

**YEŞİL ÇAY İNFÜZYONUNUN HeLa HÜCRELERİ  
ÜZERİNDEKİ SİTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ  
VE YBSK YÖNTEMİ İLE YEŞİL ÇAY  
POLİFENOLLERİNİN TAYİNİ**

**AHMET SARAÇOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi  
Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı  
Haziran-2002**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 010329

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ahmet SARAÇOĞLU'nun Yeşil Çay İnfüzyonunun HeLa Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi ve YBSK Yöntemi ile Çay Polifenollerinin Miktar Tayini başlıklı Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ..20.06.2002..tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Y.DOG.DR. BÜLENT. ERGUN	
Üye	PROF.DR. ASUMAN. KARAKAYA	
Üye	Y.DOG.DR. BOKSEL. ALTIOKKA	
Üye	.....	
Üye	.....	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..12.06.2002.. tarih ve .....14..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### YEŞİL ÇAY İNFÜZYONUNUN HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE YBSK YÖNTEMİ İLE YEŞİL ÇAY POLİFENOLLERİNİN TAYİNİ

AHMET SARAÇOĞLU

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Bülent ERGUN

2002

Bu çalışmada yeşil çay bitkisinin yapraklarından hazırlanan %2'lik infüzyonun HeLa serviks adenokarsinoma hücreleri üzerinde nötral kırmızısı uptake boyama yöntemi kullanılarak, direk sitotoksik etkisi ve TNF yöntemi ile indirek sitotoksik etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Direk sitotoksik testi ile elde edilen sonuçların TNF testine göre daha anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde YBSK yöntemi ile yeşil çay infüzyonunda bulunan polifenollerin miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Tsuchiya ve arkadaşlarının önerdiği yöntem kullanılarak %2'lik yeşil çay infüzyonunun 92.58µg/mL EGK, 186.66µg/mL EK, 44.70µg/mL EGKG ve 24.67µg/mL EKG içerdiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Yeşil Çay, Polifenol, TNF, Kanser, YBSK

## **ABSTRACT**

**Master of Science Thesis**

### **INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF GREEN TEA INFUSION ON HeLa CELL LINE AND DETERMINATION OF POLYPHENOLS BY HPLC METHOD**

**AHMET SARAÇOĞLU**

**Anadolu University  
Graduate School of Health Sciences  
Department of Pharmaceutical Toxicology**

**Supervisor: Assist.Prof.Bülent ERGUN  
2002**

In this thesis the inhibitory effect of 2% green tea infusion, prepared with tea leaves, on HeLa cervix adenocarcinoma cell line was investigated with direct cytotoxicity test and TNF test using neutral red uptake method and the results were assessed comparatively. The results obtained from direct cytotoxicity test were more significant than obtained from TNF test.

In the second part of the study the determination of the polyphenol quantities, present in 2% green tea infusion, was carried out by HPLC method. The HPLC method established by Tsuchiya et.al.[5] was used for determination. Results displayed that green tea infusion contains 92.58µg/mL EGC, 186.66 µg/mL EC, 44.70µg/mL EGCG and 24.67µg/mL ECG.

**Keywords:**Green Tea, Polyphenol, TNF, Cancer, HPLC

## TEŞEKKÜR

Çalıőmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen aileme, sevgili hocam Yrd.Doç.Dr.Bülent ERGUN'a, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki arkadaşlarıma, Yrd.Doç.Dr. Göksel ALTIOKKA'ya, Arő.Gör.Erol ŐENER'e, Arő.Gör.Seval KORKMAZ ÇETİN'e ve Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonuna sonsuz teőekkürler.

Ahmet SARAÇOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Çayın Tarihçesi.....	2
2.2. Çayın Eldesi.....	3
2.3. Çayın Kimyasal Kompozisyonu.....	3
2.4. Çay Polifenollerinin Kimyasal Yapıları.....	5
2.5. Çayın Farmakolojik Özellikleri.....	6
2.6. Çay Polifenollerinin Biyoyararlanımı.....	6
2.7. Yeşil Çayın Biyolojik Etki Mekanizmaları.....	7
2.8. Yeşil Çay ile Yapılan Bazı Epidemiyolojik Çalışmalar.....	10
2.9. Tümör Nekroz Faktör (TNF).....	11
2.10. Yeşil Çay ile Yapılan Bazı Hücre Kültürü Çalışmaları.....	14
2.11. Çay Polifenollerinin Tayini.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Yöntem.....	21

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. TNF Testi ve Direk Sitotoksikite Testi.....	32
4.2. YBSK ile Çayda Bulunan Polifenollerin Analizi.....	37
5. KAYNAKLAR.....	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Çay polifenollerinin kimyasal yapıları	5
2.2. Karsinogenezis basamakları ve çay polifenollerini tarafından inhibisyonu	8
3.1. Neubauer hücre sayma odacığının bir bölmesi	23
3.2. 96 gözlü plaka	26
4.1. TNF testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi	33
4.2. TNF testi sonuçlarına göre LPS ve infüzyonun grafiksel olarak karşılaştırılması	33
4.3. Direk sitotoksikite testinden elde edilen sonuçların grafiksel gösterimi	35
4.4. %2 Yeşil çay infüzyonu ile HeLa hücreleri üzerinde elde edilen yüzde inhibisyon değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması	36
4.5. Standart polifenol karışımına ait kromatogram	37
4.6. a) Standart polifenol karışımına ait kromatogram	38
b) Yeşil çay infüzyonuna ait kromatogram	



## TABLO VE ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Herhangi bir işleme tabi tutulmamış çayın kimyasal bileşenleri	4
2.2. Yeşil ve siyah çayda bulunan kateşinler	5
2.3. Tek doz <sup>3</sup> H-EGKG uygulamasından sonra çeşitli organlardaki radyoaktivite dağılımı	7
2.4. Çay polifenollerinin antimutajenik ve antikarsinojenik etki mekanizmaları	9
2.5. İnsanlarda TNF- $\alpha$ 'nın majör hücre sel kaynakları	12
2.6. TNF- $\alpha$ üretimini indükleyen majör fizyolojik etkenler	13
4.1. TNF testinde 540nm'de elde edilen optik dansite ortalamaları	32
4.2. Direk sitotoksisite testinde 540nm'de elde edilen optik dansite ortalamaları	34
4.3. %2 Yeşil çay infüzyonu ile TNF testi ve direk sitotoksisite testi ile elde edilen yüzde inhibisyon değerleri	35
4.4. Standart maddelerin konsantrasyon alan ilişkileri	39
4.5. %2'lik yeşil çay infüzyonunda bulunan polifenol değerleri	39

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ANOVA</b>	: Analysis of varians
<b>EGK</b>	: Epigallokateşin
<b>EGKG</b>	: Epigallokateşin gallat
<b>EK</b>	: Epikateşin
<b>EKG</b>	: Epikateşin gallat
<b>FCS</b>	: Fetal buzağı serumu
<b>HDL</b>	: Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoproteinler
<b>LC</b>	: Sıvı kromatografisi
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>NEAA</b>	: Nonesansiyel amino asit
<b>NF<sub>κ</sub>B</b>	: Nukleer faktör kapp B
<b>TF</b>	: Teaflavin
<b>TF A</b>	: Teaflavin gallat A
<b>TF B</b>	: Teaflavin gallat B
<b>TFDG</b>	: Teaflavindigallat
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>YBSK</b>	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

## İ.GİRİŞ

*Camellia sinensis* (çay bitkisi) Theaceae familyasından, tropik ve subtropik bölgelerde yetişen, kışın yapraklarını dökmeyen bir ağaçtır. Bitkinin ilk olarak güneydoğu Asya'da gelişip yetiştirildiğine inanılmaktadır [1].

İçecek olarak kullanımının dışında çay, geleneksel tıpta oral olarak;

- Hafif diarelerin semptomatik tedavisinde,
- Fonksiyonel asteniada,
- Zayıflama programlarında yardımcı olarak,
- Suyun renal ekskresyonunu arttırmak amacı ile kullanılır.

Topikal olarak ise; zayıflama programlarına yardımcı olarak, çeşitli deri hastalıklarında yumuşatıcı ve kaşıntı azaltıcı olarak ve çatlaklarda, eziklerde, donmalarda ve insekt ısırıklarında besleyici, koruyucu ajan olarak kullanılmıştır.

Son yıllarda yapılan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarında çayın, kalp ve dolaşım hastalıkları ile kanser üzerine etkileri bulunmuştur [2]. Yapılan birçok çalışma ile çayda bulunan polifenolik yapıli bileşiklerin antikarsinojenik etkiden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yeşil çayda bulunan ana polifenolik yapıli bileşikler; Epikateşin (EK), Epikateşin gallat (EKG), Epigallokateşin (EGK) ve Epigallokateşin-3-gallat'tır (EGKG) [3]

İnsan vücudu sitokinler adı verilen birçok doğal sitotoksik maddeler üretir. İnterferonlar, koloni stimule edici faktörler (Colony Stimulating Factors-CSF), interlökinler ve tümör nekroz faktörü (Tumor Necrosis Factor-TNF) sitokinlere örnek olarak verilebilir [4]. Bu sitokinlerden TNF'nin farmakolojik dozlarda kullanıldığında in vitro ve in vivo birçok malign hücrelere karşı sitotoksik olduğu belirtilmiştir [5].

Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen çay bitkisinde bulunan polifenollerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemi ile miktar tayinlerinin yapılması ve yeşil çay infüzyonunun sitotoksik etkisinin HeLa hücreleri üzerinde direk sitotoksikite testi ve TNF testi yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Çayın Tarihçesi

Çayın içecek olarak kullanımı M.Ö. 2700'lü yıllara dayanmaktadır. Çayla ilgili kaydedilmiş ilk bilgiler M.Ö. 350'de yazılmış eski bir Çin sözlüğü olan Erh Ya'da bulunmaktadır. Çay içme geleneği 6. yüzyılda Çin'den Japonya'ya geçmiştir. Buradan Endonezya'ya geçen çay, sömürgeciler tarafından Hollanda'ya taşınmıştır. Hindistan'da da kültüre alınan çay buradan İngiltere'ye ithal edilerek popüler hale gelmiştir. 17. yüzyıl ortalarında İngilizler çay ticaretinde ve çayın popülerleşmesinde önemli rol oynamışlardır [1].

Türkiye'de çay yetiştirilmesi için ilk girişim 1888 – 1892 yıllarında yapılmıştır. Japonya'dan getirilen tohumlar Bursa bölgesinde ekilmiş, fakat iklimin çay bitkisi üretimi için yeterli neme sahip olmaması nedeniyle bu girişim başarıya ulaşamamıştır.

Rize bölgesinde çay üretimi Batum'da çalışan Rize'li işçilerin çay fidanlarını Batum'dan getirerek kendi bölgelerinde yetiştirmeleri ile başlamıştır. İlk çay fidanlarının Batum'dan Rize'ye ne zaman getirildiği tam olarak bilinmemekle birlikte Rize bölgesinde yetiştirilen fidanlardan vergi alınmamasını isteyen 2 Haziran 1879 tarihli bir belgenin bulunması bu bölgede çay fidanı yetiştirilmesinin Bursa'da yapılan girişimden önce başladığını göstermektedir.

Rize bölgesinde çay eldesi 1939 yılında başlamıştır. Burada ilk tesis 1945 yılında "Rize Çay Fabrikası" ismiyle kurulmuştur. Bu fabrika halen çalışır durumdadır. Bölgede bugün çay elde eden 40'dan fazla tesis bulunmaktadır [6].

Günümüzde çay tüketimi dünya çapında oldukça farklılıklar göstermekle birlikte, günlük ortalama kişi başına 120 mL tüketimi ile sudan sonra çayın ikinci sırada geldiğine inanılmaktadır.[6]

## 2.2. Çayın Eldesi

ay yaprakları 3zel bir makas yardımıyla elle veya makinelerle toplanır. Toplanan yapraklara uygulanan işlemlere bağlı olarak 3 ana tipte çay elde edilir. *Camellia sinensis* yaprakları spesifik polifenoller ve polifenol oksidaz isimli bir enzim içerir. Yapraklar parçalandığında bu enzim aktive olur ve polifenoller oksitlenir.

Yeşil ay eldesinde; toplanan yapraklar hemen sıcak buhara veya ısıya maruz bırakılır. Daha sonra g3neşte veya sıcak hava akımında kurutulur. Bu işlem bitkide bulunan polifenol oksidaz enzimini inaktive eder. Bu şekilde elde edilen yeşil çay, kuru yaprak ağırlığının %30'u kadar polifenol içerir [1]. Yeşil ay; Çin, Japonya, Hindistan, bazı kuzey Afrika ve Ortadoğu 3lkelerinde yaygın olarak kullanılır (%20) [6].

Yapraklar ısı ile enzim inaktivasyonundan 3nce bir saat kadar bekletilirse, Çin ve Tayvan'da yaygın olarak kullanılan oolong çay elde edilir [1].

Siyah ay elde etmek için, toplanan yapraklar ısıtma işlemine tabi tutulmadan 3nce 3 – 6 saat bekletilir. Bu sırada kateşinler enzim tarafından oksitlenerek teaflavin gallat ve tearubiginler başta olmak 3zere diğer polifenol t3revlerine d3n3ř3r [1]. Siyah ay en çok batı 3lkelerinde ve bazı Asya 3lkelerinde t3kutilir (%78) [7].

## 2.3. Çayın Kimyasal Kompozisyonu

Tablo 2.1'de herhangi bir işleme tabi tutulmamış çayda bulunan ana bileşenler verilmiştir.

Varyete farklılıkları, çevresel etkenler, proses metodları ve 3reme sıklığı gibi etkenler çay yapraklarının kimyasal kompozisyonunu değiştirebilir.

Farmakolojik etkilerinden dolayı çayda bulunan en 3nemli kimyasal maddeler polifenoller ve kafeindir. Polifenoller kuru yaprak ağırlığının %30 – 35'ini oluşturur ve ieeğin kalitesini belirler. Polifenollerin miktarı genetik yapıya ve iklim, ışık, ısı, yağış ve beslenme gibi çevresel fakt3rler ile yaprağın yaşına bağlı olarak değişir. Bu

polifenollerden kateşin sınıfından olan flavonoller yaprak hücrelerinin sitoplazmik vakuollerinde bulunur. Bunlar suda çözünen, renksiz maddelerdir. Hızla oksitlenirler ve diğer maddelerle kompleks oluştururlar.

Tablo 2.1. [7] Herhangi bir işleme tabi tutulmamış çayın kimyasal bileşenleri

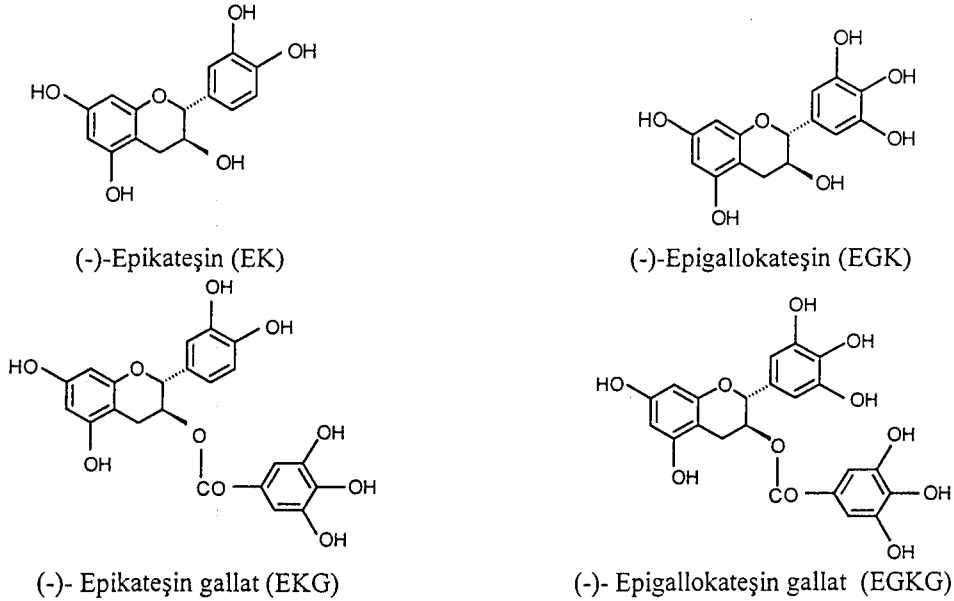
Madde	%
Karbonhidrat	30
Şekerler	4
Nişasta	2
Pektinler	11
Pentozanlar	
Ham lif	13
Proteinler (%4 serbest aminoasit)	20
Lipidler	2
Polifenoller	3
Kafein	5
Mineraller (kül)	7
Enzimler, koku maddeleri, vitaminler, klorofil ve diğer pigmentler (selüloz, lignin)	

Yeşil ve siyah çay ekstraktlarında bulunan polifenol bileşenleri tablo 2.2’de verilmiştir. Yeşil çay yapraklarında en fazla bulunan kateşin, epigallokateşin gallattır (EGKG). Bunu sırasıyla epigallokateşin (EGK), epikateşin (EK) ve epikateşin gallat (EKG) izler. Siyah çayda ise teaflavin (TF), teaflavin gallat A (TFA), teaflavin gallat B (TFB) ve teaflavindigallat (TFDG) gibi teaflavinler yüksek miktarlarda bulunur. Yapraklar yaşlandıkça gallatlanmış flavonollerin miktarı düşer ve bu durum içeceğin kalitesinin azalmasına yol açar [7].

Tablo 2.2. [7] Yeşil ve siyah çayda bulunan kateşinler

Kateşinler	Yeşil çay (µg/ml)	Siyah çay (µg/ml)
Kateşinler	1064	300
(+)Kateşin	21	20
(+)Gallokateşin		
Epikateşinler		
(-)-Epikateşin	98	37
(-)-Epikateşin gallat	90	73
(-)-Epigallokateşin	411	42
(-)-Epigallokateşin-3-gallat	444	128
Teaflavinler	0	64
Teaflavin	0	22
Teaflavin gallat A	0	20
Teaflavin gallat B	0	13
Teaflavin digallat	0	9
Tearubiginler		
Prosiyanidin	3	
Prosiyanidin gallat		
Proderfinidin		
Proderfinidin gallat		

#### 2.4. Çay Polifenollerinin Kimyasal Yapıları



Şekil 2.1: [7] Yeşil çay polifenollerinin kimyasal yapıları

## 2.5. Çayın Farmakolojik zellikleri

Çayın diüretik ve taşıdığı kafeinden dolayı stimulan etkileri vardır. Yeşil ayın diş çürüklerine karşı koruyucu etki gösterdiği ve ekstraktının solunum rahatlatıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yeşil ay flavonolleri antimutajeniktir. Mutajenlerin oluşumunu (nitrozaminler gibi) ve mutajenik etkilerini göstermelerini (örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar) önler. Yapılan hayvan deneyleri yeşil çay infüzyonu ve EGKG'ın değişik organlardaki kanser oluşumunu önlediğini göstermiştir. Yapısal olarak benzer diğer fenoller gibi yeşil çay flavonları da serbest radikalleri temizler ve lipid peroksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder.

Düzenli ay tüketimi LDL/HDL oranı, kolesterolemi ve trigliseridemiyi önemli oranda düşürür ve günde 4 fincan ve daha fazla çay içen insanlarda kalp hastalıklarını ve aterosklerozis riskini azaltır. Günde 5 fincan siyah çay tüketimi serebrovasküler hasarı büyük oranda azaltır. Siyah ayın aynı zamanda kalp üzerine olumlu etkileri vardır [2].

Bu farmakolojik etkilerinin yanı sıra fazla çay tüketilen bölgelerde görülen yüksek orandaki özefageal kanser ile çayda bulunan kondanse kateşin olan tannin arasında bir bağlantı olabileceğine dair kanıtlar vardır [8].

## 2.6. ay Polifenollerinin Biyoyararlanımı

Fujiki ve arkadaşları çay polifenollerinin biyoyararlanımını incelemek amacı ile per oral intübasyon yolu ile fare midesine <sup>3</sup>H – EGKG uygulamışlardır. Uygulamadan bir saat sonra <sup>3</sup>H – EGKG radyoaktivitesi kanda gözlenirken, 6 saat sonra total radyoaktif maddenin %2'si kanda bulunmuştur. Uygulamadan 6 saat sonra toplanan idrarda total radyoaktif maddenin %0.06'sının EGKG olarak atıldığı görülmüştür. İntübasyondan 24 saat sonra besin kanalı dışındaki diğer hedef organlarda radyoaktivite ölçümü yapılmıştır. Tablo 2.3'te organlarda ölçülen radyoaktivite değerleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre radyoaktif EGKG



ve yeşil çay ekstraktı antikanser etkisinin bulunduğu bilinen organların çoğunda iyi dağılım göstermiştir [9].

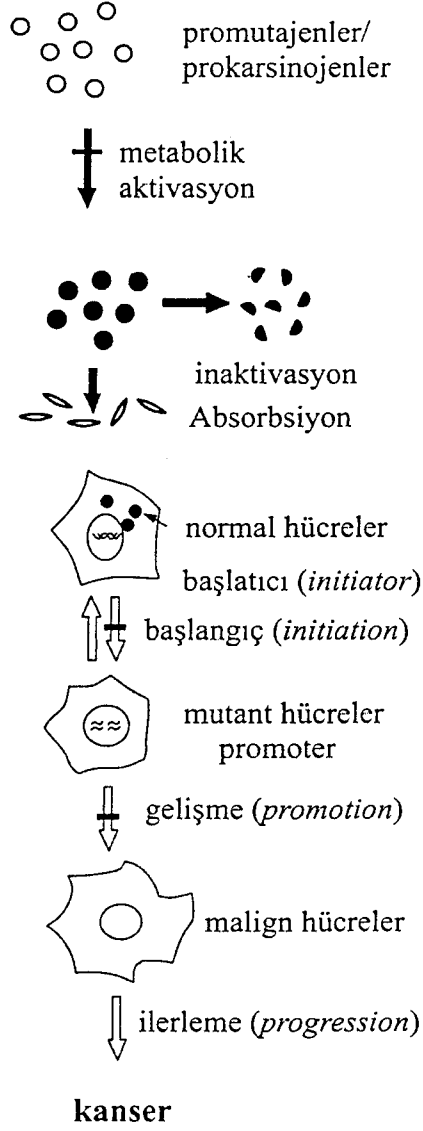
Çaya süt ilave edilmesi fenollerin çökmesine ve absorpsiyonun önlenmesine neden olabilir [2].

Tablo 2.3. [10] Tek doz  $^3\text{H}$  – EGKG uygulamasından sonra çeşitli organlardaki radyoaktivite dağılımı

Organ	$10^3 \times$ Radyoaktivite (dpm/100 mg doku)
Kan	$288.0 \pm 2.0$
Beyin	$22.5 \pm 10.4$
Akciğer	$22.0 \pm 5.8$
Kalp	$24.4 \pm 8.1$
Karaciğer	$27.3 \pm 3.7$
Böbrek	$24.7 \pm 6.5$
Dalak	$20.0 \pm 7.1$
Pankreas	$21.4 \pm 12.3$
Uterus ve ovaryum	$21.8 \pm 8.0$
Meme	$18.4 \pm 4.3$
Safra kesesi	$6.6 \pm 3.6$
Kemik	$18.5 \pm 6.5$
Deri	$19.3 \pm 0.4$

## 2.7. Yeşil Çayın Biyolojik Etki Mekanizmaları

Yeşil çayın biyolojik etkilerinden sorumlu mekanizmalar tam olarak anlaşılacakla birlikte önemlidir. Çünkü bu mekanizmaların anlaşılması kanserin tedavisine ve önlenmesine yönelik daha iyi stratejiler geliştirilmesine yardımcı olabilir [3]. Şekil 2.2’de çay polifenollerinin etki mekanizmaları şematik olarak gösterilmiştir. Tablo 2.4’te çay polifenollerinin antimitojenik ve antikarsinojenik etki mekanizmaları verilmiştir



Şekil 2.2. [7] Karsinogenezis basamakları ve çay polifenollerini tarafından inhibisyonu

**Tablo 2.4 : [3] Çay polifenollerinin antimutajenik ve antikarsinojenik etki mekanizmaları**

Sınıflandırma	Çay polifenolleri	Karsinogenezis mekanizmaları
1 – Ekstrasellüler etki ile mutajenlerin ve karsinojenlerin inhibisyonu	Çay ekstraktı	MNNG ile etkileşme
2 – İntrasellüler etki ile mutajenlerin ve karsinojenlerin inhibisyonu		
2.1 – Metabolizmanın modülasyonu	Yeşil çay polifenolleri	Sitokrom P450'ye bağımlı metabolik aktivasyonun inhibisyonu
2.1.1 – Promutajen aktivasyonunun inhibisyonu	Kateşinler	S9 enzimlerinin inhibisyonu
2.1.2 – Detoksikasyon mekanizmasının indüksiyonu	Yeşil çay ekstraktı	Promutajenlerle etkileşme
2.1.3 – Metabolik enzimlerin değiştirilmesi ile detoksifikasyon	Çay	Glutation indüksiyonu
2.2 – Blokaj veya supresyon	EK, EGK, EKG, EGKG	Faz II enzimlerinin indüksiyonu
2.2.1 – Aktif moleküllerin blokajı	Çay	Sitokrom P450 redüksiyonu ve faz II enzimlerinin artışı
2.2.2 – Aktif oksijen türevlerinin temizlenmesi.		
2.3 - DNA replikasyonu veya onarımının modülasyonu		
2.3.1 – Hatasız DNA replikasyonunun artırılması	EKG, EGKG	Blokaj veya supresyon
2.3.2 – DNA hasarının onarımının sağlanması	K, EK, EKG, EGKG	Hidroksil radikallerinin redüksiyonu
3 – Başlangıç aşamasındaki veya neoplastik hücreleri etkileyerek inhibisyon	Teaflavinler	DNA'ya bağlanmanın inhibisyonu
4 – İnvazyon ve metastazın inhibisyonu	Yeşil ve siyah çay polifenolleri	Antioksidan aktivite
	EK, EGK, EKG, EGKG	Katalitik Sitokrom P450 inhibisyonu
5 – Apoptozisin indüksiyonu		
	EGKG	DNA polimeraz III ile etkileşme
	EKG, EGK, EGKG	Onarım sistemine etki
	EGKG	Tümör gelişiminin inhibisyonu
	Kateşinler ve TF	Matriks enzimlerinin inhibisyonu
	Yeşil çay infüzyonu	Matriks enzimlerinin inhibisyonu
	EGKG	Ürokinaz inhibisyonu
	EKG, EGKG	DNA fragmentasyonunun indüksiyonu

## 2.8 . Yeşil Çay ile Yapılan Bazı Epidemiyolojik Çalışmalar

1986 yılında başlayan ve 10 yıl süresince 8552 kişi üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, günlük olarak yüksek dozda yeşil çay tüketiminin kanser üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu süre içerisinde 175 kadın ve 244 erkekte kanser vakası ortaya çıkmıştır. Günlük 10 fincandan fazla çay tüketenlerle 3 fincandan az çay tüketenler karşılaştırıldığında kanser gelişiminin erkeklerde 3.2 yıl, kadınlarda 7.3 yıl geciktiği görülmüştür. Teşhis edilen toplam 419 kanser vakasında yeşil çay tüketimine bağlı olarak kanser türlerinin relatif etkileri hesaplanmıştır. Günde 10 fincandan fazla yeşil çay tüketen kişilerde akciğer, kolon ve karaciğer kanseri için oldukça düşük relatif risk elde edilmiştir [11].

Aichi kanser merkezinde Haziran 1990 – Aralık 1999 yılları arasında 1160 yeni ameliyat olmuş ve yaygın meme kanseri olan hastada Cox zarar modeli kullanılarak günlük yeşil çay tüketiminin hastalığın tekrarlama olasılığına etkisi incelenmiştir. Bu süre boyunca 133 kişide (%12) şiddetli göğüs kanserinin tekrarladığı görülmüştür. Günde 3 fincan veya daha fazla yeşil çay tüketenlerde kanserin safhasına bağlı olarak tekrarlama olasılığının düştüğü gözlenmiştir. Özellikle I. basamaktaki kanserlerde zarar riski değeri istatistiki olarak önemli oranda azalmıştır. Benzer bir eğilim II. aşamadaki kanserlerde de gözlenirken daha ileri safhadaki kanserlerde bu etki bulunamamıştır [12].

Gao ve arkadaşları [7] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Çin'in Şanghai bölgesinde yeşil çay tüketiminin insan özefageal kanser riskini azalttığı görülmüştür. Yapılan çeşitli çalışmalar normal sıcaklıkta (35 – 47 °C) çay içimi ile özefageal kanser arasında bir ilişki bulunmadığını, ancak çok sıcak çay tüketiminin (55 – 67 °C) özefageal kanser riskini 2 – 3 kat artırdığını göstermektedir.

Sadakata ve arkadaşları [7] çay tüketiminin yaşam üzerine etkilerini incelemek amacıyla aktif olarak çay töreni düzenleyen öğretmenlerin mortalite oranlarını incelemiştir. Örnekler 1 Ocak 1980'de Urasenke çay töreni okulunda öğretmen olarak göreve başlayan, Tokyo'da yaşayan, 50 yaş civarındaki kadınlardan seçilmiştir. Bu liste 31 Aralık 1988'e kadar her yıl güncelleştirilerek yenilenmiştir.

Ölüm belgelerine ulaşılarak ölüm nedenleri bulunmuştur. Bu çalışmada toplam 3380 örnek incelenmiştir. 9 yıllık süreç boyunca bunlardan 280'i ölmüş, 435'i üyelikten ayrılmıştır. 167 vakanın ölüm nedenleri ölüm belgelerinden elde edilmiştir. Bunlardan 55'inin (%32.2) malign neoplazmalar, 41'inin (%24.6) serebrovasküler hastalıklar, 35'inin (%21.0) kalp hastalıkları ve 36'sının (%21.6) diğer çeşitli nedenlerle öldüğü belirlenmiştir. Bu çalışma çay töreni öğretmenlerinin mortalite oranlarının tüm Japon kadınları ve Tokyo'da yaşayan kadınlarla karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Bu durum çayın çeşitli öldürücü hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Ohno ve arkadaşları [7] akciğer kanserinden ölüm oranının çok yüksek olduğu Japonya'nın Okinawa bölgesinde 1988 – 1991 yılları arasında çay tüketimi ile akciğer kanseri riski arasındaki korelasyonu incelemişlerdir. Sonuçlar özellikle kadınlarda daha fazla Okinawa çayı (kısmen fermente edilmiş çay) tüketiminin daha düşük oranda kanser riski ortaya çıkardığını göstermiştir. Günde 1-4, 5-9 veya 10 fincan ve daha fazla çay içen kadınlarda risk oranları hiç çay içmeyenlere göre sırasıyla 0.77, 0.77 ve 0.38 olarak bulunmuştur. Aynı oranlar erkekler için ise 0.85, 0.85 ve 0.57 olarak elde edilmiştir. Okinawa çayı tüketiminin riski azalttığı gözlenmiştir. Kadın ve erkeklerde epitel hücre karsinoma riski 0.50 ve 0.08 olarak bulunmuştur. Bu bulgular çay tüketiminin insanlarda akciğer kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

## 2.9. Tümör Nekroz Faktör (TNF)

İmmün sistem tarafından üretilen ve sitotoksik aktiviteye sahip olan endojen maddelere sitokinler adı verilmektedir [4]. Sitokin familyasından olan tümör nekroz faktörün (TNF) TNF- $\alpha$  (kaşektin) ve TNF- $\beta$  (lenfotoksin) olmak üzere iki farklı regülatör faktörü vardır. Her iki molekül de aynı reseptörlere bağlanmasına ve benzer biyolojik aktiviteleri indüklemesine karşın sınırlı bir homoloji gösterir. İnsan TNF- $\alpha$  ve - $\beta$  genleri 6. kromozomda yerleşmiştir.

TNF- $\alpha$ 'nın en önemli hücresel kaynağı aktive olmuş makrofajlardır. Fakat TNF başka hücreler tarafından da salgılanır.(Tablo 2.5) [13]

Tablo 2.5. [13] İnsanlarda TNF- $\alpha$ 'nın majör hücresel kaynakları

Makrofajlar	Polimorfonükleer lökositler
NK hücreleri	Astrositler
Eozinofiller	Langerhans hücreleri
Hepatik Kuppfer hücreleri	Beyin mikroglial hücreleri
Glomerüler mezangial hücreler	Değişik transforme hücreler
Fibroblastlar.	B ve T lenfositleri

Bu majör hücresel kaynaklardan makrofajların, çok fonksiyonlu hücreler oldukları için nonspesifik savunma sisteminde özel bir konumu vardır. Makrofajların fagositoz yeteneğine sahip oldukları ve indüksiyon ile oldukça aktif efektör hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir [14].

Makrofajlar vücudun savunma sisteminde mikrobiyal enfeksiyonlara ve tümörlere karşı önemli rol oynamaktadırlar. Bu hücrelerin selektif stimülasyonu, hem immün savunmada aktive edilmiş makrofajların fonksiyonunu aydınlatmada, hem de terapötik uygulamaların geliştirilmesini sağlamak amacıyla önemlidir [15].

İnsan TNF- $\alpha$ 'sı plazma membranına bağlı 233 aminoasitli bir polipeptid olarak sentezlenir. Daha sonra 76 ve 77. aminoasitler arasında proteolitik yarıma meydana gelerek 157 aminoasitli (17kDa) TNF- $\alpha$  polipeptidi oluşur.

Birçok stimulus TNF- $\alpha$  üretimini indükleyici etki gösterir. (Tablo 2.6)

Tablo 2.6. [13] TNF- $\alpha$  üretimini indükleyen majör fizyolojik etkenler

Lipopolisakkarit	Çeşitli virüsler
Mycobacteria	Parazitler
Antikor-antijen kompleksleri	Çeşitli sitokinler (IL-1)
İnflamatuar medyatörler	TNF- $\alpha$ (otokrin aktivite)
Bakteriyel enterotoksin	

TNF- $\alpha$  özellikle Gram(-) bakterilere karşı cevap oluşumunda, çeşitli tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitede ve septik şok, kaşeksi ve anoreksi gibi çeşitli patolojik olaylarda rol oynar.

TNF- $\alpha$ 'nın immün sistem üzerine etkileri;

- Makrofajlar, nötrofiller ve polimorfonükleer lökositler gibi çeşitli fagositik hücrelerin aktivasyonu
- Patojenlere karşı makrofajların ve eozinofillerin toksisitesinin artırılması
- Sınıf I interferonlara benzer şekilde antiviral aktivite
- T lenfositlerine bağlı IL-2 proliferasyonunun artırılması
- TNF ayrıca inflamatuvar cevabın oluşumunda önemli rol oynar ve bu TNF'in en önemli fizyolojik aktivitesidir.

TNF- $\alpha$  transforme olmuş hücreler üzerine çok büyük oranda sitotoksik etki gösterir. Ancak tüm tümör hücre tiplerinin ölümünü indükleyemez. TNF- $\alpha$  apoptozis ve nekrozis yolu ile duyarlı hücrelerin ölümüne aracılık eder [13]. Antitümör etkisinin doza bağlı olduğu ve lokal verilşte (tümör içine) en iyi sonuçların alındığı belirtilen TNF ile sistemik uygulamada da tümörde iyileşme gözlenmiştir. TNF'nin interferonlarla birlikte bulunması halinde sitotoksik etkisinin arttığı gösterilmiştir. Diğer endojen faktörler ile *in vivo* etkileşme sitotoksik etkisini artırabilir [5].

Aşağıdaki nedenlerle TNF'ye antikanser bir ajan olarak gösterilen ilgi azalmıştır:

- Birçok tümör çeşidi TNF'nin gerçekleştirdiği harabiyete duyarlı değildir. Bazı tümör hücreleri TNF'yi otokrin bir büyüme faktörü olarak sentezler.
- TNF'nin majör biyolojik aktivitesi tümör hücre nekrozu değildir.
- Bu sitokin sistemik olarak terapötik dozda uygulandığında genellikle şiddetli yan etkiler gelişir [13]

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre TNF- $\alpha$ 'nın endojen bir promoter ve kanser gelişiminde bir medyatör olduğuna dair inanç artmaktadır [7,8,9]. Buna göre herhangi bir bileşik tarafından TNF- $\alpha$ 'nın salımının inhibisyonu tümör gelişiminin inhibisyonunda anahtar rol oynar [11].

Yapılan çalışmalar, özellikle (-)-EGKG'nın TNF- $\alpha$  salımını inhibe ettiğini göstermektedir [3,9-11,16,24].

## 2.10. Yeşil Çay ile Yapılan Bazı Hücre Kültürü Çalışmaları

Epidemiyolojik çalışmalar yeşil çay tüketiminin insanlarda birçok kanser türünün gelişimini engellediğini göstermiştir. Bu etkinin mekanizmalarını bulmak ve şiddetini belirlemek amacıyla çeşitli hücre kültürü sistemlerinde yeşil çay ve bileşenlerinin etkileri çalışılmıştır.

Ahmad, Gupta ve Mukhtar [16] insan epidermoid karsinoma hücreleri (A431) ve normal insan epidermoid keratinositleri (NHEK) ile yaptıkları çalışmada EGKG'ın doza bağlı olarak hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olduğunu, hücre siklusunu G0/G1 fazında durdurduğunu ve A431 hücrelerinde apoptozisi indüklerken keratinositlerde böyle bir etkisinin olmadığını gözlemişlerdir. EGKG uygulamasının (10 – 80  $\mu$ M) doza bağlı olarak A431 ve NHEK hücrelerinin sitoplazma ve nukleuslarındaki NF $\kappa$ B seviyesinde düşmeye neden olduğu gözlenmiştir. Bu hücrelerde EGKG uygulamasının doza bağlı olarak TNF- $\alpha$  inhibisyonuna ve LPS aracılıklı NF $\kappa$ B aktivasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre kanser



hücrelerinde EGKG'nin neden olduğu hücre siklusu deregülasyonu ve apoptozisin; NF $\kappa$ B inhibisyonu yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

Islam ve arkadaşları [17] HTB-94 insan kondrosarkoma hücrelerinde EGKG'nin doza bağlı olarak apoptozisi indüklediğini ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Gelişen apoptozisin mekanizması incelendiğinde EGKG uygulamasının DNA fragmantasyonuna, kaspaz-3/CPP32 aktivitesinin indüksiyonuna ve ölü substrat poli(ADP-riboz)polimerazın (PARP) bölünmesine neden olduğu görülmüştür.

Morre, Bridge ve arkadaşları [18] HeLa ve insan meme adenokarsinoma hücrelerinde EGKG'nin memeli plazma membranında bulunan ve transforme olmuş hücrelerde aktive olan kansere spesifik, ilaca duyarlı NADH-oksidad enzimini seçici olarak inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Meme epitel hücrelerinin gelişimi ile karşılaştırıldığında, EGKG kültürdeki HeLa ve meme adenokarsinoma hücrelerinin gelişimini seçici olarak inhibe etmiştir. Hücre yüzey NADH- oksidad aktivitesinin inhibisyonu ile EGKG tarafından indüklenen apoptozisin doğru orantılı olduğu bulunmuştur.

Otsuka, Ogo ve arkadaşları [19] insan ve fare lösemi hücrelerinde (NFS60) EGKG'nin inhibitör etkisini incelemişler ve 50  $\mu$ M EGKG ile tüm hücre türlerinde DNA sentezinin %50'den fazla azaldığını bulmuşlardır. Ölü hücrelerin tümü muhtemelen EGKG tarafından büyüme faktörlerinin inhibisyonu sonucu gelişen apoptozisin karakteristik özelliklerini göstermiştir.

Kennedy, Matsumoto ve arkadaşları [20] Ehrlich tümör hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin sitotoksitesisi ile hücrel tiyol (-SH) gruplarının ilişkisini araştırmışlardır. Yeşil çay ekstraktının (100  $\mu$ g/mL) ve polifenolik bileşeni olan EGK'nin (100  $\mu$ M) varlığında hücrel nonprotein (GSH) ve protein-sülfidril (PSH) seviyelerinin önemli oranda düştüğü ve bu nedenle hücrelerin yaşamlarını sürdüremediği bulunmuştur.

Komatsu, Tauchi ve arkadaşları [21] fare C3H10T1/2 fibroblast hücreleri kullanarak EGKG'nin UV ile indüklenen onkojenik transformasyona karşı

antikarsinojenik aktivitesini araştırmışlardır. 15 µM EGKG ile transformasyon sıklığı normal düzeye kadar inmiştir. Bu etki doza bağlıdır. Sitotoksik etkinin çok düşük olduğu 5 µM konsantrasyonda EGKG uygulandığında bile transformasyonda önemli oranda supresyon gözlenmiştir.

Chen, Schell ve arkadaşları [22] EGKG'ın inhibitör etkisinin kanser hücrelerine spesifik olup olmadığını anlamak için SV40 virüsü transforme edilmiş W138 insan fibroblastlarında (W138VA) ve normal W138 hücrelerinde EGKG'ın büyüme üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. 40 µM EGKG'ın W138VA hücrelerinin gelişimini tamamen inhibe ederken; W138 hücrelerinin gelişimini hiç etkilemediği bulunmuştur. 40 – 200 µM konsantrasyon aralığında EGKG W138VA hücre kültürlerinde apoptozisi önemli oranda indüklerken, W138 kültürlerinde bu etki görülmemiştir.

Paschka, Butler ve arkadaşları [23] LNCaP, PC3 ve DU145 prostat kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada EGKG'ın hücre gelişiminin inhibisyonunda en potent kateşin olduğunu gözlemişlerdir. EGKG tarafından indüklenen inhibisyonun nukleus morfolojisinde ve DNA fragmentasyonundaki değişimlerle belirgin apoptotik hücre ölümü yolu ile meydana geldiği bulunmuştur .

Suganuma, Okabe ve arkadaşları [24] PC-9 insan akciğer kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada galloil yapısı taşımayan inert bir çay polifenolü olan (-)-Epikateşinin, EGKG ve diğer galloil yapısı taşıyan çay polifenolleri tarafından ortaya çıkarılan BALB/c-3T3 hücrelerinden TNF-α salımının inhibisyonunu, PC-9 hücrelerinin gelişiminin inhibisyonunu ve apoptozisi doza bağlı olarak artırdığını gözlemişlerdir. Ayrıca Sulindac ve Tamoxifen gibi diğer kanser önleyici ajanlar da EGKG'ın apoptozisi indükleyici etkisini sinerjistik olarak artırmıştır.

Sadzuka ve arkadaşları [3] Ehrlich ascite hücreleri implante edilen CDF<sub>1</sub> ve BDF<sub>1</sub> farelerinde doksorubisinin tümör inhibitör etkisinin oral yeşil çay uygulamasıyla arttığını gözlemişlerdir. Yeşil çay uygulamasının tümörde doksorubisin seviyesini artırırken normal dokuda böyle bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sachinidis, Seul ve arkadaşları [25] A172 glioma hücrelerinde yaptıkları çalışmada yeşil çay polifenollerinin PDGF- $\beta$  (platelet derived growth factor) - reseptörünün tirozin kinaz aktivitesini bloke ederek antikanser etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bu etkiden gallat yapısı taşıyan polifenollerin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Demeule, Brossard ve arkadaşlarının [26] yaptığı çalışmaya göre yeşil çay polifenolleri, özellikle EGKG, insan tümörlerinin ilerlemesinden sorumlu olan metalloproteinaz familyasına ait enzimlerin (MMP-2, MMP-9, MMP-12) aktivitesini inhibe etmektedir.

Jankun ve arkadaşları [3] yaptıkları çalışmada EGKG'nin antikanser aktivitesinin, insan kanserlerinde en sık rastlanan enzim olan ürokinaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olabileceğini göstermişlerdir.

Dong ve arkadaşları [3] JB6 fare epidermal hücrelerinde yaptıkları çalışmada EGKG ve teaflavinlerin EGF (epidermal growth factor) ve TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate) tarafından indüklenen hücre transformasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır. EGKG ve teaflavinler aynı zamanda tümör gelişiminde rol oynayan aktivatör protein 1'e (AP-1) bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi ve DNA'ya bağlanmayı inhibe etmiştir.

Bertolini, Fusetti ve arkadaşlarının [27] yaptıkları çalışmada intraperitoneal olarak insan non-Hodgkin's lenfoma (NHL) hücreleri, Namalwa, RAP1-E10 ve HS-Sultan hücreleri transplante edilen NOD/SCID farelerinde yeşil çay Namalwa tümörlerini %50 oranında önlemiş, RAP1-E10 ve HS-Sultan tümör gelişimini önemli oranda inhibe etmiştir. Bir kemoterapötik ilaç olan siklofosfamidin tolere edilebilen maksimum dozunun uygulanması Namalwa tümör oluşumunu önleyememiştir.

## 2.11. ay Polifenollerinin Tayini

Goto ve arkadaşları [28] çay polifenollerini ayırmak amacıyla bir LC-UV metodu geliştirmiştir. Bu sistemde C<sub>18</sub> ters fazlı LC kolonu ve mobil faz olarak da su:asetonitril:fosforik asit karışımı kullanmışlardır. Dedektör olarak UV veya MS kullanılmıştır.

Yapılan kapiller elektroforez çalışmalarına göre misel elektrokinetik kapiller kromatografi büyük miktardaki kateşinler için kapiller zon elektroforeze göre daha iyi ayrılma, çözülme ve miktar hesaplaması sağlamıştır[28].

Zhu ve Xiao [28] silikajel kaplı plaklarda mobil faz olarak kloroform:etil format:n-butanol:formik asit karışımı kullanarak ince tabaka kromatografisi ile aydaki kateşinleri ayırmışlardır. Ayrılan kateşinleri 254 nm dalga boyunda UV ile belirgin hale getirmiş ve kateşinlerin alanlarına bağlı olarak miktar tayini yapmışlardır.

Tsuchiya, Sato ve arkadaşları [29] çay polifenollerinin tayini için geliştirdikleri YBSK sisteminde CLC-C8 (M) kolon (250 x 4,6 mm, partikül büyüklüğü 5 m) kullanmışlardır. Mobil faz olarak bir gradient sistem kullanmışlardır. Mobil faz A asetonitril:trifloroasetik asit:su (10:0,3:89,7 v/v/v); Mobil faz B asetonitril:su (30:70 v/v) şeklinde hazırlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve kolon ısısı 50 C'de tutulmuştur. Dedektör olarak SPD-M10AVP diode array sistemi kullanılmıştır. Rutin analizde eluatların 269, 274, 277 ve 278 nm dalga boyundaki absorpsiyonları ölçülmüştür. Standart kateşinlerden elde edilen diode array spektrumuna göre maksimum absorpsiyonlar EGK için 269 nm, EK için 278 nm, EGKG için 274 nm ve EKG için 277 nm bulunmuştur.

Lee ve Ong [30] yaptıkları çalışmada çay polifenollerinin analizinde YBSK ve kapiller elektroforez yöntemlerini kullanmışlar ve polifenollerin elektroforez yönteminde daha hızlı tayin edilirken YBSK yönteminin daha hassas olduğunu gözlemişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan hücreler

TNF testinde ve direk sitotoksitenin saptanmasında HeLa epitel benzeri insan serviks adenokarsinoma hücreleri kullanılmıştır. Hücreler Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından sağlanmıştır. Makrofaj hücreleri İsviçre albinosu farelerinden (4 – 8 haftalık) elde edilmiştir.

##### 3.1.2. Kimyasal madde ve çözeltiler

Epikateşin	(Sigma)
Epikateşin-3-gallat	(Sigma)
Epigallokateşin	(Sigma)
Epigallokateşin-3-gallat	(Phytoplan)
Tiyoglikollat	(Sigma)
Nötral kırmızısı boyası	(Sigma)
Formaldehit	(Sigma)
Kalsiyum klorür	(Sigma)
Asetik asit	(Sigma)
Etil alkol	(Sigma)
Aktinomisin D	(Sigma)
Sodyum hidroksit	(Merck)
Sodyumklorür	(Merck)
Potasyumklorür	(Merck)
Disodyumhidrojenfosfat . 2 H <sub>2</sub> O	(Merck)
Potasyumdihidrojenfosfat	(Merck)
Asetonitril	(Merck)
Trifloroasetik asit	(Merck)

Trifloroasetik asit	(Merck)
Metanol	(Merck)
Bidistile su	

### 3.1.3. Kültür ortamı çözeltileri

a. RPMI-1640 Medium (2.0 g/L NaHCO <sub>3</sub> , L-Glutaminsiz)	(Sigma)
b. HEPES(1M)(50x)[N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-etanol-sülfonik asit]	(Sigma)
c. MEM-Vitamin (100x)	(Sigma)
d. NEAA (100x) Esansiyel olmayan aminoasitler	(Sigma)
e. Penisilin/Streptomisin – 10.000U/10.000µg/mL	(Biological Ind.)
f. L-Glutamin (200mM)	(Sigma)
g. FCS – Fetal buzağı serumu	(Biological Ind.)
h. Tripsin – EDTA (10x)	(Sigma)

a, b ve d sıralamalı çözeltiler buzdolabında (+4°C), c, e, f, g, h sıralamalı çözeltiler derin dondurucuda (-70°C) saklanmıştır.

### 3.1.4. Kullanılan aygıtlar

Steril çalışma kabini (Holten)
İnkübatör (Heraeus)
Santrifüj (Biofuge17RS)
Mikroskop (Olympus CK <sub>2</sub> )
Eliza cihazı (Biotech EL <sub>x</sub> 808)
Otomatik pipetör (Eppendorf)
Doku kültür şişesi (TPP)
96 gözlü plaka (Corning)
Steril pipet (5cc, 10cc ve 25cc)
Steril otomatik pipetör ucu (100 – 1000µL – Eppendorf)

Steril enjektör filtresi (0.22µm ve 0.45µm - Orange Scientific)  
Steril santrifüj tüpü (50mL TPP)  
Pipet (0.5-10µl, 10-100 µL ve 100-1000 µl Eppendorf)  
12 kanallı pipet (Eppendorf)  
LC10A gradient sıvı kromatografisi (Shimadzu)  
SPD-M10A Diode array dedektör (Shimadzu)  
LC10AT gradient donanımlı pompa (Shimadzu)  
CBM-10A iletişim sağlayan modül (Shimadzu)  
20µL hacimli loop bulunan Rheodyne enjeksiyon tablası (Cotati)  
5µm, C<sub>8</sub> 150 x 3,00 mm kolon (Macherey-Negal)  
B-220 ultrasonik banyo (Branson)

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Yeşil çay infüzyonunun hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılan yeşil çay infüzyonları her deneyden önce taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır. İnfüzyonun hazırlanmasında 2 g çay tartılmış, üzerine 100ml kaynar su eklenerek 5 dakika kaynatılmıştır. Sıvı kısım önce süzgeç kağıdından, daha sonra 0.45 µm'lik enjektör filtresinden süzülerek sterilize edilmiştir.

### **3.2.2. İmmünolojik çalışmalar**

Bu bölümde yeşil çayın %2'lik infüzyonunun makrofaj ve HeLa hücreleri üzerinde, TNF testi ile ve direk olarak sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bütün çalışmalar steril gereçler kullanılarak yapılmıştır.

### 3.2.2.1. Besiyeri hazırlanması

500 mL RPMI-1640 medyum (steril) içine aşağıda belirtilen çözeltiler katılmıştır.

- i) 10 mL Hepes – tampon çözelti (1M)(10x)
- ii) 5 mL Mem-Vitamin (100x)
- iii) 5 mL NEAA (100x)
- iv) 5 mL Penisilin/Streptomisin – 10.000U/10.000µm/mL)
- v) 10 mL L-Glutamin (200mM)
- vi) 50 mL FCS

Bütün maddeler 0.22µm çapında enjektör filtresinden süzülerek konulmuştur. FCS ilave edilmeden önce 1 saat 56<sup>0</sup>C’de su banyosunda inaktive edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 50 mL’lik steril şişelere konularak kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.2.2.2. Hücre pasajı (Besiyerinin yenilenmesi)

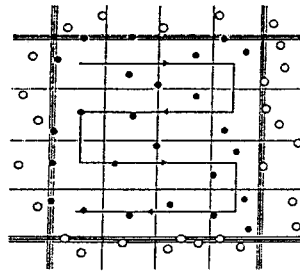
Bu işlem immünolojik deneylerde kullanılan HeLa hücrelerini canlı tutmak için 2 – 3 günde bir rutin olarak yapılmıştır.

- i) İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi hafifçe çalkalanarak, ölü hücrelerin besiyeri çözeltilisine geçmesi sağlanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır.
- ii) Kültür şişesinde kalan serum artıklarını temizlemek için şişeye 5 mL N RPMI-1640 konularak yıkanmış (2 kez) ve yıkama çözeltileri atılmıştır.
- iii) Kültür şişesine 5 – 10 mL tripsin çözeltisi (1/10 oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir) konularak hafifçe çalkalanmış ve 1 dakika dinlendirildikten sonra tripsin çözeltisi pipetle alınarak şişenin ağzı kapatılıp inkübatörde 5 – 10 dakika bekletilmiştir (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37<sup>0</sup>C’de)



- iv) İnkübatörden alınan kültür şişesine 10 – 20 mL kadar besiyeri ilave edilerek çalkalanmış ve 5'er veya 10'ar mL'lik porsiyonlara bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır.
- v) Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37<sup>0</sup>C)

### 3.2.2.3. Neubauer odacığında hücrelerin sayılması



Şekil 3.1. [31] Neubauer hücre sayma odacığının bir bölmesi

Şekilde Neubauer odacığının 16 küçük bölmeden oluşan bir bölmesi görülmektedir. Herbir bölmenin hacmi 0.1 µL'dir. Siyah noktalar ile gösterilen hücreler sayılmış, beyaz noktalar ise sayılmamıştır. Herbiri 16 küçük bölmeden oluşan 4 bölme sayılarak ortalamaları alınmış ve bir bölmeye (0.1 µL'ye) düşen hücre sayısı saptanmıştır.

### 3.2.2.4. Tümör nekroz faktör testi [32]

#### Makrofaj hücrelerini elde etme yöntemi

Fareye %3'lük tiyoglikollat çözeltisi (RPMI-1640 medyum içinde hazırlanmıştır) i.p. olarak verilmiş ve 4 gün sonra farelerin karın boşluğu açılarak steril bir enjektör ile 5mL soğuk fosfat tamponu (magnezyum ve kalsiyumsuz) farenin karın boşluğuna enjekte edilmiştir. Enjektör çıkarılmadan 5 dakika lavaj

sonra aynı enjektörle verilen tampon çözeltinin yaklaşık 4ml'si geri çekilmiş ve böylece makrofaj hücreleri elde edilmiştir.

Kullanılan fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.56)

- |   |       |
|---|-------|
| i) NaCl   | 8 g   |
| ii) KCl   | 0.2 g |
| iii) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O | 1.2 g |
| iv) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.2 g |

Maddeler bir miktar suda çözülüp su ile 1L'ye tamamlanmıştır.

### **Makrofaj hücre kültürü**

- i) Makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltiden yaklaşık 20 µl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında 0.1 µl'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- ii) Bir santrifüj tüpüne alınan tampon çözeltisi santrifüj edilmiştir.

#### **Santrifüj koşulları**

Devir sayısı : 1500devir/saniye

Isı : 10 °C

Süre : 10 dakika

Fren hızı : 6

- iii) Santrifüjden alınan makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltinin üst kısmı atıldıktan sonra dibe çöken makrofaj hücrelerinin üzerine hücre sayısı 1.10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır
- iv) Elde edilen makrofaj hücre süspansiyonu her göze 100 µl olacak şekilde plakaya dağıtılarak (1.10<sup>5</sup> makrofaj/100 µl) inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37 °C).

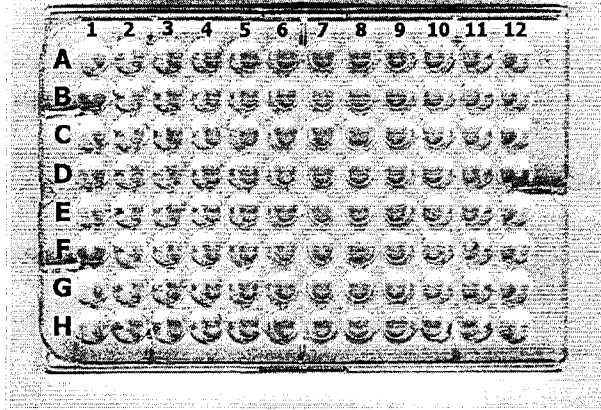
### **HeLa hücrelerinin kültürü**

- i) Hücre pasajının dördüncü basamağında inkübatörden alınan kültür şişesine 5 mL besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- ii) Süspansiyon halindeki çözeltiliden 20 µL alınarak Neubauer hücre sayma odacığında bölüm 3.2.2.3'te açıklanan yöntemle 0.1 µL'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- iii) HeLa hücre sayısı  $2.10^6/10$  mL olacak şekilde besiyeri ilave edildikten sonra kültür şişesi çalkalanmıştır.
- iv) Hücre süspansiyonu plakaya, her göze 100 µL olacak şekilde dağıtılıp ( $2.10^4$  HeLa/100 µL) inkübatörde 20 saat inkübe edilmiştir. (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37°C)

### **Makrofaj hücrelerinin üzerine test maddelerinin verilmesi**

- i) İnkübatörde 24 saat bekleyen makrofaj kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için plaka ters çevrilerek dökülmüştür.
- ii) Plakada makrofaj hücrelerinin bulunduğu gözlere 100'er µL besiyeri ilave edilmiştir.
- iii) Şekil 3.2'de görülen plakanın yatay doğrultudaki A sırasındaki gözlerine 100 µL çay infüzyonu verildikten sonra; A sırasındaki gözlerden başlayarak ve her defasında 100'er µL alınarak düşey doğrultuda 8 göz aşağıya inilmiş ve böylece basamak şeklinde seyreltme yapılmıştır. Bu işlem sonunda birinci gözde (A-1) 50 µL infüzyon/100 µL; sekizinci gözde (H-1) 0.406 µl infüzyon /100 µL olacak şekilde bir konsantrasyon oluşumu sağlanmıştır.

- iv) Plakanın bir gözüne infüzyon hazırlamak için kullanılan RPMI konulmuş ve aynı şekilde seyreltme yapılarak blank hazırlanmıştır.
- v) Üzerlerine test edilecek infüzyon verilen makrofaj kültürleri 24 saat inkübatörde tutulduktan sonra (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37 °C), üst kısmı HeLa hücrelerine aktarılmıştır.



Şekil 3.2. 96 gözlü plaka

**Makrofaj kültürlerinin üst kısımlarının HeLa hücreleri üzerine aktarılması**

- i) 24 saat sonunda inkübatörden alınan makrofaj kültürlerinin üst kısımları HeLa hücrelerinin üzerine aktarılmıştır.
- ii) Daha sonra her göze 100 µL Aktinomisin D çözeltisi verilmiştir.  
(0.5 µg/göz)
- iii) HeLa hücrelerinin bulunduğu plaka 18 saat inkübe edilmiştir. (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37°C)

### HeLa hücrelerinin boyanması [33]

- i) Test maddelerini uygulama periyodu sonunda plaka inkübatörden alınarak her göz 100µL fosfat tamponu ile yıkanmıştır.
- ii) Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra her göze 100µL nötral kırmızısı boya çözeltisi (40µg/mL tam medyum içinde) verilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- iii) 3 saat sonra plaka inkübatörden alınarak boya çözeltisi atılmış ve gözler formaldehit / kalsiyum klorür çözeltisi ile yıkanmıştır.

#### Formaldehit / CaCl<sub>2</sub> Çözeltisi

- 1.3 mL Formaldehit (%37'lik)
- 10 mL %10 CaCl<sub>2</sub>
- 89 mL distile su

Daha sonra plakalar absorban kağıt üzerine alınarak kurutulmuştur.

- iv) Her göze 100µL asit/etanol solüsyonu verilerek 15 dakika oda ısısında bekletilmiş ve homojen hale getirildikten sonra 540nm'de ELISA cihazında absorban ölçümü yapılmıştır.

#### Asit / Etanol Solüsyonu

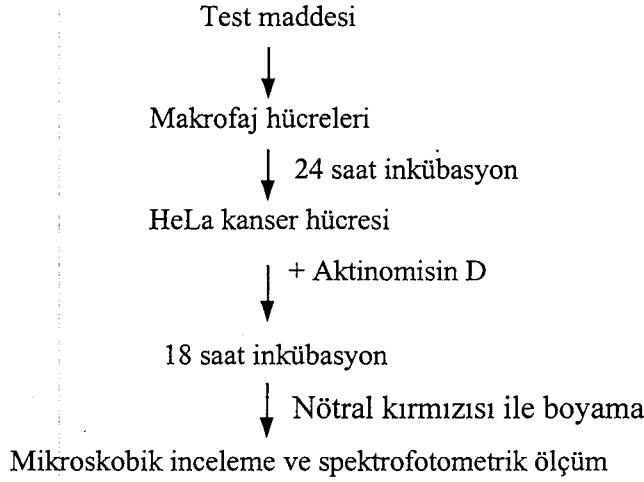
- 1 mL glasiyal Asetik asit
- 100 mL %50 Etanol

### Sonuçların değerlendirilmesi

Boyama işlemlerinden sonra HeLa hücrelerini içeren plaka mikroskopta incelenmiş ve ELISA cihazında hücrelerden açığa çıkan boyanın absorban değerleri okunarak verilen doza karşı grafiğe geçirilmiştir.

### TNF testinin şematik gösterimi

TNF testi şema 1’de özetlenmiş olarak verilmiştir.



### **3.2.2.5. Direk sitotoksisite tayini**

#### HeLa hücrelerinin kültürü

- i) Hücre pasajının dördüncü basamağında inkübatörden alınan kültür şişesine 5 mL besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- ii) Süspansiyon halindeki çözeltiliden 20 µL alınarak Neubauer hücre sayma odacığında bölüm 3.2.2.3’te açıklanan yöntemle 0.1 µL’ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- iii) HeLa hücre sayısı  $2 \cdot 10^6/10$  mL olacak şekilde besiyeri ilave edildikten sonra kültür şişesi çalkalanmıştır.
- iv) Hücre süspansiyonu plakaya, her göze 100 µL olacak şekilde dağıtılıp ( $2 \cdot 10^4$  HeLa/100 µL) inkübatörde 20 saat inkübe edilmiştir. (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37<sup>0</sup>C)

### **Maddelerin uygulanması**

- i) Her göze  $2 \cdot 10^4$  hücre ekilmiş ve 100  $\mu$ L besiyeri ilave edilmiştir.
- ii) A sırasındaki gözlere 100'er  $\mu$ L infüzyon verilmiş ve aşağı doğru seyreltme yapılmıştır.
- iii) Plaka 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37<sup>0</sup>C)

### **HeLa hücrelerinin boyanması**

Maddelerin uygulanma prosedürü bittikten sonra hücreler TNF testinde anlatılan şekilde boyanmıştır..

### **Sonuçların değerlendirilmesi**

Boyama işleminden sonra HeLa hücrelerini içeren plaka mikroskopta incelenmiş ve ELISA cihazında hücrelerden açığa çıkan boyanın absorbans değerleri okunarak verilen doza karşı grafiğe geçirilmiştir.

### **3.2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Yöntemi ile Çayda Bulunan Polifenollerin Miktar Tayini**

Bu çalışmada biyolojik aktivite testlerinde kullanılan yeşil çay infüzyonunda bulunan antikarsinojenik aktiviteden sorumlu ana bileşenler olan polifenollerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Yüksek ayırma gücünün yanı sıra seçiciliği ve düşük saptama limiti gibi özelliklerinden dolayı YBSK hemen her çeşit analizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan infüzyon bölüm 3.2.1'de açıklanan şekilde hazırlanmıştır. Miktar tayini için Tsuchiya ve arkadaşlarının [29] önerdiği yöntem kullanılmıştır.

#### **3.2.3.1. Hareketli Faz**

Çalışmada hareketli faz olarak iki fazlı bir gradient sistem kullanılmıştır.

Hareketli Faz A: Asetonitril:Trifloroasetik asit:Su (10:0.3:89.7; v/v/v)

Hareketli Faz B: Asetonitril:Su (30:70; v/v)

Hazırlanan hareketli fazların içindeki oksijenin uzaklaştırılması için çözeltilerden helyum gazı geçirilmiştir. Ayırma ve miktar tayini işlemleri bu çözeltiler ile gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz geçişi 0. dakikada %100 A çözeltisi geçişi ile başlamış ve 17. dakikada %25 A: %75 B çözelti karışımı geçecek şekilde doğrusal bir gradient elüsyonu sağlanmıştır. 17. dakikadan sonra 25. dakikaya kadar %100 A çözeltisi geçirilerek kolonun temizlenmesi sağlanmıştır. Akış hızı 1mL/dakika olarak uygulanmıştır.

Deneylere başlamadan önce kolon %75'lik metanol ile bir saat yıkandıktan sonra, hareketli fazlar ile yarım saat yıkanarak kolonun şartlanması sağlanmıştır.



### 3.2.3.2. Standart Çözeltiler

15.9mg EK 50mL %10 metanolde, 5mg EGK 3mL bidistile suda, 4.4mg EKG 10mL %10 metanolde ve 4.4mg EGKG 10 mL bidistile suda çözülerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler ve karışımlar bu çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır.

Standart stok çözeltilerin bulunduğu kaplar alüminyum folia ile kaplanarak buzdolabında +4°C’de saklanmıştır.

Analiz sırasında her maddenin stok çözeltisinden 100’er mikrolitre alınarak karıştırılmış ve standart karışım çözeltisi olarak kullanılmıştır.

### 3.2.3.3. Dedeksiyon

Gerçekleştirilen çalışmada dedektör olarak diode array dedektör kullanılmış, ön çalışmalarda 269, 275 ve 278nm dalga boylarında dedeksiyon yapılmıştır. Daha sonra pik morfolojileri dikkate alınarak 278nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

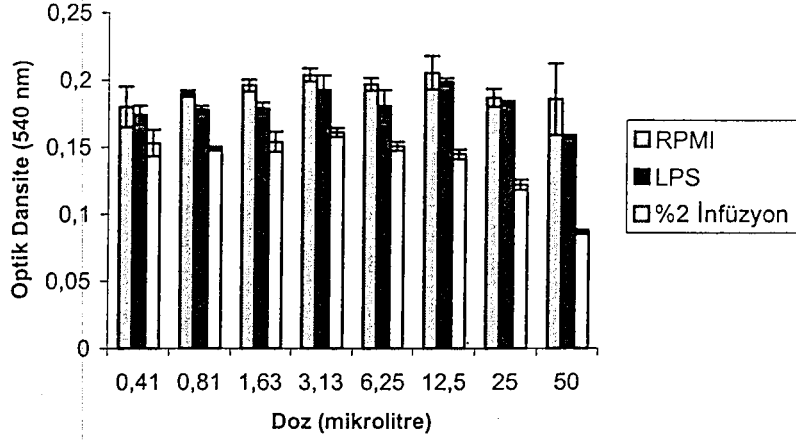
### 4.1. TNF Testi ve Direk Sitotoksisite Testi

TNF testinde makrofajlardan TNF salgılanmasını stimule ettiği bilinen bir madde olan lipopolisakkarite [15] karşı yeşil çayın %2'lik infüzyonunun sitotoksik etkisine bakılmış ve istatistiki olarak anlamlı oranda ( $p<0.05$ ) sitotoksisite farkı bulunmuştur. TNF testinde RPMI, lipopolisakkarit (LPS) ve yeşil çay infüzyonu verilen gözlerde okunan ortalama optik dansiteler çizelge 4.1'de verilmiştir. Optik dansiteler 540 nm'de okunmuştur. Verilen değerler deney sonunda canlı kalan hücrelerden salınan nötral kırmızısı boyasının optik dansitesidir. Dolayısıyla bu optik dansiteler, verilen dozlardaki ortalama canlı kalan hücre oranını vermektedir.

Çizelge 4.1: TNF testinde 540nm'de elde edilen optik dansite ortalamaları

Hacim ( $\mu$ L)	RPMI	LPS (1mg/ml)	%2 İnfüzyon
50	0.186 $\pm$ 0.027	0.158 $\pm$ 0.0013	0.087 $\pm$ 0.0017
25	0.187 $\pm$ 0.0018	0.183 $\pm$ 0.0016	0.122 $\pm$ 0.0073
12.5	0.206 $\pm$ 0.012	0.199 $\pm$ 0.0027	0.145 $\pm$ 0.0037
6.25	0.197 $\pm$ 0.0049	0.181 $\pm$ 0.0120	0.151 $\pm$ 0.0033
3.125	0.204 $\pm$ 0.0052	0.193 $\pm$ 0.0110	0.161 $\pm$ 0.0034
1.625	0.196 $\pm$ 0.0047	0.179 $\pm$ 0.0042	0.154 $\pm$ 0.0075
0.812	0.190 $\pm$ 0.0023	0.178 $\pm$ 0.0099	0.149 $\pm$ 0.0015
0.406	0.180 $\pm$ 0.0150	0.174 $\pm$ 0.0070	0.153 $\pm$ 0.0098

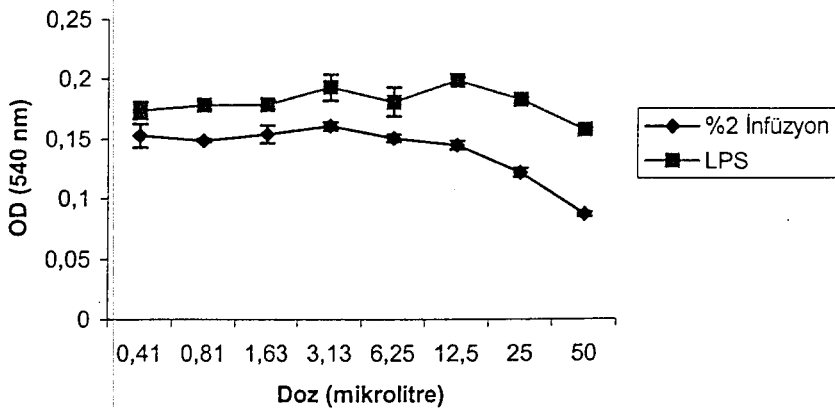
\*Beş deneyden elde edilen sonuçların ortalamaları verilmiştir.



Şekil 4.1: TNF testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi

Şekil 4.1.de TNF testinde elde edilen sonuçlar grafiksel olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar ANOVA varyans analizi ile Bonferroni testi uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve RPMI ve LPS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken, infüzyon grubu ile diğer iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.2’de TNF testinden elde edilen sonuçlara göre LPS ve infüzyon grafiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.2: TNF testi sonuçlarına göre LPS ve infüzyonun grafiksel olarak karşılaştırılması

Şekil 4.2'deki grafikte görüldüğü gibi LPS verilen gözlerden elde edilen sonuçlar kısmen doğrusal bir seyir izlerken, infüzyon verilen gözlerde hem sitotoksosite oranı daha yüksek olduğu, hem de 6.25 µL hacimde uygulamadan sonra sitotoksosite oranında artış gösterdiği gözlenmektedir..

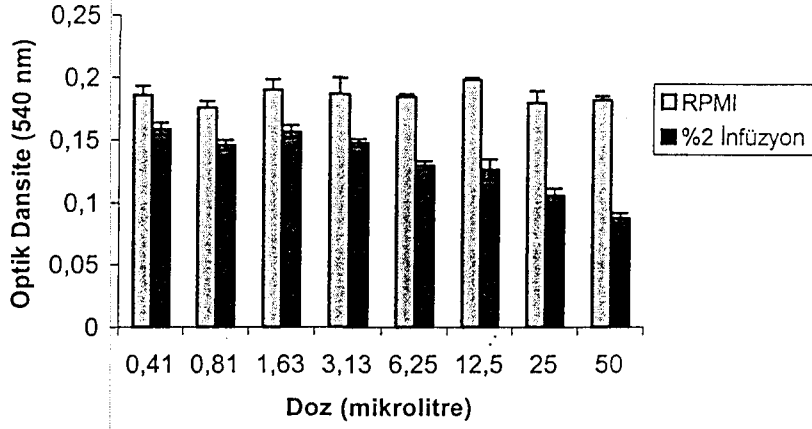
Direk sitotoksosite testinde RPMI ve %2'lik yeşil çay infüzyonu HeLa hücreleri üzerine verilmiş ve sonuçlar 540 nm'de okunmuştur. Bu testte de okunan optik dansiteler canlı kalan hücrelerden şalınan nötral kırmızısı boyasının dansiteleridir. Sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Direk sitotoksosite testinde 540 nm'de elde edilen optik dansite ortalamaları

Hacim (µL)	RPMI	%2 İnfüzyon
50	0.182 ± 0.0034	0.088 ± 0.0040
25	0.180 ± 0.0093	0.106 ± 0.0058
12.5	0.198 ± 0.0048	0.127 ± 0.0083
6.25	0.185 ± 0.0021	0.130 ± 0.0037
3.125	0.187 ± 0.0130	0.148 ± 0.0029
1.625	0.190 ± 0.0052	0.157 ± 0.0052
0.812	0.176 ± 0.0053	0.146 ± 0.0040
0.406	0.186 ± 0.0070	0.159 ± 0.0049

Direk sitotoksosite testinde elde edilen sonuçlar t testi uygulanarak değerlendirilmiş ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.3'te direk sitotoksosite testi sonucunda elde edilen veriler grafiksel olarak gösterilmiştir.



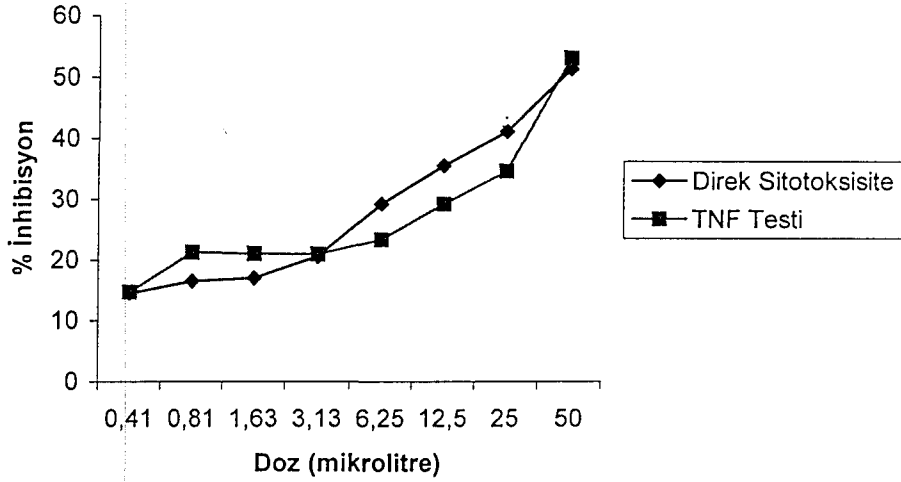
Şekil 4.3: Direk sitotoksisite testinden elde edilen sonuçların grafiksel gösterimi

Çizelge 4.3.'te %2'lik yeşil çay infüzyonu ile her iki test sonucunda elde edilen yüzde inhibisyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. %2Yeşil çay infüzyonu ile TNF testi ve direk sitotoksisite testi ile elde edilen yüzde inhibisyon değerleri

Doz (mikrolitre)	% İnhibisyon	
	TNF Testi	Direk sitotoksisite
50	53.12	51.41
25	34.64	41.11
12.5	29.23	35.55
6.25	23.32	29.25
3.125	20.96	20.60
1.625	21.10	17.10
0.812	21.25	16.57
0.406	14.75	14.49

Şekil 4.4'te TNF testi ve direk sitotoksisite testi sonucunda elde edilen yüzde inhibisyon değerleri grafiksel olarak karşılaştırılmıştır.

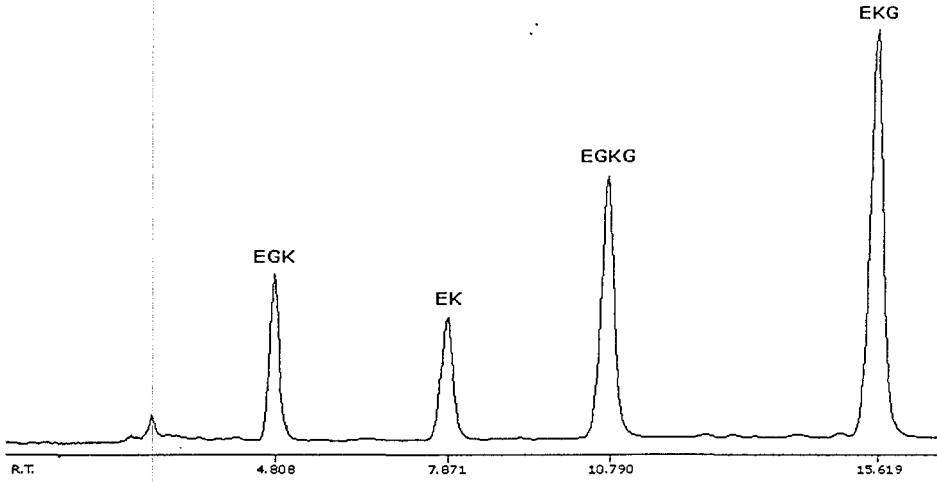


Şekil 4.4. %2 Yeşil çay infüzyonu ile HeLa hücreleri üzerinde elde edilen yüzde inhibisyon değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması

Bu sonuçlara göre yeşil çay polifenollerinin TNF salınımını inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu düşünce test sonucunda TNF testi uygulanan plakalardaki sitotoksisite oranının direk uygulamada elde edilen sonuçlardan daha düşük olmasına dayandırılmaktadır. Çünkü TNF salınması durumunda bu gözlerde hem TNF'in ve hem de süpernatantta bulunan polifenollerin etkisine bağlı olarak sitotoksisitenin daha yüksek oranda olması beklenirdi.

## 4.2. YBSK ile Çayda Bulunan Polifenollerin Analizi

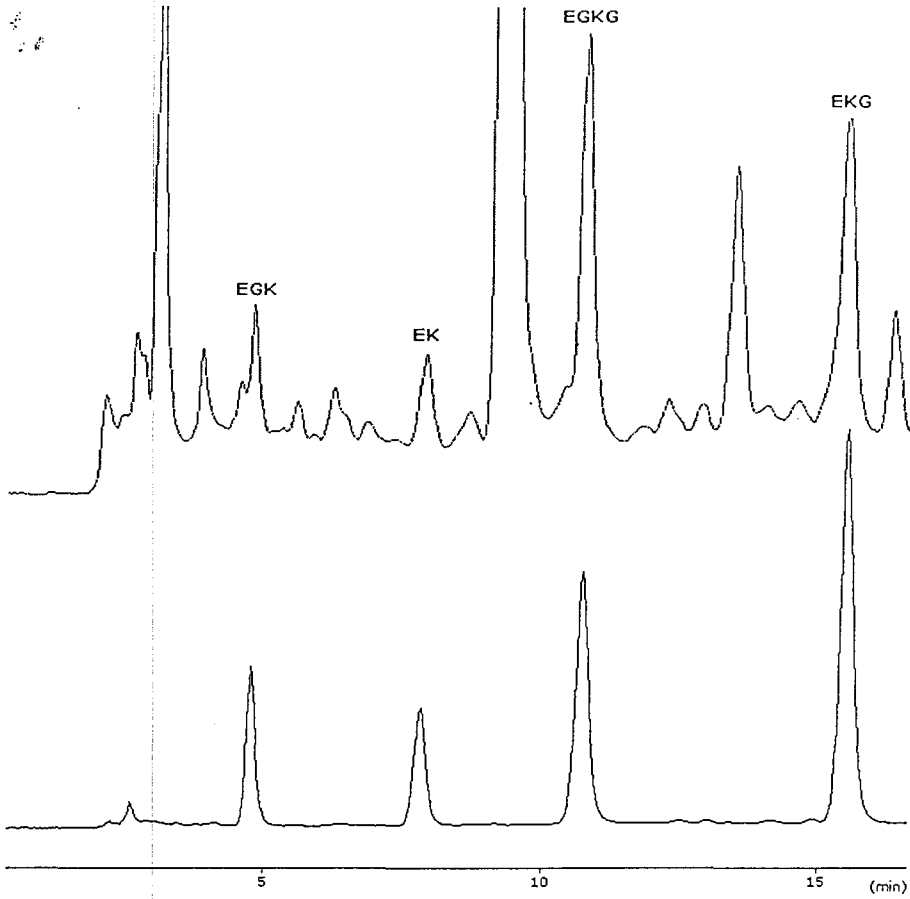
Bölüm 3.2.3'te anlatılan yöntem kullanılarak öncelikle standart madde çözeltileri tek tek YBSK cihazına verilerek alıkonma zamanları tespit edilmiş, daha sonra standart karışım çözeltisi verilerek maddelerin alıkonma zamanları ve pik alanları tespit edilmiştir. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5: Standart polifenol karışımına ait kromatogram

Çalışma çözeltilerinin stabilitesini incelemek amacıyla, buzdolabında +4°C'de saklanan çözeltiler ile oda sıcaklığında ve ışıktaki bırakılan çözeltilerin her gün kromatogramı alınarak alıkonma zamanları ve eğri altı alanları değerlendirilmiştir. Buna göre +4°C'de buzdolabında ve karanlıkta saklanan çözeltilerin en az dört gün süreyle stabl kaldığı, oda sıcaklığında ve gün ışığında bırakılan çözeltilerin ise stabilitelelerini ancak bir gün süreyle koruyabildiği gözlenmiştir.

Yöntemin tekrar edilebilirliği sağlandıktan sonra %2'lik yeşil çay infüzyonu enjekte edilerek analizi yapılmıştır. Standart polifenol karışımı ile yeşil çay infüzyonuna ait kromatogramlar şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6: a) Standart polifenol karışımına ait kromatogram  
b) Yeşil çay infüzyonuna ait kromatogram

Doğrusallık aralığının incelenmesi amacıyla maddelerin (EGK 3.2 µg/mL-16 µg/mL, EK 6.36µg/mL-31.8µg/mL, EGKG 0.88µg/mL-4.4µg/mL ve EKG 0.88µg/mL-4.4µg/mL konsantrasyon aralığında) standart çözeltileri hazırlanmıştır. Toplam beş konsantrasyon düzeyi için elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranlarının değerlendirilmesi sonucunda elde edilen kalibrasyon eşitlikleri çizelge 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi kullanılan gradient sistemle dört önemli polifenolün birbirinden son derece iyi ayrıldığı gözlenmektedir. Alıkonma zamanlarının sırasıyla EGK için 4.8, EK için 7.9, EGKG için 10.9 ve EKG için ise 15.6 dakikalar olduğu görülmektedir.



Çizelge 4.4: Standart maddelerin konsantrasyon alan ilişkileri

Standart Madde	Konsantrasyon Aralığı (µg/mL)	LOD	LOQ	Alıkonma Zamanı (dk)	Regresyon eğrisi Denklemi	Korelasyon Katsayısı (r)
EGK	3.2-16	1.06	0.35	4.8616±0.0246	942.2813x + 289.1	0.9968
EK	6.36-31.8	2.15	0.64	7.9992±0.0355	494.7956x – 885.3	0.9997
EGKG	0.88-4.4	0.30	0.09	10.9265±0.0353	10068.07x – 2176.45	0.9980
EKG	0.88-4.4	0.30	0.09	15.6675± 0.0359	15753x – 1527.49	0.9969

Sitotoksisite testlerinde kullanılan yeşil çayın %2'lik infüzyonunda YBSK yöntemi kullanılarak bulunan polifenol miktarları çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.5: %2'lik yeşil çay infüzyonunda bulunan polifenol değerleri

EGK (µg/mL)	EK (µg/mL)	EGKG (µg/mL)	EKG (µg/mL)
92.58	186.66	44.70	24.67

Kullanılan yeşil çayda bulunan esas etkili madde olan EGKG'nin miktarının düşük çıkması, bitkinin yetiştirme şartları, ürünün saklanma koşulları ve laboratuvar şartları gibi etkenlere bağlı olabilir.

## 5. KAYNAKLAR

1. WEISBURGER, J.H., *Tea and health: a historical perspective*, *Cancer Letters*, **114**, 315 – 317 (1997)
2. BRUNETON, J., *Pharmacognosy: phytochemistry, medicinal plants*, 2nd ed. Hampshire : Intercept, 1075 – 1079 (1999)
3. AHMAD, N., MUKHTAR, H., *Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications*, *Nutrition Reviews*, **57(3)**, 78 – 83 (1999)
4. ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K.H.C., *İmmün sistem, kanser ve polisakkaritler*, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantı Bildirisi*, Ankara, 1988
5. JONES, A.L., SELBYT, S., *Clinical applications of tumour necrosis factor*, *Progress in Growth Factor Research*, **1**, 107-122 [1989]
6. BAYTOP, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 180 – 181 (1999)
7. KURODA, Y., HARA, Y., *Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols*, *Mutation Research*, **436**, 69 – 97 (1999)
8. DUKE, J.A., *CRC Handbok of Medicinal Herbs*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 93 – 94
9. FUJIKI, H., SUGANUMA, M., OKABE, S., *Cancer inhibition by green tea*, *Mutation Research*, **402**, 307 – 310 (1998)
10. FUJIKI, H., *Two stages of cancer prevention with green tea*, *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **125**, 589 – 597 (1999)
11. FUJIKI, H., SUGANUMA, M., OKABE, S., *A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- $\alpha$ , and cancer preventive agents (-)-Epigallocatechin gallate and green tea – A Review*, *Cancer Detection and Prevention*, **24(1)**, 91 – 99 (2000)
12. INOUE, M., TAJIMA, K., MIZUTANI, M., *Regular consumption of green*

- tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the hospital-based epidemiologic research program at Aichi cancer center (HERPACC), Japan, Cancer Letters, 167, 175 – 182 (2001)*
13. WALSH, G., *Tumour Necrosis Factors, Biopharmaceuticals*, ISBN. RS 380.W35.1998, 209-215 (1998)
  14. WAGNER, H., JURČIĆ, K., *Introduction to immunology and immunological screening methods, Natural Product Sciences*, 247-258
  15. LUETTIG, B., STEINMULLER, C., GIFFORD, G.E., *Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea, J. Natl. Cancer Inst., 81(9), 669-675 (1989)*
  16. AHMAD, N., GUPTA, S., MUKHTAR, H., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor  $\kappa$ B in cancer cells versus normal cells, Archives of Biochemistry and Biophysics, 376(2), 338 – 346 (2000)*
  17. ISLAM, S., ISLAM, N., KERMODE, T., *Involvement of caspase-3 in epigallocatechin-3-gallate mediated apoptozis of human chondrosarcoma cells, Biochem.Biophys.Res.Commun., 270, 793 – 797 (2000)*
  18. MORRE, D.J., BRIDGE, A., WU, L.Y., *Preferential inhibition by (-)Epigallocatechin-3-gallate of the cell surface NADH oxidase and growth of transformed cells in culture, Biochem.Pharmacol., 60, 937 – 946 (2000)*
  19. OTSUKA, T., OGO, T., ETO, T., *Growth inhibition of leukemic cells by (-)Epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, Life Sci., 63 (16), 1397 – 1403 (1998)*
  20. KENNEDY, D.O., MATSUMOTO, M., KOJIMA, A., *Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascites tumor cells, Chemico-Biological Interactions, 122, 59 – 71 (1999)*
  21. KOMATSU, K., TAUCHI, H., YANO, N., *Inhibitory action of (-)-epigallocatechin gallate on radiation-induced mouse oncogenic transformation, Cancer Letters, 112, 135 – 139 (1997)*
  22. CHEN, Z.P., SCHELL, J.B., HO, C.T., *Green tea epigallocatechin gallate*

- shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts, *Cancer Letters*, **129**, 173 – 179 (1998)
23. PASCHKA, A.G., BUTLER, R., CHARLES, Y., *Induction of apoptosis in Prostate cell lines by the green tea component, (-)-Epigallocatechin-3-gallate*, *Cancer Letters*, **130**, 1 – 7 (1998)
  24. SUGANUMA, M., OKABE, S., KAI, Y., *Synergistic effects of (-)-Epigallocatechin gallate with (-)-Epicatechin, Sulindac or Tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9*, *Cancer Research*, **59**, 44 – 47 (1999)
  25. SACHINIDIS, A., SEUL, C., SEEWALD, S., *Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF  $\beta$ -receptor and transformation of A172 human glioblastoma*, *FEBS Letters*, **471**, 51 – 55 (2000)
  26. DEMEULE, M., BROSSARD, M., PAGE, M., *Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1478**, 51 – 60 (2000)
  27. BERTOLINI, F., FUSETTI, L., RABASCIO, C., *Inhibition of angiogenesis and induction of endothelial and tumor cell apoptosis by green tea in animal models of human high-grade non-Hodgkin's lymphoma*, *Leukemia*, **14**, 1477 – 1482 (2000)
  28. DALLUGE, J.J., NELSON, B.C., *Determination of tea catechins*, *Journal of Chromatography A*, **881**, 411 – 424 (2000)
  29. TSUCHIYA, H., SATO, M., KATO, H., *Simultaneous determination of catechins in human saliva by high performance liquid chromatography*, *Journal of Chromatography B*, **703**, 253 – 258 (1997)
  30. LEE, B.L., ONG, C.N., *Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by HPLC and capillary electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, **881**, 439 – 447 (2000)
  31. LINDL, T., BAUER, J., *Bestimmung der Zellzahl mittels Hamocytometer*, *Zell und Gewebekultur*, ISBN.3-437-30492-5, 77-78 (1987)
  32. RUFF, M.R., GIFFORD, G.E., *Rabbit tumor necrosis factor: Mechanism of*

*action, Infection and Immunity*, 380-385, Jan 1981

33. XIE, S.P., PIRIANOV, G., COLSTON, K.W., *Vitamin D analogues suppress IGF-1 signalling and promote apoptosis in breast cancer cells, European Journal of Cancer*, **35**, 1717 – 1723 (1999)