

# Ratlarda Kateşin Alımının Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri<sup>¶</sup>

## EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF CATECHIN ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND LIPID PEROXIDATION LEVELS IN RATS

Abdurrahim KOÇYİĞİT\*, S. Oktay ARSLAN\*\*, Özcan EREL\*,  
Necmettin AKTEPE\*\*\*, Şenel AVCI\*\*\*\*, Selahaddin GÜR\*\*\*\*\*

\* Yrd.Doç.Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD,

\*\* Yrd.Doç.Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD,

\*\*\* Bil.Uz., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD,

\*\*\*\* Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD,

\*\*\*\*\* Biyolog, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, ŞANLIURFA

### Özet

*Bu çalışma, ratlarda diyetle kateşin alımının eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu (Lpx) üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Birinci grup ratlar, standart diyetle, ikinci grup ratlar standart diyete %1 oranında kateşin ilave edilerek üç hafta süreyle beslendi. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ve Lpx seviyeleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Kateşin verilen grubun, eritrosit SOD ve GSH-Lpx aktiviteleri kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunurken (sırasıyla  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ), Lpx seviyeleri düşük bulundu ( $p<0.01$ ). Kateşin verilen grubun, eritrosit SOD ile Lpx düzeyleri ve GSH-Px ile Lpx düzeyleri arasında negatif ilişki tesbit edildi (sırasıyla  $r=-0.881$   $p<0.01$ ,  $r=0.635$   $p<0.05$ ). Sonuç olarak, diyetle kateşin alımı, eritrosit Lpx düzeylerini anlamlı ölçüde düşürdü. Kateşinin bu etkisinin, antioksidan enzim aktivitelerini indüklemesine bağlı olabileceği yorumlandı.*

**Anahtar Kelimeler:** Kateşin, Glutatyon peroksidaz, Süperoksit dismutaz, Lipid peroksidasyonu

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:1-4

### Summary

*The purpose of this investigation was to study the effect of dietary consumption of the catechin on erythrocyte antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation (Lpx) in rats. The first group of rats was fed a commercial basal diet as control group. Second group was given the same basal diet supplemented with 1% catechin for three weeks. Erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and Lpx levels were measured by spectrophotometric methods. Erythrocyte SOD and GSH-Px activities were significantly higher ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$  respectively) and, Lpx levels lower ( $p<0.01$ ) in catechin supplemented group than those of controls. There was a strong negative relationship between GSH-Px and Lpx levels ( $r=-0.881$   $p<0.01$ ) and a relatively weak negative relationship between SOD and Lpx levels ( $r=0.635$   $p<0.05$ ) in catechin group. The results suggest that dietary supplementation of catechin causes a decrease in erythrocyte Lpx level and this effect may be originated from induction of antioxidant enzymes.*

**Key Words:** Catechin, Glutathione peroxidase, Lipid peroxidation, Superoxide dismutase

T Klin J Med Sci 2000, 20:1-4

**Geliş Tarihi:** 10.07.1999

**Yazışma Adresi:** Dr.Abdurrahim KOÇYİĞİT  
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD  
ŞANLIURFA

<sup>¶</sup>Bu makale XVI. Gevher Nesibe Tıp Günleri'nde bildiri olarak sunulmuştur. I. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve "Workshop"u 18-21 Mayıs 1998, Kayseri.

Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar, aterosklerozis ve kanser gibi kronik hastalıkların birçoğunun patogenezi ve ilerlemesinde oksidatif stresin önemli rolünün olduğunu göstermektedir (1). Çeşitli nedenlerle oluşan oksidan strese karşı canlıda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz gibi enzimatik, alfa-tokoferol, askorbik asit ve beta-karoten gibi enzi-

matik olmayan endojen antioksidan savunma mekanizmaları yeterli olamamakta, oksidan/antioksidan denge oksidan tarafa doğru kayabilmekte, endojen antioksidanların yeterli olmadığı durumlarda, eksojen antioksidanlara gereksinim duyulmaktadır (2). In vitro yapılan çalışmalarla oksidanlar, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianizol (BHA), katekoller ve pirogalloller gibi sentetik antioksidanlarla da inhibe edilebilmektedir (3). Ancak, sentetik antioksidanların birçok toksik etkileri nedeni ile araştırmalar doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Çok yaygın bir şekilde tüketilen çay, geleneksel doğal içeceklerdendir. Birçok çalışmada, kuru çay yaprağında yaklaşık %30 civarında bulunan polifenol grubundan kateşin maddesinin, antikanserjenik (4), antimutajenik (5) ve hipolipidemik (6) etkilerinden söz edilmiştir. Bu etkilerin yanı sıra son zamanlarda yapılan çalışmalarda, çok güçlü bir doğal antioksidan olduğu da tesbit edilmiştir (7). Sarafani ve ark. (8), çayın antioksidan etkisinin, içerdiği kateşin maddesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Kateşinin antioksidan potansiyeli ile ilgili birçok çalışma (3,7,8) yapılmış olmakla birlikte mekanizma henüz yeterince açıklığa kavuşturulamamıştır.

Çalışmamızda, kateşinin antioksidan enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon seviyesi üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla, diyetlerine kateşin ilave edilen ratların eritrositlerinde, SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon seviyeleri (Lpx) ölçüldü.

### Materyel ve Metod

Çalışmada, ortalama 120-130 g canlı ağırlığının da 20 adet Sprague-Dawley erkek ratlar kullanıldı. Ratlar Farmakoloji Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlandı. Hayvanlar deneme süresince, klimalı odada 20±2°C'de, %40'lık nisbi nem ve 12 saat aydınlık/karanlık ortamda tutuldu. Deneysel hayvanları rastgele seçimle iki gruba ayrıldı. Birinci grup, %1 oranında kateşin ilave edilmiş diyetle, ikinci grup ise standart rat yemi ile üç hafta boyunca beslendi. Kateşin, Sigma Firması'ndan (St. Luis MO, USA) satın alındı. Ratlar çalışma boyunca bir hafta aralıklarla tartıldı. Üçüncü haftanın sonunda kan örnekleri eter anestezisi altında enjektörle kalbe girilerek alındı. Alınan heparinize

kanlar 1500xg'de 10 dakika santrifüj edilerek eritrositler plazmadan ayrıldı. Eritrosit süspansiyonu izotonik NaCl ile renksiz süpernatant elde edilmeye kadar yıkandı. Bir kısım paket eritrosit Lpx seviyeleri çalışılmak üzere ayrıldı. Eritrosit membranı Lpx seviyeleri Jain ve ark. (9)'nın metodu ile, Lpx için iyi bir indeks olarak kabul edilen tiyobarbitürik asid (TBA) oluşumunun kolorimetrik olarak ölçümü prensibine göre çalışıldı. TBA için molar absorpsiyon katsayısı  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  alındı.

Diğer kısım, dört kısım distile su ilave edilerek hemolize edildi ve hücre membranlarını ayırmak üzere 1500xg ve 5000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmek üzere -85°C'de bekletildi.

Eritrosit GSH-Px ve SOD aktiviteleri RAN-DOX (RANSEL ve RANSOD, UK) marka ticari kitler kullanılarak Boehringer Mannheim Hithachi 911 otoanalizöründe ölçüldü.

İstatistiksel analizler "SPSS 6.0 for Windows" programında yapıldı. Sonuçlar, Kolomogorov-Smirnov ve Levene uygunluk testleri ile analiz edildi. Verilerin normal dağılım gösterdiği bulundu. Grup ortalamaları Student's t testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edildi. Parametreler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi.

### Bulgular

Normal ve kateşinli diyetle beslenen ratlar arasında ağırlık yönünden önemli bir fark yoktu. Ayrıca her iki grup arasında, çalışma boyunca canlı ağırlık kazançlarında bir fark tesbit edilmedi.

Kateşin ve kontrol gruplarının laboratuvar bulguları Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'den de görüldüğü gibi, kateşin grubunun eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunurken (sırasıyla  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), lipid peroksidasyon seviyeleri düşük bulundu ( $p < 0.01$ ). Ayrıca kontrol grubunun parametreleri arasında önemli bir ilişki bulunamaz iken, kateşin grubunun eritrosit Lpx seviyeleri ile SOD ve GSH-Px aktiviteleri arasında negatif (sırasıyla  $r = -0.881$   $p < 0.01$ ,  $r = 0.635$   $p < 0.05$ ), SOD ile GSH-Px aktiviteleri arasında pozitif ilişki tesbit edildi ( $r = 0.554$   $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

**Tablo 1.** Kateşin ve kontrol grubundaki ratların eritrositlerinde ölçülen Lpx, SOD ve GSH-Px değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Parametre	Kateşin Grubu n=10	Kontrol Grubu n=10	p
Eritrosit Lpx (n mol MDA/g Hb)	3.9±0.6	5.8±0.4	<0.01
Eritrosit SOD (U/g Hb)	520.9±77.1	465.4±64.3	<0.05
Eritrosit GSH-Px (U/g Hb)	352.1±38.3	274.2±34.3	<0.01

**Tablo 2.** Korelasyon analizi sonuçları

Parametreler	Kontrol Grubu		Kateşin Grubu	
	r	P	r	P
MDA - GSH-Px	-0.353	>0.05	0.635	<0.05
MDA - SOD	-0.459	>0.05	-0.881	<0.01
SOD - GSH-Px	0.486	>0.05	0.554	<0.05

### Tartışma

Biyomembranlar, içerdikleri doymamış yağ asitlerinden dolayı serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlı yapılardır. Eritrositlerin içerdikleri antioksidatif enzimlerin fazlalığı ve membran yapılarının lipid peroksidasyonuna karşı duyarlı olmaları nedeniyle, bu çalışmada, kateşinin oksidatif ve antioksidatif etkileri, eritrositler üzerinde araştırıldı.

Çayda bulunan polifenol grubundan kateşin maddesinin antioksidan etkileri ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerine olan etkileri ile ilgili olarak, deney hayvanları ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaşarak sürmektedir (7,8,10-17). Yapılan bu çalışmada, diyetlerine %1 oranında kateşin ilave edilen ratların eritrosit Lpx seviyeleri kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu. Nanjo ve ark. (10) da, ratlara aynı oranda kateşin vererek yaptıkları çalışmada Lpx seviyelerini önemli derecede düşük bulmuşlardır. Kateşin maddesinin Lpx seviyelerini nasıl düşürdüne dair net bir açıklama olmamakla birlikte şimdiye kadar farklı görüşler ortaya konulmuştur.

Kateşinin Lpx seviyesini düşürücü etkisi, genelde kateşin maddesinin içerdiği hidroksil gruplarının fazlalığı nedeni ile direkt serbest radikal temizleyici aktivite göstermesine (11,12), alfa-tokoferol ile sinerjistik çalışarak alfa-tokoferolün rejenere olabilmesi için hidrojen molekülü vererek serbest radikal zincir reaksiyonunu kırma fonksiyonuna (13), düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemesine (14) ve/veya şelatör gibi davranıp, demir ve bakırı bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlemesine bağlanmaktadır (15).

Antioksidan savunma mekanizmalarının en önemlilerinden olan antioksidan enzim aktiviteleri üzerine kateşinin etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Zin ve ark. (16) ve Yoneda ve ark. (17), kateşinin bağırsak ve beyin dokularında SOD aktivitesini yükselttiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, kateşin verilen ratlarda eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri yüksek bulundu. Araştırmacıların SOD ile ilgili bulguları, bu bulguları destekler mahiyettedir. Bununla birlikte, kateşinin GSH-Px aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanamamıştır.

Çaydaki kateşin maddesinin, bilinen hiçbir toksik ve metabolik yan etkisinin olmamasına karşın, faydalı etkilerine dair birçok çalışmalar vardır. Tablo 1, 2'de görüldüğü gibi, kateşin grubunda eritrosit Lpx seviyeleri düşerken, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin yükselmesi ve Lpx ile SOD ve GSH-Px değerleri arasında saptanan önemli negatif ilişkiler, kateşinin, diğer antioksidan savunma mekanizmaları yanında antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkilerinin de savunmada önemli rolünün olabileceğini göstermektedir. Ancak, kateşinin antioksidan enzimleri hangi mekanizma ile indüklediğine dair bilgiler yeterli olmadığından daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

### KAYNAKLAR

- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119:598-620.
- Stein U. Free radicals and antioxidants. *Rev Bras Neurol* 1994; 30:125-7.
- Jha HC, Recklinghausen GV, Zilliken F. Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1985; 34:1367-69.

4. Wang ZH, Das M, Bickers DR, Mukhtar H. Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metab Disp* 1988; 16:98-103.
5. Kada T, Kaneko K, Matsuzaki S, Matsuzaki T, Hara Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutation Res* 1985; 150:127-32.
6. Maramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1986; 32:613-22.
7. Lotito SB, Fraga CG. Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:435-41.
8. Sarafani M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European J Clin Nutr* 1996; 50:28-32.
9. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 33:971-5.
10. Najo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, Hara Y. Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla diets. *Biol Pharm Bull* 1993; 16:1156-59.
11. Rafat Husain S, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 1987; 26:2489-91.
12. Kumari MVA, Yoneda T, Hiramatsu M. Effect of "BETA-CATECHIN" on the life span of senescence accelerated mice (Sam-P8 strain). *Biochem Mol Biol Int* 1997; 41:1005-11.
13. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp* 1995; 61:103-16.
14. De Walley CV, Rankin SM, Hoult JRS et al. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1990; 39:1743-49.
15. Morel I, Lescoat G, Cillard P. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Method Enzymol* 1994; 234:437-43.
16. Zin P, Zhao J, Cheng S et al. Experimental studies of the inhibitor effect of green tea catechin on mice large intestinal cancer induced by 1,2 dimethylhydrazine. *Cancer Letters* 1994; 79:33-8.
17. Yoneda T, Hiramatsu M, Sakamoto M, Togasaki K, Komatsu M, Yamaguchi K. Antioxidant effects of "beta catechin". *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35:995-1008.