu sırasıyla yaklaşık 2 kat ve 4 kat olmak üzere artırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca PON1 aktivitesinin ise her iki konsantrasyonda yaklaşık 2 kat arttığını gözlemişlerdir. Gouédard ve ark (107), DMSO'da çözünmüş fenofibrik asit ve fluvastatin ve simvastatin gibi statinlerle muamele edilmiş DMEM medyumlu HuH7 hepatosit hücre kültürü çalışmasında fenofibrik asidin PON1 ekspresyonunu arttırdığını ancak statinlerin PON1 ekspresyonlarını düşürdüğünü gözlemişlerdir. Bu çalışmaya zıt olarak, simvastatinin HepG2 hücrelerinde PON1 promoter aktivitesini 2 kat artırdığını ifade eden çalışmada mevcuttur (108). Akbiyık ve ark. (109), PPAR α ligantlarının sıçan karaciğer hepatoma hücresi MH-7777A kültüründe PON1 ekspresyonunu artışına neden olduğunu ancak insan karaciğer hepatoselüler karsinoma HepG2 hücre serilerinde herhangi bir artışa neden olmadığını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan okside fosfolipidler, hepatositlerde PON1 mRNA ekspresyonunu azalmaktadır (110). bin Ali ve ark. (111) lipopolisakkaritin erkek farede PON1 mRNA'yı azaltırken dişi farede arttırdığını belirlediği çalışma neticesinde PON1'in mRNA seviyesinde düzenlenmesinde cinsiyetin önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

PON1 ekspresyon ve aktivite çalışmalarında ve lipid metabolizması ile ilgili çalışmalarda HepG2 ve HuH7 hücre serileri kullanılmaktadır. HepG2 ve Huh7 hücreleri, HDL'nin önemli bir proteini olan Apo A-I ekspresyonu yönünden karşılaştırıldığında HepG2 daha fazla ekspresyon gözlemlenmiştir ancak 5-aza-deoksitidin HepG2 hücrelerinde Apo A-I mRNA ekspresyonlarında azalmaya neden olurken Huh7 hücrelerinde artmaya neden olmuştur (112). HepG2 hücrelerindeki Apo B ihtiva eden

lipoproteinlerin lipide fakir olduğunu ve Huh7 hücrelerinde VLDL daha fazla olduğunu ifade eden çalışma (113) olmasına rağmen Huh7 hücreleri Apo B ihtiva eden lipoprotein metabolizması modellerinde HepG2 hücrelerine göre herhangi bir avantajı olmadığını ifade eden çalışmada mevcuttur. Bizim çalışmada imkanlar çerçevesinde HepG2 hücre serilerini temin edebildik ve bu nedenle de çalışmayı hepG2 hücre serilerinde yürüttük.

Şekil 20’de numunelerin HepG2 hücre serilerindeki PON1 paraoksonaz aktivitelerine etkileri gösterilmektedir. HepG2 hücrelerinin 50 µg/mL ve 100 µg/mL çözünür siyah çay; 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat; 100 µM ve 250 µM kateşin numuneleri ile inkübasyonları sonucu kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında PON1 paraoksonaz aktivite verilerinde sırasıyla 12. saatte 1.2, 1.9, 1.6, 2.6, 1.3 ve 2.1 kat, 24. saatte 2.1, 1.3, 1.4, 1.2, 1.2 ve 2.3 kat ve 48. saatte 1.6, 1.7, 1.8, 1.7 1.3 ve 1.6 kat artış gözlemlendi. 12. saatte daha yüksek konsantrasyonlu numuneler daha fazla PON1 aktivitesi artışına neden olmuşken 24. ve 48. saatlerde dahil olmak üzere tüm veriler göz önüne alındığında PON1 aktivitesi arttırmada 250 µM kateşinin en etkili numune olduğu söylenebilir.

Şekil 21’de iki farklı konsantrasyonda hazırlanan çözünür siyah çay, sitrik asit/sodyum sitrat ve kateşin numunelerinin HepG2 hücre serilerindeki PON1 laktonaz aktivitelerine etkileri gösterilmektedir. HepG2 hücrelerinin 50 µg/mL ve 100 µg/mL çözünür siyah çay; 18.25 µg/mL ve 36.5 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat; 100 µM ve 250 µM kateşin numuneleri ile inkübasyonları sonucu kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında laktonaz aktivite verilerinde sırasıyla 12. saatte 1.2, 1.7, 2.0, 2.3, 2.1 ve 2.0 kat, 24. saatte 1.6, 1.9, 1.9 ve 2.7 kat artış gözlenirken kateşin numuneleri azalış gösterdi. 48. saatte 18.25 µg/mL sitrik asit/sodyum sitrat numunesinde 1.1 kat artış hariç diğer numunelerde azalış gözlemlendi.

Bitki bileşenlerinin ekspresyonlara etkilerinin incelendiği çalışmaların çoğunda sulu çözelti yerine alkolik veya DMSO’da çözülmüş numuneler kullanılmasına rağmen bu çalışmada insan içimine uygun olan çözünür siyah çayın etkisi incelemek amaç olduğu için, etanolik veya DMSO insan için uygun olmadığı için, sulu çözelti kullanmayı tercih ettik. Jaichander ve ark. (101), 0.25 mM ve 0.5 mM alkolik aspirin çözeltisinin 48 saatlik inkübasyon sonrası paraoksonaz aktivitesinin her iki konsantrasyonda yaklaşık 2 kat arttığını gözlemişlerdir. Hamelet ve ark (97), hiperhomosisteinemili farelere kateşin

verilmesinin PON1 aktivitesinde ve gen ekspresyonunda artışa yol açtığını tespit etmişlerdir. Jaiswal ve ark. (98) 30 gün boyunca 20 mg/kg DMSO'da çözülmüş kateşin Wistar sıçanlara verildiğinde arilesteraz kativitesinin anlamlı ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Tas ve ark. (19) normal sıçanlara 3 ve 6 hafta süre ile yeşil çay verilmesi ile paraoksonaz aktivitesinde anlamlı bir farkın olmadığını ancak diabetik ratlara sadece 6 hafta süre ile verildiğinde anlamlı artışın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca arilesteraz aktivitesinde ise yeşil çayın etkili olmadığını ifade etmişlerdir.

Sitrik asit, metal iyonlarını bağlayarak serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu engeller yani antioksidan özellik gösterir (114). Ancak Abdel salam ve ark. (102), lipopolisakkaritle oksidatif stres oluşturulmuş farelerde oral yolla alınan sitrik asidin oksidatif strese etkisini inceledikleri çalışmada düşük miktarda sitrik asidin beyin dokusunda PON1 aktivitesini arttırdığını ancak sitrik asit miktarı arttırıldıkça aktivitenin azaldığını, karaciğer dokusunda ise sitrik asidin arttırıcı etkisinin olmadığını hatta yüksek konsantrasyonlarda anlamlı düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Şekil 22'de çözünür siyah çay, sitrik asit/sodyum sitrat ve kateşin numunelerinin HepG2 hücre kültür serilerindeki Apo A-I protein seviyelerine etkileri gösterilmektedir. Kontrol HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında 12. saatte 100 µg/mL'lik çözünür siyah çay, 18.5 µg/mL'lik sitrik asit/sodyum sitrat ve 250 µM'lık kateşin numunelerinin, Apo A-I seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu tespit edilirken 24. ve 48. saatlerde numunelerin istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

Bahorun ve ark. (15), normal bir diyetle birlikte çay içilmesinin kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı ve vücudun antioksidan kapasitesinin arttığı; Zhao ve ark. (100), siyah çayın kardiyovasküler riski olanlarda LDL-kolesterol'ü düşürdüğünü ancak total kolesterol ve HDL-kolesterol seviyelerini anlamlı düzeyde değişmediği; Davies ve ark. (17) hiperkolesterolemik bireylerde siyah çay tüketiminin total kolesterol ve LDL-kolesterolü düşürdüğünü ancak HDL-kolesterol, Apo B ve Apo A-1 seviyeleri anlamlı ölçüde değiştirmediklerini; ve Hakim ve ark. (16) Suudi kadınlar ile yaptığı çalışmada günde 450 mL'den fazla siyah çay tüketenlerin tüketmeyenlere göre daha düşük trigliserid, total koloesterol, LDL ve VLDL kolesterol seviyelerine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Siyah çayın en önemli bileşenlerinden olan, teaflavinlerin hepatik lipid birikimini

azalttığını (96); teasinensin A ve tearubiginlerin sırasıyla fekal nötral ve asidik steroid atılımını hızlandırarak, teaflavinlerin ise farklı mekanizmalarla hepatik kolesterol miktarını düşürdüğünü (97); teaflavin ile zenginleştirilmiş yeşil çayın düşük LDL-kolesterol seviyesi ile sonuçlandığını (98) çalışmaları ile göstermişlerdir. Diğer taraftan Trautwein ve ark. (18), kolesterolü yüksek kişilere saflaştırılmış teaflavin ve teaflavin-kateşin verilmesi ile LDL-kolesterol seviyelerinin anlamlı değişmediği belirtmişlerdir.

Bu çalışmaya eleştirel bakmak gerekirse eksiklikler şöyle sıralanabilir. Hücre kültüründe hücrelerin çok fazla çoğaltılamaması nedeniyle PON1 ekspresyonları ve Apo A-I seviyeleri üç kez çalışılmasına rağmen aktivite çalışmaları iki kez çalışılmış ve ortalamaları alınarak değerlendirme yapılmıştır. Aktivite çalışmalarının zaman alması, aktivitelerin hücre hemolizati elde edilince kısa sürede çalışılması gerekliliğinden ve spektrofotometre cihazında oluşan sorunlardan dolayı 3. çalışma yapılamamıştır. Diğer taraftan bu çalışmada kullanılan çözünür çayın içilebilir şekilde hazırlanmış çay olması, bu çayı oluşturan bileşenlerin fazla olması, etkilerin siyah çaya ait mi yoksa diğer bileşenlere ait mi olduğunun tam olarak belirlenmemesine neden olmuştur. Ancak çalışmamızda bu sorunu ortadan kaldırmaya yönelik olarak çözünür siyah çayda katkı maddesi olarak en fazla bulunan sitrik asit ve sodyum sitrat karışımı ve önemli bir çay bileşeni olan kateşin kontrol numunesi olarak çalışılmıştır.

Bu çalışma sonuçlarına bakıldığında PON1 ekspresyonları ve aktiviteleri ve Apo A-I seviyeleri genel olarak 12. saatte en belirgin artışlar göstermiş 48. saate doğru gittikçe azalış sergilemiştir. Ancak çözünür siyah çayın hazırlanma aşamasında kullanılan sitrik asidin özellikle PON1 ekspresyonu artışında daha etkili olduğu görülmektedir. Kullanılan sitrik asidin çözünür çayın antiaterojenik etkisini göstermede katkıda bulunduğu, *Camellia Sinensis* bitkilerinden elde edilen çayların önemli bileşeni olan kateşinin en az çözünür siyah çay kadar etkili olduğu söylenebilir. Ancak şunu söylemek mümkündür ki bitki bileşenleri ayrı ayrı daha iyi etki gösterebilse de vücuda alınabilir ve daha yaygın kullanılan formu olan kompleks formları aynı etkileri göstermeyebilecektir. Bu nedenle besinlerin vücuda alındığı hali ile etkilerinin incelenmesi daha faydalı olacaktır. Bu çalışma ile de bu gösterilmiştir.

Sonuç olarak içilmeye hazır haldeki çözünür siyah çay, bileşimleri ile HDL metabolizmasını düzenlemede etkili olabildiği *in vitro* alışma ile gösterilmiş olsa da, çözünür siyah ayın HDL metabolizmasına etkilerini ayrıntılı sergileyebilecek *in vivo* alışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Sang Sh, Lambert D.J, Ho CT, Yang CS (2011). The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol Res* 64: 87–99.
2. Mujtaba T, Dou QP (2012). Black tea polyphenols inhibit tumor proteasome activity. *InVivo* 26(2): 197-202.
3. Pan MH, Lai CS, Wang H, Loc CY, Hod CT, Li S (2013). Black tea in chemoprevention of cancer and other human diseases. *Food Sci Human Wellness* 2: 12-21.
4. Singh M, Singh R, Bhui K, Tyagi S, Mahmood Z, Shukla Y (2011). Tea polyphenols induce apoptosis through mitochondrial pathway and by inhibiting nuclear factor-kappaB and Akt activation in human cervical cancer cells. *Oncol Res* 19(6): 245-57.
5. Gossiau A, En Jao DL, Huang MT, Ho CT, Evans D, Rawson NE, Chen KY (2011). Effects of the black tea polyphenol theaflavin-2 on apoptotic and inflammatory pathways in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res* 55(2): 198-208.
6. Butt MS, Imran A, Sharif MK, Shabir Ahmad R, Xiao H, Imran M, Rsool HA (2014) . Black Tea Polyphenols: A Mechanistic Treatise. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54(8): 1002-11.
7. Alasalvar C, Pelvan E, Özdemir KS, Kocadağlı T, Mogol BA, Paslı AA, Özcan N, Özçelik B and Gökmen V (2013). Compositional, Nutritional, and Functional Characteristics of InstantTeas Produced from Low- and High-Quality Black Teas. *Agric. Food Chem* 61: 7529 –7536.
8. Ginsberg H (2013). Statins in cardiometabolic disease: what makes pitavastatin different? *Cardiovasc Diabeto l12 suppl 1:S1*.
9. Zhu X, Parks JS (2012). New roles of HDL in inflammation and hematopoiesis. *Annu Rev Nutr* 21(32): 161-82.
10. Eren E, Yilmaz N, Aydin O (2013). Functionally Defective High Density Lipoprotein and Paraonase: A Couple for Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Cholesterol* 2013: 792090.

11. Aviram M, Vaya J (2013). Paraoxonase1 activities, regulation, and interaction with atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol* 24(4): 339-44.
12. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M (2012). Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci* 4(11): 523-32.
13. Gugliucci A, Menini T (2015). Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 439: 5-13.
14. Devarajan A, Shih D, Reddy ST (2014). Inflammation, infection, cancer and all that the role of paraoxonases. *Adv Exp Med Biol* 824: 33-41.
15. Bahorun T, Luximon-Ramma A, Neergheen-Bhujun VS, Gunness TK, Googoolye K, Auger C, Crozier A, Aruoma OI (2012). The effect of black tea on risk factors of cardiovascular disease in a normal population. *Prev Med* 54: 98-102.
16. Hakim IA, Alsaif MA, Aloud A, Alduwaihy M, Al-Rubeaan K, Al-Nuaim AR, Al-Attas OS (2003). Black tea consumption and serum lipid profiles in Saudi women: a cross-sectional study in Saudi Arabia. *Nutr Res* 23: 1515–26.
17. Davies MJ, Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Paul DR, Edwards AJ, Wiseman SA, Muesing RA, Chen SC (2003). Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *J Nutr* 133(10): 3298-3302.
18. Trautwein EA, Du Y, Meynen E, Yan X, Wen Y, Wang H, Molhuizen HO (2010). Purified black tea theaflavins and theaflavins/catechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *Eur J Nutr* 49(1): 27-35.
19. Tas S, Sarandol E, ZiyankS, Aslan K, Dirican M (2005). Effects of green tea on serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research* 25(12): 1061–1074.
20. Bryans JA, Judd PA, Ellis PR (2007). The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *J Am Coll Nutr* 26(5): 471-7.

21. Karak T, Bhagat RM (2010). Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International* 43: 2234–2252.
22. Üstün Ç, Demirci N (2013). Çay bitkisinin (*camellia sinensis* L.) tarihsel gelişimi ve tıbbi açıdan değerlendirilmesi. *Lokman Hekim Journal* 3(3): 5-12.
23. Güneş S (2012). Türk Çay Kültürü ve Ürünleri. *Milli Folklor* 93: 234-251.
24. Gramza A, Korczak J, Amarowicz R (2005). Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity. *Pol J Food Nutr Sci* 3: 219–235.
25. Cooper R, Morré J, Morré D (2005). Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. *J Altern Complement Med* 11: 521–528.
26. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.trtturk.com/haber/sifa-deposu-cay--86658.html> [Accessed 13 May 2015].
27. Electronic resources [online]. Available from: <http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries-by-commodity/E> [Accessed 15 November 2014].
28. Türkmen N (2007). Farklı Sınıf Çaylarda Kıvrırma Proseslerinin ve Değişik Hasat Dönemlerinin Çayın Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşimine Etkisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
29. Güzel Ç (2011). Siyah Çay Ekstresinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
30. Yabancı SN (2008). Çay Bitkisi Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
31. Jain A, Manghani C, Kohli S, Nigam D and Rani V (2013). Tea and human health: The dark shadows. *Toxicology Letters* 220: 82–87.
32. Gulati A, Rawat R, Singh B and Ravindranath SD (2003). Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea. *J Agric Food Chem* 51: 4764-4768.

33. He R, Chen L, Lin B, Matsui Y, Yao X and Kurihara H (2009). Beneficial effects of oolong tea consumptions and diet-induced overweight and obese subjects. *Chin J Integr Med* 15: 34–35.
34. Shahidul Islam Md (2011). Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine* 19: 25–31.
35. Su X, Duan J, Jiang Y, Duan X and Chen F (2007). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of Oolong Tea Infusion under Various Steeping Conditions. *Int J Mol Sci* 8: 1196-1205.
36. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma PA (2011). Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci* 1: 25-41.
37. Coşkun T (2005). Fonksiyonel Besinlerin Sağlığımız Üzerine Etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48: 69-84.
38. Wright LP (2002). Biochemical analysis for identification of quality in black tea (*Camellia sinensis*). Doktora tezi, Pretoria University Doğal ve Tarım Bilimleri Enstitüsü. Güney Afrika.
39. Bhardwaj P, Khanna D (2013). Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin J Nat Med* 11(4): 0345–0353.
40. Lorenz M (2013). Cellular targets for the beneficial actions of tea polyphenols. *Am J Clin Nutr* 98(suppl): 1642S–50S.
41. Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN and Lean MEJ (2001). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Q J Med* 94: 277-282.
42. Wang H, Helliwell K (2001). Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int* 34: 223-227.
43. Li S, Lo CY, Pan MH, Laic CS and Ho CT (2013). Black tea: chemical analysis and stability. *Food Funct* 4: 10–18.

44. Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 131(9): 2248-51.
45. Mu W, Zhang T, Jiang B (2015). An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnol Adv* 33: 335 – 342.
46. Vuong QV, Bowyer MC and Roach PD (2011). L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J Sci Food Agric* 91: 1931–1939.
47. Ross SM (2014). L-Theanine (Suntheanine): Effects of L-Theanine, an Amino Acid Derived from *Camellia SINENSIS* (Green Tea), on Stress Response Parameters. *Holist Nurs Pract* 28(1): 65–68.
48. Zameer H, Iqbal M, Anwer L, Ahmed S, Mushtaq S (2013). Comparative effects of caffeine & L-theanine consumption on subjective cardiovascular signs and neurophysiological responses. *Int J Endorsing Health Sci Res* 1(1): 38-42.
49. Stewart AJ, Mullen W, Crozier A (2005). On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol Nutr Food Res* 49(1): 52-60.
50. Serpen A, Pelvan E, Alasalvar C, Mogol BA, Yavuz HT, Gökmen V, Özcan N, Özçelik B (2012). Nutritional and functional characteristics of seven grades of black tea produced in Turkey. *J Agric Food Chem* 60(31): 7682-9.
51. Someswararao Ch, Srivastav P.P (2012). A novel technology for production of instant tea powder from the existing black tea manufacturing process. *Innov Food Sci Emerg Technol* 16: 143–147.
52. Sinija VR, Mishra HN, Bal S (2007). Process technology for production of soluble tea powder. *J Food Eng* 82: 276–283.
53. Voet D, Voet JG (2011). *Biochemistry*. 4th edition, Pennsylvania: 449-465.
54. Moran LA, Horton HR, Scrimgeour KG, Perry MD (2012). *Principles of Biochemistry*. 5th edition, Toronto: 505-508.
55. Baynes JW, Dominiczak MH (2014). *Medical BIOCHEMISTRY*. 4th edition, University of South Carolina: 214-235.

56. Harvey BA, Ferrier DR (2011). Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 5th edition, Philadelphia: 227-237.
57. Lieberman M, Mark AD, Peet A (2013). Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach, 4th edition, Philadelphia: 585-596.
58. Bhagavan NV (2002). Medical Biochemistry, 4th edition, Hawaii: 433-450.
59. Nelson DL, Cox MM (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. 5th edition, New York: 836-845.
60. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2014). Biochemistry. Biyokimya. 7th ed. Çeviri editörleri: Adil Denizli, Ayşe Kevser Özdem, PALME yayıncılık, Ankara, 773.
61. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS (2015). Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol* 224: 3-51.
62. Calabresi L, Gomaschi M, Simonelli S, Bernini F, Franceschini G (2015). HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders. *Biochimica et Biophysica Acta* 1851: 13–18.
63. Kratzer A, Giral H, Landmesser U (2014). High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 103(3): 350-61.
64. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM (2011). HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 8(4): 222-32.
65. Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F (2015). Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol* 224: 181-206.
66. Gruenberger RB, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G (2014). Understanding high-density lipoprotein function in disease: Recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res* 56:36–46.
67. Savolainen MJ (2015). Epidemiology: disease associations and modulators of HDL-related biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 224: 259-83.

68. Karlsson H, Kontush A, James RW (2015). Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects. *Handb Exp Pharmacol* 224: 207-28.
69. Nofer JR (2015). Signal transduction by HDL: agonists, receptors, and signaling cascades. *Handb Exp Pharmacol* 224: 229-56.
70. Riwanto M, Rohrer L, von Eckardstein A, Landmesser U (2015). Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 224: 337-66.
71. Annema W, von Eckardstein A, Kovanen PT (2015). HDL and atherothrombotic vascular disease. *Handb Exp Pharmacol* 224: 369-403.
72. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, Chroni A (2015). HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol* 224: 53-111.
73. Tan JT, Ng MK, Bursill CA (2015). The role of high-density lipoproteins in the regulation of angiogenesis. *Cardiovasc Res* 106(2): 184-193.
74. Andrew S, Plump Christopher J, Scorr and Jan L (1994). Human apolipoprotein A-I gene expression increases high densitylipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoproteinE-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9607-9611.
75. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research* 10: 74.
76. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K (2011). The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochemia Medica* 21(2): 122-30.
77. Mackness B, Beltran-Debon R, Aragones G, Joven J, Camps J, Mackness M (2010). Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* 62(6): 480-2.
78. Khersonsky O, Tawfik DS (2006). The Histidine 115-Histidine 134 Dyad Mediates the Lactonase Activity of Mammalian Serum Paraoxonases. *J Biol Chem* 281(11): 7649-56.

79. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, et al. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11: 412-419.
80. Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, Fu X, Wagner MA, Besler C, Gerstenecker G, Zhang R, Li XM, DiDonato AJ, Gogonea V, Tang WH, Smith JD, Plow EF, Fox PL, Shih DM, Lusis AJ, Fisher EA, DiDonato JA, Landmesser U, Hazen SL (2013). Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest* 123(9): 3815-28.
81. Costa LG, Giordano G, Furlong CE (2011). Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 81(3): 337-44.
82. Camps J, García-Heredia A, Rull A, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Beltrán-Debón R, Rodríguez-Gallego E, Joven J (2012). PPARs in Regulation of Paraoxonases: Control of Oxidative Stress and Inflammation Pathways. *PPAR Res* 616371.
83. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 52: 598-608.
84. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, et al. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Bio Med* 38: 153-163.
85. Schrader C, Rimbach G (2011). Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem* 18: 5624-5643.
86. Porntadavity S, Permpongpaiboon T and Sukketsiri W (2010). HUMAN PARAOXONASE 2. *EXCLI Journal* 9: 159-172.
87. Camps J, Marsillach J, Joven J (2009). Measurement of serum paraoxonase-1 activity in the evaluation of liver function. *World J Gastroenterol* 15(16): 1929-33.
88. Gupta N, Gill K, Singh S (2009). Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res* 130(4): 361-8.

89. Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complement Alter Med 12: 27.
90. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Cakiroglu TN, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. Acta Biol Hung 62(4): 388-396.
91. Turan İ (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerinde etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
92. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE (2008). Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. Circ Cardiovasc Genet 1: 147-152.
93. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG(1989). Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. Anal Biochem 180(2): 242-7.
94. Khersonsky O, Tawfik DS (2006). Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases. Chembiochem 7(1): 49-53.
95. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
96. Jaichander P, Selvarajan K, Garelnabi M, Parthasarathy S (2008). Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. J Lipid Res 49(10): 2142-8.
97. Hamelet J, Demuth K, Dairou J, Ledru A, Paul JL, Dupret JM, Delabar JM, Rodrigues-Lima F, Janel N (2007). Effects of catechin on homocysteine metabolism in hyperhomocysteinemic mice. Biochem Biophys Res Commun 355(1): 221-7.
98. Jaiswal N, Rizvi SI (2014). Onion extract (*Allium cepa* L.), quercetin and catechin up-regulate paraoxonase 1 activity with concomitant protection against low-density

- lipoprotein oxidation in male Wistar rats subjected to oxidative stress. *J Sci Food Agric* 94(13): 2752-7.
99. Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, Morsy SM, Omara EA, Sleem AA (2014). Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. *J Med Food* 17(5): 588-98.
 100. Zhao H, Zhang M, Zhao L, Ge Y, Sheng J, Shi W (2011). Changes of Constituents and Activity to Apoptosis and Cell Cycle during Fermentation of Tea. *Int J Mol Sci* 12: 1862-1875.
 101. Lin CL, Huang HC, Lin JK (2007). Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J Lipid Res* 48(11): 2334-43.
 102. Miyata Y, Tanaka T, Tamaya K, Matsui T, Tamaru S, Tanaka K (2011). Cholesterol-Lowering Effect of Black Tea Polyphenols, Theaflavins, Theasinensin A and Thearubigins, in Rats Fed High Fat Diet. *Food Sci Technol Res* 17(6): 585–588.
 103. Maron DJ, Lu GP, Sheng CN, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, Jin XJ, Wouters BC, Zhao J (2003). Theaflavin-enriched green tea extract lowers low-density lipoprotein cholesterol. *J Amer Coll Cardiol* 41(6): 243-243.
 104. Gong M, Garige M, Varatharajalu R, et al. (2009). Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochem Bioph Res Co* 4: 1001-4.
 105. Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, Aviram M, Fuhrman B (2010). Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis* 208(1): 119-25.
 106. Cheng C.C, Hsueh C.M, Liang K.W, Ting C.T, Wen C.L and Hsu S.L (2011). Role of JNK and c-Jun signaling pathway in regulation of human serum paraoxonase 1 gene transcription by berberine in human HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 650: 519–525.
 107. Gouédard C1, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63(4): 945-56.

108. Deakin SP1, James RW (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. Clin Sci (Lond) 107(5): 435-47.
109. Akbıyık F, Çevik S, Bayrak T, Doğan A.L, Bayrak A, Demirpençe E (2010). Karaciğer Hücre Dizilerinde Paraoksonaz1 Ekspresyonu ve Aktivitesinin PPARa ile Kontrolü. Türk Biyokimya Dergisi 35(2): 151–156.
110. Fuhrman B (2012). Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. J Lipids 684010 doi: 10.1155/2012/684010.
111. bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK (2003). Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. Free Radic Biol Med 34(7): 824-9.
112. Riegelhaupt J (2010). Characterization of the Functional Role of the Intracellular Cholesterol Transporter StARD4 in Knockout Mice, and Investigation of pigenetic Modulation of ApoA-I Transcription. Doktora tezi, Rockefeller University, Amerika Birleşik Devletleri.
113. Gillard BK, Lin HY, Massey JB, Pownall HJ (2009). Apolipoproteins A-I, A-II and E are independently distributed among intracellular and newly secreted HDL of human hepatoma cells. Biochim Biophys Acta_1791(12): 1125-32.
114. Akaranta O, Akaho A.A (2012). Synergic Effect of Citric Acid and Peanut Skin Extract on the Oxidative Stability of Vegetable Oil. J Appl Sci Environ Manage 16 (4): 345-351.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: HAJIZADEH TEKMEH Hamed

Uyruğu: İran

Doğum tarihi ve yeri: 11/09/1985 Maku

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0462 377 78 67

E-Posta: hajizadeh.hamed@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Payam-i Nur Üniversitesi, Urmiye Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Salmas Chamran Lisesi	2004

YABANCI DİL

Türkçe, İngilizce, Farsça

HOBİLER

Yüzme, Doğa yürüyüşü