

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE B İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ
HASARI MODELİNDE ARI SÜTÜNÜN ANTİAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK
VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Burcu ZORER
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

- 1.DANIŞMAN: Doç. Dr. Halil ÖZKOL
- 2.DANIŞMAN: Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2016

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİOLE B İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ
HASARI MODELİNDE ARI SÜTÜNÜN ANTİAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK
VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Burcu ZORER
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

- 1.DANIŞMAN: Doç. Dr. Halil ÖZKOL
2.DANIŞMAN: Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2016

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2014-SBE-YL162 nolu proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE B İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ
HASARI MODELİNDE ARI SÜTÜNÜN ANTİAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK
VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Burcu ZORER
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

Üye
Prof. Dr. İlhan ONARAN

Üye
Doç. Dr. Halil ÖZKOL

TEZ KABUL TARİHİ..... / / 2016

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırmayı yüksek lisans tezi olarak veren, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran ve tezimin hazırlanmasında destek ve yardımlarıyla yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Halil ÖZKOL'a, yine her türlü desteğini gördüğüm kıymetli hocam Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ'ye, Vet. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN'a, değerli arkadaşım Esmâ ZEREN'e, istatistiksel değerlendirmeler aşamasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e, ayrıca tezimin ve hayatımın her alanında destekçim olan başta anne-babama ve bütün aileme teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
Teşekkür.....	II
İçindekiler.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Tablolar Listesi.....	VII
Şekiller Listesi.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Deri.....	2
2.1.1. Derinin yapısı.....	2
2.1.1.1. Epidermis.....	2
2.1.1.2. Dermis.....	4
2.1.1.3. Hipodermis (Subkutan Doku).....	5
2.1.2. Derinin görevleri.....	6
2.2. Ultraviyole Radyasyonu.....	6
2.3. Serbest Radikaller.....	10
2.3.1. Serbest radikallerin kaynakları.....	10
2.3.2. Serbest radikallerin etkileri.....	12
2.3.3. Reaktif oksijen türleri.(ROS).....	13
2.3.4. Serbest radikallerle ilişkili hastalıklar.....	15
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	16
2.4.1. Enzimatik antioksidanlar.....	17
2.4.2. Non-enzimatik antioksidanlar.....	19
2.5. Arı Sütü (AS).....	20
2.6. Çalışmada Takip Ettiğimiz Belirteçler.....	22
2.6.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSI).....	22
2.6.2. Apoptoz.....	22
2.6.2.1. Apoptotik hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler.....	24
2.6.2.2. Deri ve Apoptozis.....	24
2.6.3. Genotoksisite.....	25
2.7. Stereolojik Yöntemler.....	26

2.7.1. Referans hacminin hesaplanması (cavalieri metodu).....	29
2.7.2. Hacim fraksiyonu (yoğunluğu).....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deney gruplarının oluşturulması.....	31
3.2. Deney hayvanlarının traşlanması.....	32
3.3. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar.....	32
3.4. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	32
3.5. Etkinliği araştırılan moleküllerin uygulanması.....	33
3.6. UVB' nin uygulanması.....	33
3.7. Kan ve doku örneklerinin hazırlanması.....	33
3.8. Analizlerin Yapılması.....	34
3.8.1. TAS ölçüm tayini.....	34
3.8.2. TOS ölçüm tayini.....	34
3.8.3. OSI'nin hesaplanması.....	34
3.8.4. Apoptotik DNA ladder (DNA Fragmentasyonu) yöntemi ile apoptozun tespiti.....	34
3.8.5. Comet assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) yöntemi ile antigenotoksisite tayini.....	36
3.9. Stereolojik İncelemeler.....	37
3.9.1. Tespit.....	38
3.9.2. Suyunu alma (Dehidratasyon).....	38
3.9.3. Saydamlaştırma.....	39
3.9.4. Parafinizasyon.....	39
3.9.5. Blok hazırlama.....	39
3.9.6. Kesit hazırlama.....	40
3.9.7. Boyama.....	40
3.9.8. Doku preparatlarının incelenmesi.....	41
3.10. İstatistiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları.....	43
4.2. Antigenotoksik Etkilerin Analiz Bulguları.....	47
4.3. Kan Dokusu Apoptoz Görüntüsü.....	49

4.4. Stereoloji Analiz Bulguları.....	50
4.5. Stereoloji Resimleri.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
ÖZET.....	57
SUMMARY.....	58
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	70
EKLER.....	71



SİMGELER VE KISALTMALAR

UV	: Ultraviyole
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
OH ⁻	:Hidroksil Radikali
OH	:Hidroksit
MDA	: Malondialdehit
RNA	: Ribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
KAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyonun
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
GSSG-R	: Glutasyon Redüktaz
TOS	: Total Oksidan Seviye
TAS	: Total Antioksidan Seviye
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
SSB	: Tek Zincir Kırıkları
DSB	: Çift Zincir Kırıkları
ALS	: Alkali Labil Bölgeler
PBS	: Soğuk Fosfat Tamponu
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
EtBr	: Ethidium Bromide
AS	: Arı Sütü
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojen

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Stereolojik sondalar ve objelerde duyarlı oldukları geometrik özellikler.....	26
Tablo 2. Doku kesitlerinin alındıktan sonra Hemotoksilen-Eozin ile boyanma prosedürü	41
Tablo 3. Deri dokusunda ölçülen TOS, TAS, OSİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler.....	44
Tablo 4. Kanda comet assay sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler.....	47
Tablo 5. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis total hacim CE ve CV değerleri.....	50
Tablo 6. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis damar hacminin CE ve CV değerleri.....	51
Tablo 7. Deri dokusunda stereolojik damar hacmi (μm^3) sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Deri kesiti.....	5
Şekil 2.	Güneş dalga boylarına bağlı olarak, üç farklı UV ışını yaymaktadır: UVA, UVB ve UVC.....	7
Şekil 3.	Güneşten yayılan UV ışınları.....	8
Şekil 4.	Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi.....	13
Şekil 5.	Arı Sütü.....	21
Şekil 6.	İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması.....	27
Şekil 7.	Taneciklerin yöneliminin kesitlerle örneklenme şansına etkisi.....	28
Şekil 8.	Tanecik büyüklüğünün örneklenme şansına etkisi.....	29
Şekil 9.	Deney hayvanlarına UVB ışınının uygulanması.....	33
Şekil 10.	Dehidratasyon serisi.....	39
Şekil 11.	Kesitlerin hazırlanması.....	40
Şekil 12.	Deri dokusu TAS sonuçlarının grafiği.....	45
Şekil 13.	Deri dokusu TOS sonuçlarının grafiği.....	46
Şekil 14.	Deri dokusu OSI değerlerinin grafiği.....	46
Şekil 15.	Kanda comet assay düzeylerinin grafiği.....	48
Şekil 16.	Kan dokusu apoptoz görüntüsü.....	49
Şekil 17.	Deri dokusunun stereoloji değerlerinin grafiği.....	52
Şekil 18.	Doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	53

1. GİRİŞ

En önemli enerji kaynağı güneştir. Güneş enerjisi; görünür ışın, infrared ve ultraviyole (UV) ışımından oluşmaktadır (Svobodova ve ark., 2011). UV radyasyonu (320-400 nm) organizmanın en yaygın maruz kaldığı sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik bir ajandır (Eisenstark, 1989; Ananthaswamy ve Pierceall, 1990).

Güneş enerjisi içerisinde önemli bir bölümü oluşturan UV radyasyonu, dalga boylarına göre 3'e ayrılmakta ve UVA (dalga boyu 320-380 nm), UVB (dalga boyu 280-320 nm) ve UVC (dalga boyu 280 nm'den küçük olanlar) olarak adlandırılmaktadır. UV ışınları içinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan UVA ışınlarıdır. Güneş kaynaklı UVA ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan içeri geçebilmektedir. Dermis olarak bilinen iç deriye kadar nüfuz edebilmektedir. Bu yüzden erken yaşlanmaya ve deride kırışıklıklara, deri kanserinin ilerlemesine neden olmaktadır (Coohill ve ark., 1987; Gill ve ark., 1987). Yapılan araştırmalarda deney hayvanlarında kanser oluşturan UV ışınının UVB olduğu gösterilmiştir. UVA ışınları UVB'ye eklendiğinde karsinojenik etki artar.

UV radyasyonuna uzun süre maruz kalan deride serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Bu radikaller DNA (Deoksiribonükleik asit)'da, protein, yağlar ve karbohidratlarda oksidatif hasara yol açmaktadır. Antioksidanlar ise reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumunu engellemektedir. Çalışmamızda olası antioksidan etki göstermesi beklenen arı sütü (AS) araştırılmıştır. UVB'nin albino ratların derilerinde yol açtığı oksidan hasara karşı AS'nin koruyucu savunma etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

UVB'nin oluşturduğu oksidatif, genotoksik ve apoptotik hasara karşı, AS'nin koruyucu etkisinin literatüre göre ilk kez belirlenmesi bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, kendine özgü birçok fonksiyonları olan, dış ortamla organizma arasındaki ilişkiyi sağlayan, vücudun en ağır ve en geniş organıdır. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sını oluşturur ve yetişkinlerde 1,2 - 2,2 metrekarelik bir yüzey meydana getirir (Ferner, 1974).

Derinin özellikleri kişiden kişiye ve aynı kişide farklı anatomik bölgelerde renk, elastikiyet, kalınlık, kıl ve sebace yağ bezleri açısından değişkenlik göstermektedir (Goldsmith, 1990).

Deri ektodermal orijinli epitelyal bir tabaka olan epidermis, mezodermal orijinli bir bağ dokusu tabakası olan dermis ve hipodermis tabakalarından meydana gelir. Bu tabakaların dışında kıl folikülleri, sebace bezler ve ter bezleri gibi deri ekleri ile immün hücreler, sinirler ve damarlar da derinin yapısında yer alırlar (Freedberg ve ark., 1999).

Derinin suya göreceli geçirgen olmayan dış katmanı terleme ile su kaybını önler ve karasal yaşama olanak sağlar. Deri çevre ile devamlı iletişim halinde olan reseptör organ olarak davranır ve organizmayı çarpma ve sürtünme sonucu oluşabilecek hasarlardan korur. Epidermis hücrelerinde üretilen melanin pigmenti, güneşin UV ışınlarına karşı koruyucudur. Deri, kan damarları ve dokunun bezleri ısı ayarlanmasında, vücut metabolizmasında ve çeşitli maddelerin salgılanmasında görev alırlar. Deri elastik olduğu için ödem ve gebelik gibi şişmenin eşlik ettiği durumlarda genişleyebilir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

2.1.1. Derinin yapısı

2.1.1.1. Epidermis

İnsanda derinin en üst tabakası olan epidermis, su geçirmez özelliği olan ve görünen kısımdır. Çok katlı yassı keratinize epitelden meydana gelir. Melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri adında üç hücre türünü içerir. Keratinositler epidermisin % 95'ini oluşturur ve bazal tabaka tüm çoğalan keratinositlerin kaynağıdır. Yara iyileşmesindeki epidermal cevaptan primer olarak bu keratinositler sorumludur (Hom, 1998). Dermisden yukarı doğru keratin üreten 5 hücre tabakasından meydana gelir. Bunlar korneum, lusidum, granulozum, spinosum ve bazal tabakalarıdır.

Epidermal Tabakalar

İnsan vücudunda beş epidermal tabaka bulunur: stratum bazale, stratum spinozum, stratum granülozum, stratum lusidum ve stratum korneum.

Stratum Bazale (Germinativum - doğurucu; bazal tabaka): Epiderminin en derininde yer alan bazal tabakadır. Dermisi, epidermisten ayıran bir bazal membran üzerine oturan tek sıralı prizmatik veya kübik hücrelerden oluşur. Hücreler birbirlerine bağlantı birimleri olan dezmozomlarla, alttaki bazal membrana ise hemidezmozomlarla bağlıdır. Stratum bazaledeki hücreler, epidermis için kök hücre görevi yaparlar, bu nedenle de bu tabakada yüksek bir mitotik aktivite izlenir. Hücreler, yüzeydeki tabakalara doğru göç ederken bölünürler ve olgunlaşırlar. Stratum bazaledeki tüm hücreler, yukarı doğru göçle birlikte sayıları gittikçe artan oranda ara keratin filamanları içerirler.

Stratum Spinozum (dikenli tabaka): Hücreler, epidermis içinde yukarı doğru göç ederken, stratum spinozumu oluştururlar. Bu tabaka 4-6 hücre sırası içerir. Rutin histolojik incelemelerde, bu tabakadaki hücreler büzüşürler ve hücreler arasında oluşan boşluklar, hücre yüzeyinden uzanan çok sayıda sitoplazmik uzantılar veya dikensi çıkıntılar oluştururlar. Bu uzantılar, dezmozomların keratin filaman demetleri veya tonofilamanlar ile komşu hücrelere bağlandığı yerlere karşılık gelir. Tonofilamanlar, epiderminin aşınmalara karşı dirençli olmasını sağlar.

Stratum Granülozum (granüllü tabaka): Stratum spinozum üzerindeki hücreler yoğun bazofilik keratohiyalin granülleri ile dolu hale gelerek stratum granülozumu oluştururlar. Bu tabaka 3-5 sıra yassı hücrelerden oluşur. Keratohiyalin granülleri derideki yumuşak keratine kaynak teşkil ederler. Bir zarla çevrili olmayan bu granüller, keratin filaman demetleriyle birlikte bulunurlar. Bu hücrelerin sitoplazmalarında çift yapıllı lipit zarla çevrili lamelli granüller bulunur. Lamelli granüllerin içerikleri, stratum granülozumda hücrelerarası boşluğa bırakılır ve burada yapıştırıcı özelliğinin yanı sıra lipit bir bariyer oluştururlar.

Stratum Lusidum (saydam tabaka): Stratum granülozum üzerinde yer alan, yalnızca kalın deride bulunan ve çıplak gözle görülebilen yarı saydam bir tabakadır. Stratum lusidumda çekirdek ve organel içermeyen sıkıca bir araya gelmiş ölü hücreler bulunur. Bu tabakadaki hücreler sıkıca paketlenmiş keratin filamanları içerir.

Stratum Korneum (cansız tabaka): Derinin en yüzeyde bulunan tabakasıdır. Hücrelerdeki tüm çekirdek ve organeller kaybolmuştur. Stratum korneum, yumuşak keratin filamanlarıyla dolu

yassı ve ölü hücrelerden oluşur. Bu tabakanın yüzeyindeki keratinize hücreler devamlı olarak dökülürler ve derindeki stratum bazaleden gelen yeni hücreler tarafından yenilenirler (Eroschenko, 2008).

Epidermal Hücreler

Derinin epidermis tabakasında dört çeşit hücre bulunur. Sayıca en fazla bulunan hücreler olan keratinositler, birbirlerinden farklı ve ayırt edilebilen tabakalar halinde düzenlenmişlerdir. Keratinositler bölünürler, büyürler ve yukarı doğru göç ederken keratinleşirler. Diğer üç epidermal hücre tipi olan melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri, keratinositler arasında dağılmış olarak bulunurlar.

Melanositler: Epidermisin bazal tabakasında yerleşmiş olup, melanin pigmentini sentezlerler. Melanosit içindeki melanin granülleri hücrenin sitoplazmik uzantılarına göç eder ve oradan stratum bazale ve stratum spinozumdaki hücrelere aktarılırlar. Güneş ışığına maruz kalan deride melanin sentezi artar ve deriye koyu bir renk kazandırır. Melaninin görevi, deriyi UV ışınlarının zararlı etkisinden korumaktır.

Langerhans Hücreleri: Esas olarak stratum spinozumda bulunurlar. Bu hücreler vücudun immün cevabında rol alırlar. Langerhans hücreleri, yabancı antijenleri tanırlar, fagosite ederler ve işlemiden geçirerek onları immün cevap oluşturmak üzere T lenfositlere sunarlar. Böylece, bu hücreler antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar.

Merkel Hücreleri: Bu hücreler parmak uçlarında daha yoğun olarak bulunurlar. Aferent miyelinsiz aksonlarla olan sıkı ilişkileri nedeniyle, Merkel hücrelerinin basınç algılayan mekanoreseptör olarak görev yaptığına inanılmaktadır (Eroschenko, 2008).

2.1.1.2. Dermis

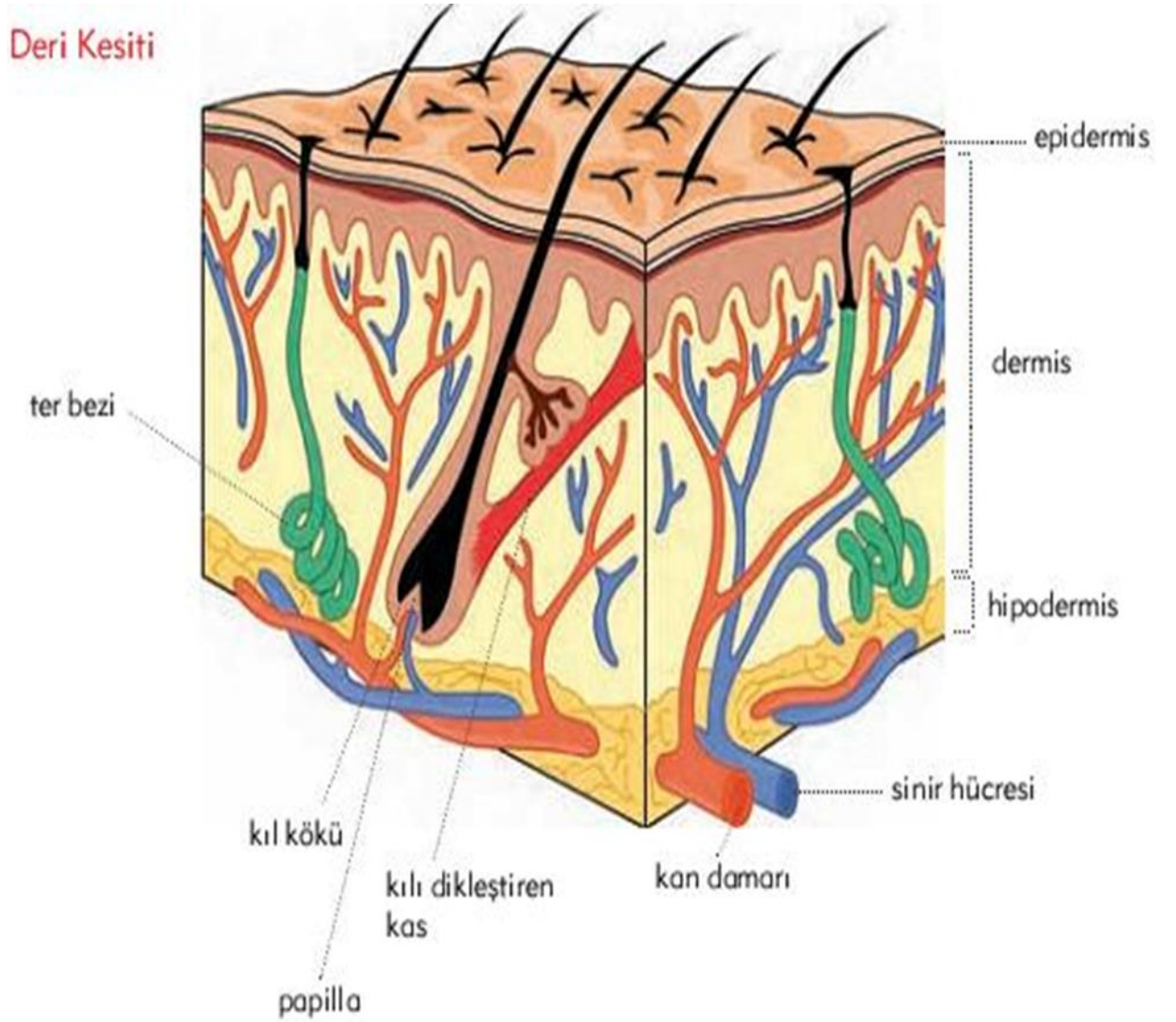
Dermis, epidermise bağlanan bağ dokusu tabakasıdır. Dermisin yüzeysel tabakası, epidermise doğru çok sayıda dermal papilla adı verilen uzantılar gönderir. Bu uzantılar, epidermisten gelen epidermal çıkıntılarla iç içe geçer. Derinin bu bölgesine dermisin papiller tabakası denir. Bu tabaka, gevşek bağ dokusundan oluşur ve içinde bağ dokusu lifleri, kan damarları, fibroblastlar, makrofajlar ve diğer gevşek bağ dokusu hücreleri yer alır.

Dermisin daha derindeki tabakası retiküler tabakadır. Bu tabaka daha kalındır ve düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşur.

Dermisin bağ dokusu damar yönünden oldukça zengindir; çok sayıda kan damarı, lenf damarı ve sinir içerir. Ayrıca dermis, çok sayıda duyuşal reseptör içerir(Eroschenko, 2008).

2.1.1.3. Hipodermis (Subkutan Doku)

Dermisin altında, yüzeysel fasya ve yağ dokusu içeren hipodermis bulunur. Bu tabaka deriyi alttaki komşu organlara gevşekçe bağlayan ve onların üzerinde serbestçe kayabilmesini sağlayan gevşek bağ dokusudur. Bu tabaka damar ve sinir yönünden çok zengindir (Junqueira ve Carneiro, 2009).



Şekil 1. Deri kesiti (<http://www.lokmanbas.net/merak-edilenler/elimizin-icinde-ve-ayagimizin-altinda-neden-kil-yok>. Erişim tarihi: 27.09.2015).

2.1.2. Derinin görevleri

Koruma: Epiderminin, keratinize çok katlı epiteli, vücut yüzeylerini mekanik aşınmalardan korur ve patojen ve yabancı mikroorganizmalara karşı fiziksel bir bariyer oluşturur. Stratum granülozumdaki hücreler arasında bulunan glikolipit tabakasından dolayı epidermis suya karşı geçirgen değildir. Bu tabaka, aynı zamanda dehidratasyonla vücuttan sıvı kaybını da önler. Melanin pigmentinin artmış sentezi de deriyi UV ışınlarına karşı korur.

Isı Regülasyonu: Fiziksel egzersiz ve sıcak bir ortam, terlemeyi artırır. Terin, deri yüzeyinden buharlaşması sonucu vücut sıcaklığı düşer. Terlemeye ilave olarak, kan damarlarının genişlemesi ile deriye olan kan akımı maksimuma ulaşır. Bu durum da ısı kaybını artırır. Diğer yandan, soğuk havalarda, kan damarlarının daralması ve deri kan akımının azalması ile vücut ısı muhafaza edilir.

Duyu Algılanması: Deri, dış uyarılar için büyük bir duyu organıdır. Deride bulunan pek çok kapsüllü ve sebest duyu sinir sonlanmaları, ısı, dokunma, ağrı ve basınç uyarılarına cevap verir.

Boşaltım: Ter bezlerinde üretilen ter yoluyla su, sodyum tuzları, üre ve azotlu bileşikler deri yüzeyine atılır.

D Vitamini Oluşumu: Deri, güneşin UV ışınlarına maruz kaldığında, epidermiste sentezlenmiş öncü maddelerden D vitamini oluşturur. D vitamini bağırsak mukozasından kalsiyum emilimi ve mineral metabolizması için gereklidir (Eroschenko, 2008).

2.2.UV Radyasyonu

Güneş, bir enerji kaynağı olduğu kadar, tüm canlıların, biyolojik varlıkların devamlılığı için gerekli bir düzenleyicidir. Atmosferin yükseklerinde yer alan ozon tabakası, güneşten gelen radyasyonu emerek yeryüzündeki hayatın varlığı ve devamlılığında büyük rol oynamaktadır (Hawk , 1992; Karaduman , 1999; Ekici ve ark.,2003).

Canlılar için vazgeçilmez yaşam kaynaklarından biri olan güneşin elektromanyetik izgede (spektrum) 1 nm dalga boyunun altındaki dalga türü X-Ray (iyonize), 200 - 290 nm arası UVC, 290 - 320 nm arası UVB, 320 - 400 nm arası UVA, 400 - 800 nm arası görünür ışınlar, 800 - 100.000 nm arası infrared, 100.000 nm'den büyük radyo dalgaları ve mikrodalgalarıdır. UV radyasyon, tüm hayatımız boyunca devamlı olarak maruz kaldığımız bir tür görünmez

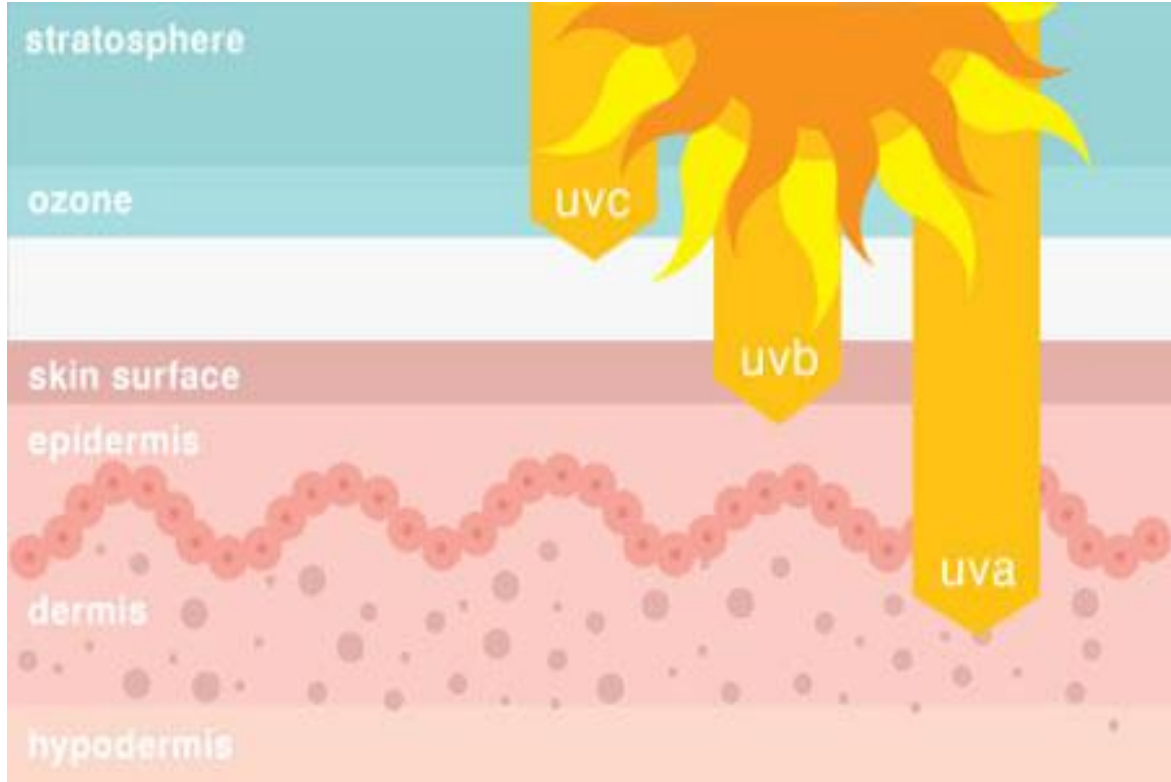
iyonize olmayan radyasyon şeklidir. UV radyasyonu, solar radyasyonun doğal düşük yoğunluklu bir bileşenidir (Howard, 1990; Duthie ve ark., 1999; Afag ve ark., 2001; Afaq ve ark., 2002; Arabacı ve ark., 2003).

100-400 nm dalga boyunda olan UV ışınları UVA, UVB ve UVC ışınları olmak üzere 3 farklı banda ayrılır. UVC ışınlarının tamamı ile UVB ışınlarının % 90'ı güneş ışınları atmosferden geçerken ozon, oksijen, karbondioksit ve su buharı tarafından tutulur. Atmosferden daha az etkilenen UVA ışınları ise böylece yeryüzüne ulaşan UV ışınlarının çok büyük bir kısmını oluşturur.



Şekil 2. Güneş dalga boylarına bağlı olarak, üç farklı UV ışını yaymaktadır: UVA, UVB ve UVC (<http://www.nikon-lenswear.com.tr/fr/eyes-and-vision/uv-inlar-hakkında>. Erişim tarihi: 29.10.2015).

UV radyasyon, yeryüzüne erişen güneş enerjisinin bir parçasıdır. Yeryüzüne ulaşan radyasyonun yaklaşık %5'ini oluşturur ve dalga boyları 100-400 nm arasındadır. Aralığın %95-98'i UVA, %2-5'i UVB'dir (Karaduman, 1999).



Şekil 3. Güneşten yayılan UV ışınları. (<http://www.soruyeri.com/uva-ve-uvb-isinlari-ne-anlama-geliyor>. Erişim tarihi: 29.10.1015).

Atmosferik hayatın ana kaynağı durumundaki güneş radyasyonu, son yıllarda atmosferik kirlenmeden dolayı canlılara zarar vermeye başlamıştır. UV radyasyonu, yeryüzüne ulaşan güneş radyasyonunun çok az bir kısmını oluşturur. UV radyasyonu güneş yanığı, bronzlaşma, erken deri yaşlanması ve kanser gelişimi olmak üzere birçok biyolojik hastalığa neden olabilmektedir. Ayrıca UV ışınlarının başta vitamin D₃ sentezi olmak üzere epidermin ve derinin kalınlaşması gibi yararları, zararları karşısında çok azdır (Mutlu ve ark., 2003).

1970 ve 1987 yılları arasında ozon tabakasının yapısında oluşan incelmeler ya da delinmeler sonucu UV radyasyonu yeryüzüne daha fazla ulaşmaya başlamıştır (Duthie ve ark., 1999).

UV radyasyonuna uzun süre maruz kalan deride ROS oluşmaktadır. Bu da DNA'da, proteinler, yağlar ve karbohidratlarda oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu oksidatif hasarın sonucunda hücre metabolizmasında, morfolojisinde ve ultra yapısında zararlı değişikliklere neden olmaktadır. UV'den dolayı oluşan serbest radikaller ile hücre düzenlenme yoluyla interaksyona girerek hücresel farklılaşma, çoğalma ve apoptoz mekanizmasını etkilemektedir.

Hücrede meydana gelen bu değişiklikler de foto yaşlanmayı ve deri kanseri oluşumunu tetiklemektedir (Svobodova ve ark., 2003).

Yapılan son tıbbi araştırmalar UV ışınlarına maruz kalmanın cilt kanseri, katarakt ve bağışıklık sisteminin baskı altına alınması gibi ciddi sağlık problemlerine neden olabileceğini göstermektedir. Akut olarak UVB'ye maruz kalınması güneş yanıklarına, kronik olarak UVB'ye maruz kalınması ise cildin esnekliğini kaybetmesine ve deri yaşlanmasının hızlanmasına neden olur (Mutlu ve ark., 2003).

Son yıllarda çeşitli tehlikeli hastalıkların solar radyasyona bağlı olarak geliştiği ve bu tehlikenin gittikçe büyüdüğü gözlenmektedir. Memeli derisinin UV'ye uzun süre maruz kalması sonucunda eritem, ödem, güneş yanığı, hücresel deformasyon, hiperplazi, immün süpresyonu, DNA hasarı, foto yaşlanma ve melanogenezis oluşmaktadır. Bu olgularda direkt veya indirekt olarak deri kanseri oluşumuna sebep olmaktadır (Goihman-yahr, 1996; Afag ve ark., 2001; Tebbe, 2001).

Diğer taraftan UV ışınları, langerhans hücrelerinin işlevlerini bozarak immün sistemi baskılar. Bütün bu etkiler ve mutasyonlar, hücre bölünmesini bozarak tümör gelişimine neden olur (Madronich ve ark., 1993). Artan dozda UV ışınlarının insanların bağışıklık sistemini zayıflattığı ve vücudumuzu enfeksiyon hastalıklarına karşı çok daha hassas hale getirdiği bilinmektedir.

UV radyasyonuna uzun süreli maruz kalma sonucu insanlarda ve deney hayvanlarında deri kanseri oluştuğu bilinmektedir. Çalışmalarda deney hayvanlarında kanser oluşturan UV ışınının UVB olduğu gösterilmiştir. UVA ışınları UVB'ye eklendiğinde karsinojenik etki artar. UV radyasyonuna maruz kalma, DNA'da bir dizi ardışık değişikliklere yol açmaktadır. UVB ve UVC'nin, hücre ölümü, mutasyon ve transformasyon gibi etkileri için ana hedef yapı DNA'dır. Ayrıca UV radyasyonunun etkisi ile tümör süpresör gen (p53 geni) mutasyonu da olmaktadır (Setlow ve ark., 1993).

Hayvanlar üzerinde (sıçan, fare, tavşan) deneysel çalışmalar UVB'nin kortikal katarakt meydana getirdiğini göstermiştir (Pitts ve ark., 1977; Soderberg, 1988; Meyer ve ark., 2005).

Çevresel faktörlerden en önemlileri doğal ya da yapay UV ışınlarıdır. Bu ışınlara uzun süreli ve tekrarlayıcı biçimde maruz kalma sonucu, derinin yapı ve işlevlerinde bozulma ve yaşlanma gelişir (Wintrobe ve ark., 1976).

UV ışınları derimize çarptığında serbest radikal oluşumuna neden olur. Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine zarar veren moleküllerdir. Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezler ise vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Yapılan çalışmalarda UVB'nin serbest radikalleri arttırdığı belirtilmiştir (Silva ve ark., 2014).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çok kısa ömürlüdürler. Ancak, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "ROS denmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1992; Akkuş, 1995). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda ROS oluşmaktadır. Oksidasyona neden olan serbest radikaller arasında süperoksit anyonlar (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), hipoklorik asit, kloroaminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksidler sayılabilir (Akkuş, 1995).

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir ancak çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle ROS, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir (Mc Cord, 1993).

2.3.1. Serbest radikallerin kaynakları

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşurlar;

1. Kovalent bağların homolitik kırılması
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi
3. Normal bir moleküle elektron transferi (Southorn ve Powis, 1988; Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller normal hücresel metabolizma ürünleri olarak üretilebildiği gibi birçok dış kaynağın etkisi ile de oluşabilir. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki başlık altında toplanır:

A) Eksojen kaynaklar

- * Antineoplastik ajanlar (Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine gibi)
- * Radyasyon
- * Alkol ve uyuşturucu maddeler
- * Stres
- * Güneş ışığı
- * Isı şoku
- * Çevresel ajanlar (Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler gibi, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar gibi) (Ceyhan ve ark., 1996).

B) Endojen kaynaklar

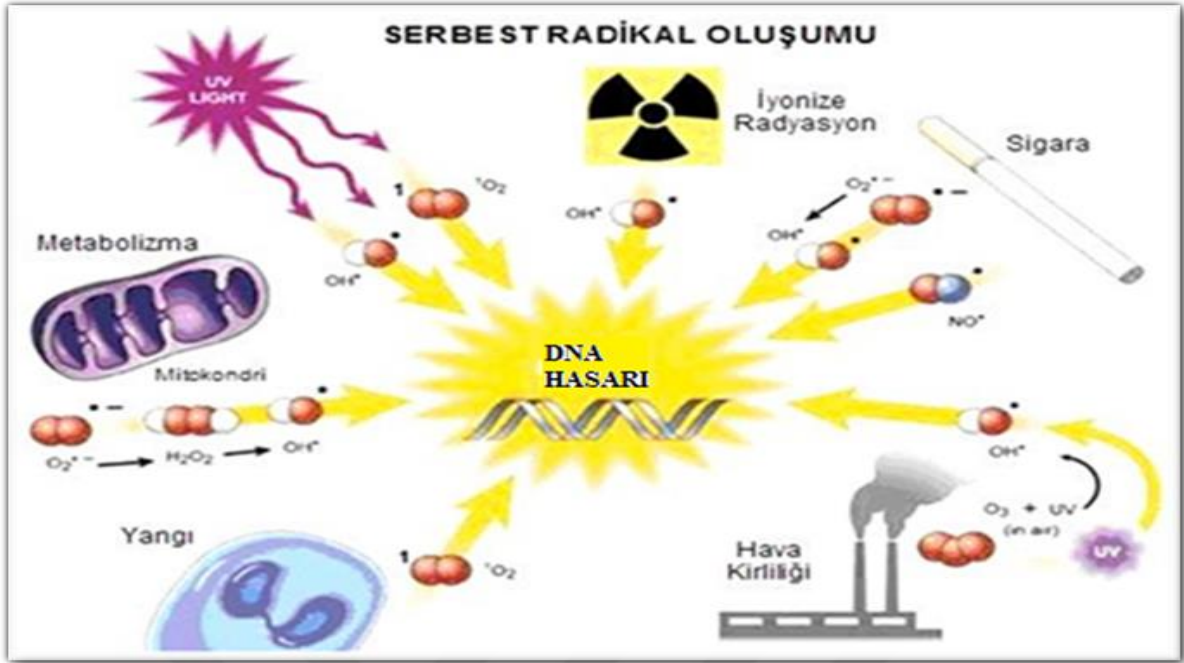
- * Küçük moleküllerin otooksidasyonu sonucu (Tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler gibi)
- * Enzimler ve proteinler (Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin gibi)
- * Mitokondrial elektron transport sistemi
- * Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri
- * Peroksizomlar (Oksidazlar, flavoproteinler)
- * Plazma membranı (Lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu)
- * Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi, travma, intoksikasyon gibi)
- * Yaşlanma
- * Fagositik hücrelerin aktive olması sonucu ortaya çıkan solunumsal patlama (Ceyhan ve ark., 1996).

2.3.2. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikal mekanizmalarının, mitokondrial oksidasyon, hemoglobin tarafından oksijen transportu ve sitokrom P₄₅₀ aktivitesi gibi birçok fizyolojik reaksiyonlarda temel rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca prostaglandinlerin sentezi sırasında açığa çıkan bir serbest radikal ara ürünü, prostaglandinlerin akışını ve dolayısıyla inflamatuvar süreci modüle etmektedir. Savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları halinde, bazı zararlı etkiler meydana gelebilmektedir. Oldukça reaktif olduklarından potansiyel olarak toksik, mutajenik ve karsinojeniktirler (Morrow ve ark., 1991; Mc Cord, 1993). Serbest radikallerin etkileri genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

A) Lipid peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı sonucu hücrenin hasarına böylece hücre içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini ve iyon transportunu etkileyebilir (Girotti, 2000; Ertan ve ark., 2001).

B) Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya aspargine, tirozin ditirozine ve sistein disüfitlere dönüşür. Böylece proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (Girotti, 2000; Ertan ve ark., 2001).



Şekil 4. Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi (<http://www.anagen.net/rali.htm>. Erişim tarihi: 16.10.2015).

C) *Karbohidratlar üzerindeki etkileri:* Fizyolojik pH ve ısıda, glukoz gibi monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzaldehidler meydana gelir. Oluşan okzaldehidler, DNA, RNA(Ribonükleik asit) ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Akkuş, 1995).

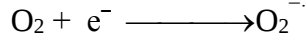
D) *Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri:* Radyasyonla oluşan serbestradikaller, DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olur ve hücre ölümüne yol açarlar. Hidroksil radikali, bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojenperoksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar (Agrawal ve ark., 2001).

2.3.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)

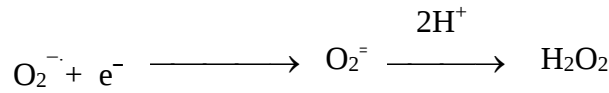
Düşük seviyelerdeki ROS, pek çok biyokimyasal süreçte kaçınılmazdır. Hücrede farklılaşması, hücre içi mesajlama, hücrenin gelişmesi ya da büyümesinin durdurulması, hücre ölümü, bağışık ve mikroorganizmalara karşı savunmayı bu süreçler arasında sayabiliriz. Aksine yüksek dozlarda ROS ve/veya ROS'un yeterince uzaklaştırılamaması oksidatif stres ile

sonuçlanır. Bu durum da ciddi metabolik bozukluklara ve biyolojik makromolekül hasarlarına neden olabilir (Matés ve ark., 1999). Başlıca ROS şunlardır:

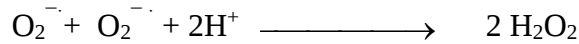
A) Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$): Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir.



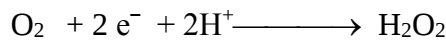
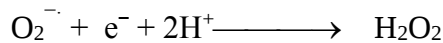
Hem çevresel etkenlerle, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir. Bu molekül bir serbest radikal olarak bilinmesine rağmen, biyolojik dokularda fazla hasar oluşturmaz. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (Greenwald, 1991). Hücresel ortamlarda üretilen süperoksit, indirgeyici ya da oksitleyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Süperoksit anyonu bir elektron daha alırsa peroksit anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmektedir. Süperoksit, özellikle hafif asidik ortamlarda SOD olmadan da kendiliğinden dismutasyonla H_2O_2 'ye dönüşebilir (Kılınç, 1985).



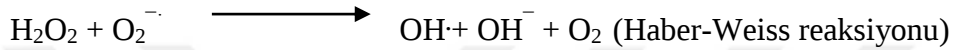
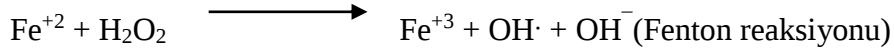
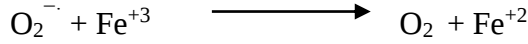
SOD



B) Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2): Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksid molekülü oluşur. Peroksid molekülü, 2 hidrojen atomu ile birleşerek H_2O_2 'yi meydana getirir. Hidrojen peroksit normal olarak her aerobik hücrede bulunur. Bu radikal hücre solunumu sırasındaki çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda üretilir (Gutteridge, 1994).



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer. Çünkü hidrojen peroksit tarafından, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve süperoksit radikalının (O_2^-) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşturulur. H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını, antioksidan enzimlerden olan katalaz ve peroksidaz sağlar (Cheeseman ve Slater, 1993).



C) Hidroksil radikali (OH^-): Hidroksil radikali (OH^-), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur (Bishop ve Janet, 1996). Hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesinden dolayı en güçlü radikaldir. Hidroksil radikalleri birikerek membran bütünlüğünü bozar ve hücrenin kollabe olmasına neden olur. Hidroperoksitlerden son ürün olarak toksik ve reaktif olan aldehitler de oluşabilir. Bunlardan en önemlilerden biri de MDA'dır (Akkuş, 1995; Uysal, 1998).

D) Singlet (tekli) oksijen (1O_2): Singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu yoktur, bu nedenle radikal değildir. Ancak reaktivitesi çok yüksektir. Vücutta, pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, hidroperoksitlerin metal varlığındaki yıkım tepkimelerinde ya da kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında oluşabilir (Akkuş, 1995).

E) Nitrik oksit (NO): Fazla miktarlarda nitrik oksit, direkt olarak lipit peroksidasyonuna neden olur. Nitrik oksit, moleküler oksijenle reaksiyona girerek nitrojen dioksiti, nitrojen dioksit ise hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek süperoksit radikalini meydana getirir (Barbor ve Harris, 1994).

2.3.4. Serbest radikallerle ilişkili hastalıklar

Oksidatif stres, reaktif oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması olarak açıklanabilir. Serbest radikaller pek çok hastalık

sürecinde önemli rol oynarlar. Bunların en önemlisi kanserdir. Birçok doku ve organ kanserinde serbest radikallerin etkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, alzheimer, parkinson, huntingtons hastalıkları ve multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların; romatoid artrit, glomerulonefrit gibi immun sistem hastalıklarının; ateroskleroz, iskemi gibi dolaşım sistemi hastalıklarının; gastrointestinal sistem, yangı ve hastalıklarının, down sendromu ve diyabet gibi genetik ve metabolik hastalıkların; nefrit ve hepatit gibi organ hastalıklarının; katarakt, glokom gibi oftalmik problemlerin; pnömoni, astım, hipoksi gibi akciğer hastalıklarının serbest radikallerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Ono ve ark., 1991; Aruoma, 1998; Matés, 1999; Ediz ve ark., 2011; Özkol ve ark., 2012; Tülüce ve ark., 2012; Özkol ve ark., 2013).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidan etki tipleri dört başlık altında toplanabilir (Akkuş, 1995; Sözmen, 1997).

Bunlar:

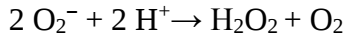
1. Toplayıcı etki (Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemi)
2. Baskılayıcı etki (Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemi)
3. Zincir kırıcı etki (Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etki)
4. Onarıcı etki (Tamir fonksiyonu) olarak sayılır.

Vücuttaki antioksidan savunma ise enzimatik veya nonenzimatik yolla gerçekleşebilir:

2.4.1. Enzimatik antioksidanlar

İlk ve temel antioksidan savunma, enzimatik olarak yapılmaktadır. Bu intraselüler enzimlerden en önemlileri aşağıda belirtilmiştir:

A) Süperoksit dismutaz (SOD): Aslında tek bir enzim değil, bir enzim grubudur. Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit dismutasyonunu katalizlemektedir. Bu enzim grubunun katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir:



Yapısında metal bulunmasından dolayı metalloenzim grubundan sayılmaktadır. Bu enzimin insanda var olan iki farklı tipi olan Cu-Zn SOD ve Mn-SOD ilk defa McCord ve Fridowich tarafından 1969 yılında ortaya çıkarılmıştır (Mc Cord ve Fridowich, 1969).

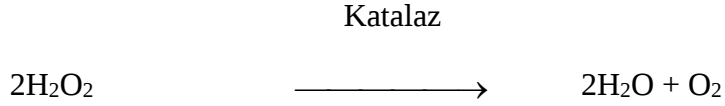
SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler ortamda öldürülmesinde de rol oynar. Bu sebepten SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de fazla miktarda SOD bulunmaktadır (Akkuş, 1995).

B) Katalaz (KAT): KAT, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Eritrositler yüksek oranda katalaz içermekte olup, katalaz aktivitesinin % 98'inden fazlasını sağlar (Akkuş, 1995).

KAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular, karaciğer ve böbrek dokuları, en düşük seviyede görüldüğü dokular ise destek dokularıdır. Bu enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Ancak KAT, endoplazmik retikulumda ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. Ayrıca KAT, ortamda oluşan hidrojen peroksiti direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde, hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. KAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkindir.

Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ve metil, etil, hidroperoksitleri gibi küçük moleküllerdir. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (Agar ve ark., 1986; Akkuş, 1995).

KAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



C) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Yapısında selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Sitozol ve mitokondride bulunabilir. Enzim aktivitesi, NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 , öncelikle glutasyon peroksidaz tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyon'a çevrildiği reaksiyonda, hidrojen peroksidi detoksifiye etmektedir (Akkuş, 1995).

Reaksiyon şu şekildedir;



(GSH=Redükte glutasyon, GSSG=Okside glutasyon, GSH-Px=Glutasyon peroksidaz)

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Halliwell ve Gutteridge, 1992).

D) Glutasyon s-transferaz (GST): GST'ler, glutasyonun (GSH) konjugasyonundan sorumlu fonksiyonel enzimler olarak bilinirler. Bu enzim elektrofilik substratlarla glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen detoksifiye edici bir izoenzimdir (Hayes ve Strange, 1995). GST'ler, glutasyon içerisinde bazı grupların yer değiştirmesi, yeni grupların eklenmesi ve çıkarılması gibi birçok olayı yürütmektedir (Hollingworth ve Dong, 2008). GST, ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücresel savunmada da yer alır. GST, indirgenmiş GSH'ı konjugasyon yoluyla daha fazla çözünebilir ve daha kolay ayrıştırılabilir bileşiklere dönüştüren, intraselüler bir protein ailesidir (Mantle ve ark., 1990; Mannervik ve ark., 1992; Hayes ve Pulford, 1995).

E) Glutasyon redüktaz (GSSG-R): Okside haldeki glutasyonun, indirgenmiş glutatyon'a dönüşümünü katalizler. Redükte glutasyon, antioksidan enzimler tarafından kullanılmaktadır (Akkuş, 1995).



2.4.2. Non-enzimatik antioksidanlar

Non-enzimatik antioksidanlardan endojen olanlar, glutatyon, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin; ekzojen olanlar ise vitaminler, α -tokoferol (vitamin E), β -karoten-retinol (vitamin A), askorbik asit (vitamin C), folik asiti (folat), mineral olanlar ise selenyum, bakır, çinko, polifenoller, flavonoidler olarak sayılabilir (Misso ve ark., 2005).

Redükte glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid antioksidandır. GSH, peroksidaz reaksiyonu için zorunlu bir co-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu nedenle $\text{O}_2^{\cdot -}$, $\text{OH}^{\cdot}$ ve $^1\text{O}_2$ ile reaksiyona girerek, onları nötralize eder (Levine ve Kidd, 1986). Proteinlerdeki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso ve Clarkson, 2003).

Vitamin E, tokoferol yapısında olup dört tipi mevcuttur. Bu vitaminin en fazla bulunan şekli α -tokoferoldür. Vitamin E, dokulardaki en önemli zincir kırıcı antioksidandır (Akkuş, 1995). Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki koruma mekanizmasını oluşturur. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (Miquel ve ark., 2006).

Vitamin C, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidandır (Sinclair ve ark., 1990). Askorbik asit, suda eriyen peroksil radikallerini ve/veya lipid peroksidasyonu ürünlerini etkisiz hale getirmede birincil etkiye sahip bir antioksidandır (Cowie, 2002). Ayrıca α -tokoferol ve askorbik asit sinerjistik özellik göstermektedirler (Martha, 2000). Çünkü E vitamini radikaller ile reaksiyona girdiğinde kendisi radikal form olan tokoferoksil radikaline dönüşmektedir. C vitamini ise membranlara bağlanmış tokoferoksil radikalini aktif α -tokoferole çevirerek E vitaminin dayanıklılığını artırmaktadır (Martha, 2000; Cowie, 2002). Bu nedenle oksidasyon sonucu C vitamini tükenmedikçe E vitaminin tükenmesi söz konusu değildir (Martha, 2000).

Vitamin A, zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Retinol etkili bir peroksil radikali süpürücüsüdür (Vince, 1999). β - karoten ise antioksidan özelliğe sahip olup süperoksit radikalının kuvvetli bir süpürücüsüdür. Özellikle singlet oksijeni tutarak oksidasyon stresine karşı hücreyi korumaktadır (Umemura ve Yokota, 1997; Esselty, 2000).

Melatonin, yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Özellikle OH^- radikalini ortadan kaldırmada çok etkili bir antioksidandır (Yazıcı ve Köse, 2004). Sistein, serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (Akkuş, 1995). Seruloplazminin ise SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Bu antioksidan, demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunun inhibe olmasını sağlar. Bu sayede serbest radikal oluşmasını engeller. Ürik asit, normal plazma konsantrasyonlarında O_2^- ve OH^- gibi radikalleri temizler. Albümin geçiş metallerini bağlar. Ayrıca bu antioksidan, lipithidroperoksid ve hipoklorid toplayıcısıdır (Misso ve ark., 2005). Transferrin, dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir. Bilirubin, serbest radikal tutucusudur. Bu antioksidan, O_2^- ve OH^- radikallerini toplar (Ayçiçek ve ark., 2005). Glukoz, OH^- radikal tutucusudur (Nakano ve ark., 1999). Piruvat ise güçlü bir antioksidandır ve H_2O_2 'yi bağlayıcı özelliği vardır (Zhou, 2001). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda AS'nin antioksidan özellikleri olduğu bildirilmiştir (Azab ve ark., 2011).

2.5. Arı Sütü (AS)

AS 6-12 günlük işçi arıların ana arıyı ve genç larvaları beslemek için yutak üstü salgı bezlerinden salgıladıkları beyaz krem renğinde ve tereyağı kıvamında protein, vitamin, mineral maddeler ve iz elementler bakımından oldukça zengin bir besin maddesidir. Tadı ekşi ve kokusu keskin fenolik yapıdadır. Yoğunluğu $1,1 \text{ g/cm}^3$ olup kısmen suda çözünabilmektedir. AS vazodilatatif, hipotansiv, antitümör, antihiperkolesterolemik, anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikler taşır (Fujii ve ark., 1990; Koyo-Miyata ve ark., 2004; Yang ve ark., 2010).

AS ana arının besini olup, besin değeri oldukça yüksektir. Ana arı ve işçi arılar yumurtadan çıktıklarında aynı genetik yapıya sahip olmalarına rağmen, larva döneminde farklı oranda ve sürede AS ile beslenmeleri yapılarının farklılaşmasına neden olmaktadır. Sadece 6 günlük bu farklı beslenme sonucunda ana arı hastalıklara direnç kazanmakta, günde kendi ağırlığının iki katı kadar (1500-3000) yumurta üretebilmekte ve 6 yıl kadar yaşamaktadır. Diğer işçi arılar ise kolay hastalanırlar, dişi oldukları halde yumurta bırakamazlar ve sadece 2 ay

yaşarlar. İki birey arasındaki bu derece farklılaşma sadece AS ile beslenmelerinden kaynaklanmaktadır.

AS; yaklaşık % 66 su, % 14.5 karbohidrat, % 4.5 lipid, % 13 aminoasit, B grubu vitaminlerinin tümüne ek olarak A, D, C, E vitaminleri, biyolojik aktif maddeler, önemli bazı mineral maddeler ve bir miktar da tespit edilemeyen maddeler içerir. Ayrıca 10 temel amino asitten (esansiyel) sekizini de (metionin, lösin, lizin, valin, fenil-alanin, treonin, triptofan, izölösin) doğal hormon ve enzimleriyle içermektedir. Metabolizma için çok önemli olan panteik asit (pantheic acid), asetilkolin (acetylcholine), protein, bağışıklık sistemini güçlendiren bir yağ asidi olan 10-HDA (10-Hydroxy-2 Decanoic Acid), sepanin asit (sepanine acid), hastalıkların iyileşme döneminden sonra sindirimi düzenlemek ve iştahı açmak için çok ideal olan oleik asit (oleic acid) içerir.



Şekil 5. Arı Sütü (<http://www.baybir.org/icerik/53/ari-sutunun-yapisi.html>. Erişim tarihi: 21.09.2015).

2.6. Çalışmada Takip Ettiğimiz Belirteçler

2.6.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSİ)

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Bu maddeler genellikle sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Bu sebeple total antioksidan seviyenin (TAS) ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Dokunun antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren TAS ölçümü, giderek yaygınlaşmaktadır (Romay ve ark., 1996; Erel, 2004).

ROS laboratuvarlarda ayrı ayrı belirlenebilir. Ancak bu işlemler zor, zaman alıcı ve pahalıdır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, toplam oksidanların durumu, total oksidan seviye (TOS) ölçülerek izlenmiştir (Erel, 2005). Ayrıca TAS ve TOS ölçülerek, belirlenmesi çok zor olan ve henüz bilinmeyen oksidan ve antioksidanların da ölçülmesini sağlanabilir (Bölükbaş ve ark., 2005). Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenmektedir (Kösecik ve ark., 2005).

2.6.2. Apoptoz

Canlılar, doğar, büyür, çoğalır, farklılaşır, yaşlanır ve ölür. Yaşamın sürdürülmesi organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Mak, 2003).

Canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşir. Başlıca iki hücre ölüm seklinden biri olan nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterizedir ve ani iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik bir süreçtir (Kane, 1995). Bu türde hücre içi denetim mekanizmalarının etkisi yoktur. Hücre kendi isteği ile ölmez.

Diğer bir hücre ölüm şekli olan fizyolojik ölüm yolu ise yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücreler arası dengeyi ve hücrelerin canlılıklarını sürdürmeyi sağlar (Hockenbery, 1995).

1920’li yıllardan beri bilinen ve nekrozdan farklı olarak hücre büzüşmesi görülmesi nedeniyle “büzüşme nekrozu” olarak adlandırılan fizyolojik hücre ölümünün, büyük oranda önceden kestirilebilir (programlanmış), kesin şekilsel (morfolojik) nitelikleri olan bir süreç olduğu 1970’lerde Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ileri sürülmüştür (Cummings ve ark., 1997). Genetik olarak belirlenen aktif bir süreç olan programlanmış hücre ölümünün günümüzde en az iki ayrı şekli olduğu belirtilmektedir (Majno ve Joris, 1995).

Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Hıkım ve ark., 1995; Erdoğan, 2003). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (Mcphie ve ark., 2003). Artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, 1994).

Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA’sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Erdoğan, 2003).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, organizmada fizyolojik süreçlerin yanı sıra çeşitli patolojilerin ortaya çıkışındaki mekanizmalarda da rol oynamaktadır. Apoptoz sürecindeki dengenin bozulması, hastalıkların ortaya çıkışını tetiklemektedir.

Bu mekanizma stres etkenlerine bağlı olarak gelişen hücre ölümünün engellenmesinde önemli görünmektedir. Bu etkenler UV radyasyonu gibi dış kaynaklı etkenler olabileceği gibi metabolik bozukluklara bağlı olarak biriken metabolitler de olabilir.

UV irradyasyonu, oksijen radikallerinin üretimini arttırarak hücre membranının hasarlanmasına ve DNA kırıklarının olusmasına neden olarak hücrenin ölümüne ya da kanser hücrelerine dönüşmesine zemin hazırlayabilmektedir (Kulms ve Schwarz, 2002). UV uygulanması sonucunda stres enzimleri arasında yer alan c-Jun N-terminal kinazlar (JNK'ler) aktive olmaktadır (Adler ve ark., 1995). JNK'lerin, apoptoz metabolizmasında son derece önemli rol oynadığı bilinen kaspazların, özellikle kaspaz-3'ün aktive olmasını sağlayarak apoptozun gelişiminde rol oynadığına dair raporlar yayınlanmıştır (Berglund ve ark., 2004).

2.6.2.1. Apoptotik hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler

Kromatin değişikliklerinin başlamasından kısa süre önce, hücresel aktivitelerde ve sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyumun sitoplazma içi miktarında hafif artma görülür (Majno ve Joris, 1995; Mason, 1999). Bu artış bazı sessiz enzimleri aktive ederek bazı yapısal değişikliklere yol açar. Kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutaminaz bu enzimler arasındadır (Majno ve Joris, 1995; Mason, 1999).

Çekirdek değişikliklerine endojen kalsiyum-magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur (Wyllie ve ark., 1992; Ribeiro ve Carson, 1993; Conroy ve Alexander, 1996;).

Nükleozomlar arasında kromatini bölerler ve apoptotik hücre DNA'sı hepsinin uzunluğu 180-200 baz çifti ve katları olan parçalara ayrılır. Bu parçalar agaroz jel elektroforezde apoptoza özgü merdiven görünümünü oluştururlar (Hockenbery, 1995).

Apoptozun iki ana düzenleyicisi p53 ve Bcl-2'dir. Başlangıçta bir onkoprotein olarak belirlendiyse de yabani (wild) p53 proteininin özellikle DNA hasarlanmasına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü açıklık kazanmıştır.

2.6.2.2. Deri ve Apoptozis

Apoptotik hücreler mükemmel bir şekilde fagosit edilmektedir. Bu durum, ultraviolele maruz kalan hücrelerde açıkça görülmektedir. İlk 24 saatte görülen güneş yanığı hücrelerinden 72. saatte eser kalmaz. Bu hızlı hücre kaybı deskuamasyon ile değil apoptoz aracılığıyla gerçekleşmektedir (Olson ve Everett, 1975).

P53 geni hem tümör baskılayıcı hem de apoptoz yöneticisi görevini görmektedir (Oltvai ve Korsmeyer, 1994). Gelişmekte olan hücrelerde DNA hasarı ortaya çıktığında, hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktadır (Barr ve Tomei, 1994; Martin ve ark., 1994; Kamb, 1994; Lane ve ark., 1994; Bellamy ve ark.,1995).

Bu fazda hücre ya DNA onarım yoluna gider (ve sonuç olarak ta hücre döngüsüne tekrar girebilir) ya da hasar çok büyükse intihar eder. Dolayısıyla p53 işlevinin yetersiz olduğu hücrelerde apoptoz gerçekleşmeden veya DNA onarımı tamamlanmadan DNA çiftleşmesi ve sonuç olarak da neoplasi gelişebilir (Carson ve Ribeiro, 1993; Lane ve ark., 1994; Symonds, 1994).

Deri biyolojisinde p53'ün önemi özellikle epiderminin UV'ye karşı cevabı ile incelenmiştir. Güneş yanığı hücreleri, UV'ye yanıt olarak apoptoza uğramış keratinositlerdir (Weedon ve ark., 1979).

Bu hücreler p53 tarafından G1 fazında durdurulmuş ve muhtemelen siklobütan pirimidin dimerlerini tamir edemeyen hücrelerdir (Carson ve Ribeiro, 1993; Kamb, 1994).

Dolayısıyla bu cevap koruyucu nitelik taşımaktadır. Ayrıca prekanseröz lezyonlarda ilk gelişen mutasyonun p53 üzerinde olması hiç de şaşırtıcı değildir (Kamb, 1994; Ziegler ve ark., 1994).

Aktinik keratozların birçoğunda klonal p53 mutasyonu mevcuttur ve apoptoza direnç sonucu bu farklı hücre serilerine gelişme imkanı doğmaktadır. Yineleyen UV tehdidi altında bu hücrelerde ek mutasyonlar ortaya çıkmakta ve %90'dan fazla vakada p53 mutasyonunun görüldüğü yassı hücreli karsinom gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Ziegler ve ark., 1994).

Dolayısıyla UV, deri kanseri gelişiminde hem başlatıcı hem de devam ettirici bir nitelik taşımaktadır.

2.6.3. Genotoksisite

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductlarıdır (Kramer, 1998). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı,

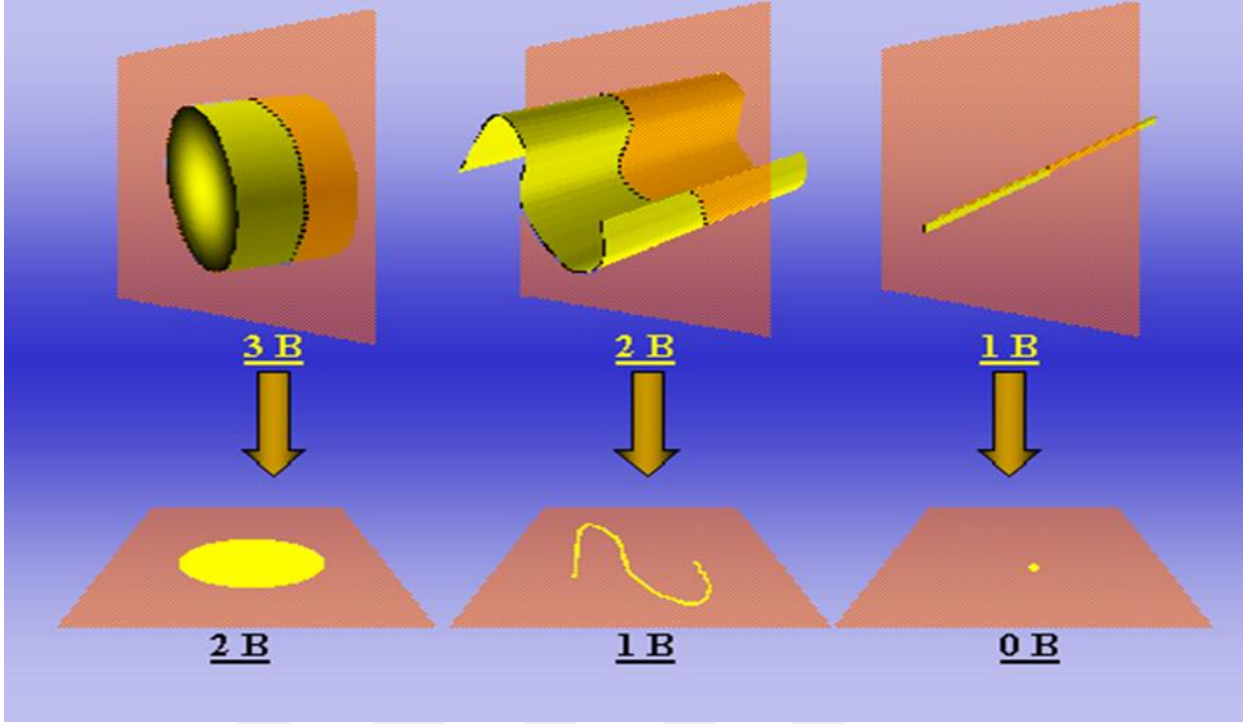
yaşlanma, kanser oluşabilmektedir. Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanabilmektedir (Kramer, 1998). Moleküler kanser genetiğindeki son gelişmeler, karsinojenlerin çoğunun genotoksik ve karsinogenezin onkogenler ve antionkogenlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Kramer, 1998; Jena ve ark., 2002).

2.7. Stereolojik Yöntemler

Stereoloji, mikroskobik yapıların ve diğer 3B cisimlerin geometrik özelliklerini, onların kesitlerinden yola çıkarak sayısal veriler şeklinde ifade edilmesi ile uğraşan bir bilim dalıdır. Objelerin sayısal veriler şekline dönüştürülebilen geometrik özellikleri; hacim, yüzey alanı, uzunluk ve sayı (adet) olmak üzere dört grup altında incelenir. Stereolojide objenin bu özellikleri sonda (probe) adı verilen dört ayrı araç ile hesaplanır. Bunlar; noktalar, çizgiler, düzlemler ve disektör(hacimler)dür. Stereolojide, objelerin geometrik özellikleri yine geometrik özellikte olan sondalarla belirlenir. Farklı boyutlardaki geometrik sondalar objelerin farklı geometrik özelliklerine duyarlıdır. Benzer şekilde objelerin sahip oldukları dört adet geometrik özelliğin her biri için duyarlı olan ayrı bir sonda vardır.

Tablo 1: Stereolojik sondalar ve objelerde duyarlı oldukları geometrik özellikler

Sonda	Disektör(3B)	Düzlem(2B)	Çizgi(1B)	Nokta(0B)
Özellik	Sayı(0B)	Uzunluk(1B)	Yüzey(2B)	Hacim(3B)

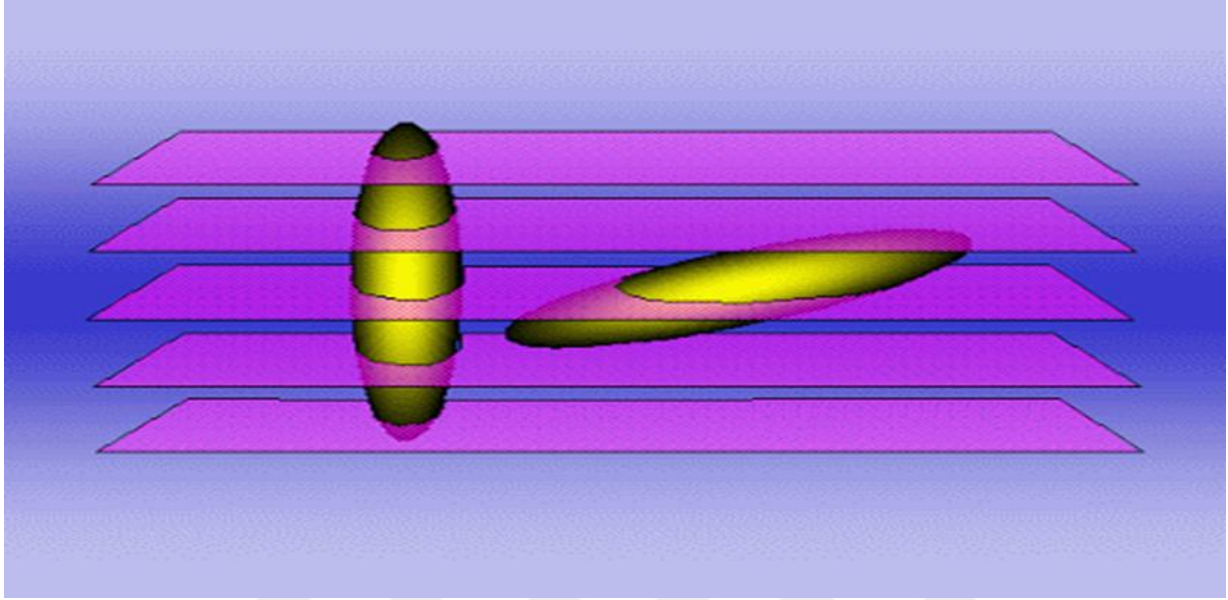


Şekil 6. İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 25.11.2015).

Herhangi bir yapı, iki boyutlu bir düzlemle kesişmesi durumunda, normalde üç boyutlu uzaydaki n boyutlu yapısına bağlı olarak, “ $n-1$ ” boyutlu bir kesişim (izdüşüm) verir (şekil 6). Dolayısıyla iki boyutlu kesitlerde, hacme sahip 3 boyutlu yapılar iki boyutlu alanlar; iki boyuta (en ve boy) sahip alanlar tek boyutlu çizgiler ve tek boyutlu çizgiler ise boyutsuz (sıfır boyutlu) noktalar olarak örneklenirler. Bu durum biyolojik dokulara uyarlanacak olursa: Bir hücre (3 boyutlu), kesitte bir alan; bir zar bir çizgi (çekirdek zarı gibi) ve (tam olmasa da ideal anlamında bir çizgi olan) bir fibril de bir nokta olarak ortaya çıkacaktır. Bu prensibe göre boyutsuz (sıfır boyutlu) varlıklar, iki boyutlu kesitlerle örneklenemezler. Sayı kavramı da, boyutsal özelliklerden bağımsız (yani sıfır boyutlu) olduğundan, iki boyutlu kesitlerden faydalanılarak, doğrudan sayı kavramına ulaşmak imkânsızdır. Sayı ancak üç boyutlu bir örneklemeye sondası ile örneklenebilir.

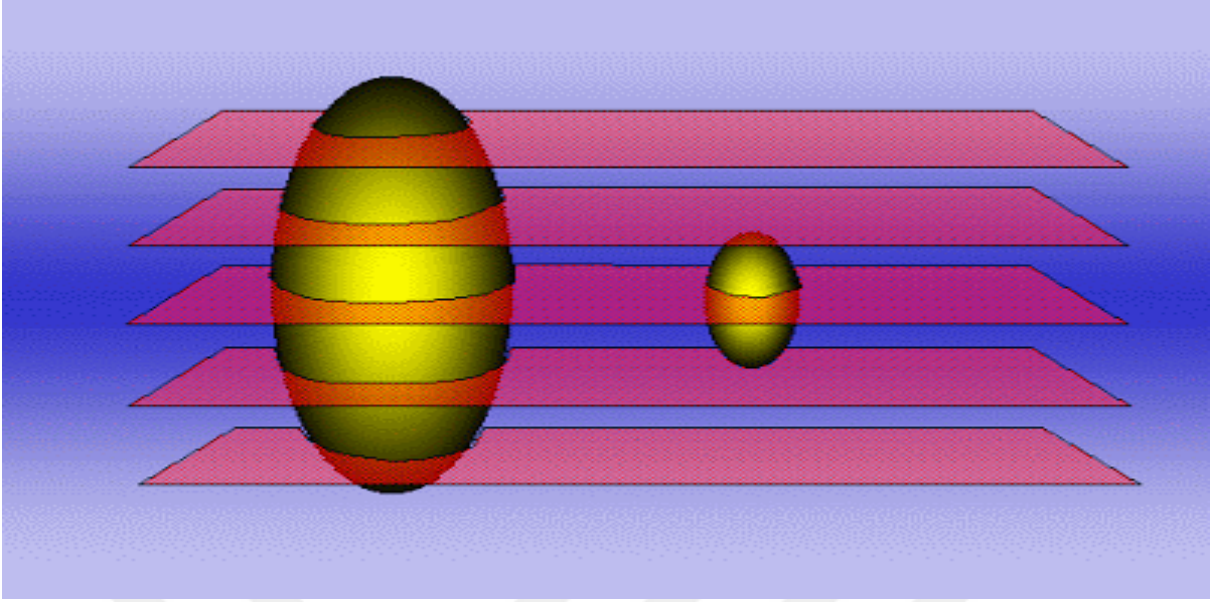
Sözgelimi, bir yapı içerisinde bulunan "a" tipi bir taneciğin (örneğin beyinde bulunan nöronların) sayısını belirlemek istediğimizde, bunu doğrudan "a" taneciklerini içeren bir yapıdan alınmış iki boyutlu bir kesit üzerinde gerçekleştiremeyiz. Çünkü, taneciklerin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri, onların büyüklükleri, kesit alma yönüne dik olan

uzanımları, hacimleri vb. gibi faktörlerle yakından ilişkilidir. Büyük tanecikler, küçüklere göre daha büyük bir ihtimalle kesit düzlemi tarafından kesilme şansına sahipken, daha küçük olan tanecikler daha az izdüşüm verme şansına sahiptir (Şekil 6).



Şekil 7. Taneciklerin yöneliminin kesitlerle örneklenme şansına etkisi (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 25.11.2015).

Birbirine paralel ve eşit aralıklı kesitlere ayrılmış olan bir referans hacim içerisindeki iki partikülden büyük olanı, küçük olana göre daha fazla kesit tarafından örneklenme şansına sahiptir. Dolayısıyla, büyük partikül daha fazla kesitte izdüşümleri ile temsil edileceğinden, kesitlerde ortaya çıkan partikül izdüşümlerinin sayısının gerçek partikül sayısı ile doğrudan bir ilişkisinin olmadığı açıktır (şekil 7).



Şekil 8. Tanecik büyüklüğünün örneklenme şansına etkisi (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 25.11.2015).

Sonda ile objenin geometrik özelliklerini belirleyebilmek için ilgili sonda 3B ortamda ilgilenilen objeye rastgele uygulanır ve aralarındaki etkileşim belirlenir. Bu etkileşim sonucunda elimize primer veri elemanları geçer. Sondanın 3B ortamda objeye uygulanması pratik olarak mümkün olmayacağı için bu işlem objeden alınan kesitlerde gerçekleştirilir. Sondanın objeye uygulanması ile oluşan primer veri sondanın boyutuna göre değişir. Örneğin sonda olarak disektör kullandıysak bu durumda primer verimiz partikül uçlarıdır, yapılacak iş de bunların sayılmasıdır. Eğer noktalardan oluşan bir sonda kullandıysak bu durumda sondadaki noktalar ile objenin kesişimleri verimiz olur. Yapılacak iş yine bu kesişimlerin sayılmasıdır.

2.7.1. Referans hacminin hesaplanması (Cavalieri metodu)

Stereolojide objelerin geometrik özelliklerinden biri olan hacim, ona duyarlı olan noktalardan oluşan bir test sondası ile hesaplanır. Noktalar ile hacim hesabı, stereolojide en sık kullanılan ve anlaşılması en kolay olan ölçüm tekniğidir. Bu teknik ile izole durumda olan herhangi bir objenin hacmi hesaplanabileceği gibi, başka bir yapı veya matriks içerisinde yer alan yapıların hacimleri de hesaplanabilir. Noktalar ile hacim hesabının esası şuna dayanır: Bir

yapı boşlukta ne kadar yer kaplıyorsa o kadar fazla nokta içerebilir. Hacmi azaldıkça içerdği nokta miktarı da azalır.

2.7.2. Hacim fraksiyonu (yoğunluğu)

Hacim fraksiyonu, iki hacmin oranı olarak tarif edilir. Bu iki hacim, ilgilendiğimiz referans hacmi içerisinde yer alan iki ayrı yapı hacminin oranı olabileceği gibi, referans hacmi ile içerdği bu yapılardan birinin hacminin oranı da olabilir. V_v sembolü ile gösterilir. Buna göre ilgilendiğimiz bir elemanın hacim fraksiyonu, o elemanın hacminin içerisinde bulunduğu referans hacmine oranıdır. Şu şekilde gösterilir:

$$V_v(\text{eleman, ref}) = \frac{\text{Referans hacmindeki eleman hacmi}}{\text{Referans hacmi}}$$

Buradaki V_v sembolü hacim fraksiyonunu gösterirken, parantez içindekiler ile de bu fraksiyonun hangi referans hacmindeki hangi elemana ait olduğu belirtilir. Hacimlerin yerine kesitlerde referans hacmi ile ilgili eleman üzerine rastgelen noktaların oranlarının da aynı eşdeğere sahip olduğu bulunmuştur. Bunun için yapılması gereken sadece kesitler üzerine belirli aralıklarla noktalar içeren bir gritin rastgele bırakılması ve ilgili eleman ile referans hacmine rastgelen noktaların sayılıp oranlanmasıdır. Bu durumda da hacim fraksiyonu için P_p (eleman, ref) ifadesi kullanılır. Yani:

$$V_v(\text{eleman, ref}) = P_p(\text{eleman, ref}) = \frac{\text{Eleman profillerine rastgelen nokta sayısı}}{\text{Referans profiline rastgelen nokta sayısı}}$$

Hacim fraksiyonu sadece bir orandan ibaret olduğu için biyolojik yapılarda doğrudan anlam ifade eden bir parametre olarak kullanılmazlar. Çünkü eleman yoğunluğundaki bir değişim doğrudan ilgili elemandaki bir değişiklikten kaynaklanmayabilir. Bu nedenle hacim fraksiyonunun mutlak bir değer olan toplam hacim şeklinde ifade edilmesi gerekir. Bunun için hacim fraksiyonu ayrıca hesaplanmış referans hacmi ile çarpılır. Sonuçta ilgili elemanın o referans hacmindeki toplam hacmi elde edilir (Korkmaz ve ark., 2002).

$$V(\text{eleman}) = V(\text{referans}) \times V(\text{eleman, ref})$$

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın analizleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Enzimoloji Laboratuvarı ve Histoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskobu Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Deneyler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada başlangıç ağırlıkları 250-300 g arasında değişen Wistar türü albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanların temini Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi tarafından yapılmıştır. Sıçanlar araştırma süresince polikarbonat kafeslerde, her kafeste en fazla 6 hayvan olacak şekilde tutulmuştur. Deney süresince tüm sıçanlar standart sıçan yemi ile beslenip, çeşme suyu içirilmiştir. Hayvanlar bu süre içerisinde su ve yem açısından herhangi bir sınırlandırmaya maruz bırakılmamışlardır. Muhafaza edildikleri oda, 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık olacak şekilde standartlar dahilinde ayarlanmıştır. Ayrıca laboratuvarın oda sıcaklığı termometre, nemi ise higrometre ile ölçülerek sıcaklığın 23 ± 1 °C 'yi aşmaması için laboratuvar sürekli olarak aspiratör ile havalandırılmıştır.

3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmada oluşturulan toplam 5 grup her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde aşağıdaki gibi işlemlere tabi tutulmuştur.

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir muamele yapılmadı.

2. UVB grubu: Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVB (0.22 j/cm^2)'ye maruz bırakıldı.

3. AS grubu: Bu gruptaki hayvanlara 150 mg/kg AS gün aşırı olarak verildi.

4. UVB + AS (100 mg/kg) grubu: Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVB'ye maruz bırakıldı. Buna ilaveten söz konusu hayvanlara UVB uygulamasından önce 100 mg/kg AS oral yolla gün aşırı olarak uygulandı.

5. UVB + AS (200 mg/kg) Grubu: Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVB'ye maruz bırakıldı. Buna ilaveten söz konusu hayvanlara UVB uygulamasından önce 200 mg/kg AS oral yolla gün aşırı olarak uygulandı.

Bütün gruptaki sıçanlara standart diyet (protein % 24, lysine % 1, metionin % 0,6 , sistein % 0,4, selüloz % 7, NaCl % 1, kalsiyum % 1-2 ve enerji 2650 kcal/kg) verilerek deney sırasında su almalarına izin verildi.

3.2. Deney hayvanlarının traşlanması

Deney hayvanları sinbo marka traş makinası ile sırt bölgelerinden yaklaşık 15 cm²'lik alanı kapsayacak şekilde traş edildi. Traşlama işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce yapıldı ve bunu takiben çalışmanın devam ettiği 30 gün içerisinde haftada bir kez olmak şartıyla toplanda çalışma boyunca beş kez deney hayvanları traşlandı. Uygulama gruplarının yanında kontrol grubu da olası standart sapmayı bertaraf etmek için aynı muameleye maruz bırakılmıştır.

3.3. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar

Kitler: TAS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics LOT:NR14047A), TOS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics LOT:RL0004), Apoptotic DNA Ladder kiti (Roche Applied Science)

Kimyasallar: % 1,0'lik normal melting point (NMP) agaroz Jel, % 0,7'lik low melting point (LMP) agaroz jel, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), triton X-100, sodyum hidroksit, etidyum bromid, TAE buffer, AS.

3.4. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler

Radwag AS 220/X hassas terazi, TTS 3 digital yellow line vorteks, Orion 3 star pH metre, Aurigo cerrahi set, Bandelin Sonopuls ultrasonic homojenizatör, Hettich Universal 320R soğutmalı santrifüj, otomatik pipet Socorex Swiss Brand, Siemens derindonduruculu buzdolabı, Genesys 10 uv Scanning spektrofotometre, WiseStir MSH-20A - Digital Magnetic Stirrer, Heidolph Silent Crusher M (manyetik homojenizatör), Zeiss Axioskop 40 mikroskop, Canon EOS Rebel XS / ds 126 191 EOS fotoğraf makinası, Wiseven Fuzzy Control System etüv, The Leica RM2125 Microtom cihazı, Thermo Shandon sıcak su havuzu, Kunz Instruments Paraffin Dispenser WD-4, Elga Reservoir saf su cihazı, Bioered yatay elektroforez sistemi, Nikkon marka epifloresan mikroskop ve symentac marka jel görüntüleme sistemi çalışma esnasında kullanılmıştır.

3.5. Etkinliği araştırılan moleküllerin uygulanması

AS: Çalışmamızda UVB uygulamasından 30 dk önce, 4.gruptaki hayvanlara 100 mg/kg ve 5.gruptaki hayvanlara 200 mg/kg AS oral yolla gün aşırı olarak verildi.   nc  gruptaki hayvanlara ise gün aşırı olarak 150 mg/kg AS oral yolla verildi.

3.6. UVB'nin uygulanması

126 cm boy, 30 cm yükseklik ve 65 cm eninde ratların standart kafeslerinin rahatlıkla sığdırılabileceği büyük bir kafes (ahşap) tasarlandı. Yaptırılan bu ahşap kafesin üst kısmına Philips markalı UVB (20W) lambası monte edildi. 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVB ışını ratlara uygulandı. Gerekli koruyucu önlemler alınarak deney süresince ratların genel durumları kontrol edildi.



şekil 9. Deney hayvanlarına UVB ışınının uygulanması (**A:** UVB kabininin boş hali. **B:** UVB kabinine kafeslerin konmuş hali).

3.7. Kan ve doku örneklerinin hazırlanması

Kan ve doku örneklerinin alınması amacıyla bütün gruptaki hayvanlara, AS ve UVB uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra her sıçan için 100 mg/kg ketamin dozu i.p olarak enjekte edilerek anestezi uygulandı. Kan dokusu örnekleri genel anestezi altında hayvanların kalbinden enjektörler yardımıyla alınıp EDTA'lı tüplere aktarıldı. Toplanan deri dokusu örnekleri ise %

0.9'luk fizyolojik suda yıkama işleminden geçirilerek laboratuvarında inceleme zamanına kadar -75 °C'de derin dondurucuda tutuldu. TAS ve TOS spektrofotometrik yöntemle daha sonra elde edilen doku süpernatantlarında ölçüldü.

Doku homojenatlarının hazırlanması: Deney sonrası derin dondurucuda bekletilen deri dokusu örneklerinden 0.1 g doku alınarak üzerine 1900 µl soğuk fosfat tamponu (PBS) ilave edildi. Elde edilen karışım soğuk tutulmak kaydıyla yalaşık 1 dakika mekanik (Heidolph marka) daha sonra 30 saniye ultrasonik homojenizatörde (Bandelin marka) homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar uygun deney tüpleri içerisinde soğutmalı santrifüjde 6000 rpm'de +4 °C sıcaklıkta 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatantlar spektrofotometrik analizler için kullanıldı.

3.8. Analizlerin Yapılması

3.8.1. TAS ölçüm tayini

TAS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedüründe belirtildiği gibi spektrofotometre cihazında 660 nm'de ölçüm yapılmıştır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edilmektedir. Birimi Trolox Equivalent/L'dir (Erel, 2004).

3.8.2. TOS ölçüm tayini

TOS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedüründe belirtildiği gibi spektrofotometre cihazında 530 nm'de ölçüm yapılmıştır. Birimi µmol H₂O₂ Equivalent/L'dir (Erel, 2005).

3.8.3. OSİ'nin hesaplanması

OSİ, TOS'un TAS'a oranı olarak değerlendirildi. OSİ birimi AU (Arbitrary Unit) olarak kabul edildi (Kösecik ve ark., 2005).

3.8.4. Apoptotik DNA ladder (DNA Fragmentasyonu) yöntemi ile apoptozun tespiti

Genomik DNA fragmentasyonu ölüme giden bir hücrenin kesin kanıtı olduğundan bu yöntem önemlidir (Compton ve Cidlowski, 1986). Bu yöntemde apoptotik hücre kitlesi

bağlayıcı lizis tamponu ile eşit hacimde inkübe edilir. Daha sonra kolayca cam iplikli örtü ile kaplı tüp filitrelerden geçirilir. Santifürüj ile DNA Lysate bileşiklerinden cam fibrilli örtüye bağlanarak ayrılır. Yıkamadan sonra DNA filtreli tüpten kurtarılır ve jel üzerinde yürütülür (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Çalışmamızda;

- 1,8 g agarose
- 150 ml TAE (Tris-Acetate-EDTA)
- 10 µl EtBr (ethidium bromide)

Mikrodalga fırında kaynayıp biraz soğuduktan sonra jel tankına dökülüp hazırlandı.

Apoptotic DNA Ladder Kit ile apoptozis analiz edildi. İzole edilen apoptotik DNA fragmentleri. Jel elektroforezinde incelendi.

- 40-50 mg doku alındı.
- Alınan dokular 1/10 oranında lizis buffer eklendi ve homojenize edildi.
- Örnekler 6000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Her örnekten 100 µl supernatant önceden hazırlanan tüplere aktarıldı.
- Her tüpe kitten 200 µl lysis buffer eklenip inkübe edildi.
- Her tüpe 100 µl izopropanol eklendi ve filtreli tüplere aktarıldı.
- Filtreli tüpler 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüplere 500 µl washing buffer eklendi ve tekrar 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi alttaki sıvı döküldü ve işlem tekrarlandı.
- Tüpler santrifüjden çıkartılmadan 13000 rpm de 10 saniye santriüj edildi.
- Yeni tüplere aktarıldı ve 70 °C desu banyosunda her tüpe ısıtılmış 200 µl elution buffer eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Eppendorf tüpte biriken sıvı kullanılarak 155 voltta 45 dakika boyunca jelde yüzdürüldü.

3.8.5. Comet assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) yöntemi ile antigenotoksisite tayini

Comet assay; hızlı, basit ve hücresel düzeyde uygulanması kolay, genotoksisite ve olası endojen DNA hasarını iyi tanımlayan bir tekniktir. Bu teknik, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromid gibi floresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında bu hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünüm almaktadır. Bu çalışmada; Singh ve ark. (1994) tarafından geliştirilen comet metodu modifiye edilerek uygulandı.

Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu: Heparinli tüplere alınan kan örneklerinden mononükleer lökosit hücreleri izole edildi. Bir tüpe 500 µl histopaque–1077 (ficol) üzerine 500 µl heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve 25 °C’de 30 dakika santrifüj edildikten sonra, orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılıp fosfat tamponu ile süspanse edilip kullanıldı.

1. % 1,0 ‘lik NMP agaroz jel hazırlanarak 100 µl jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılıp buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı.

2. Hazırlanan lamalar nemli kutularda bekletilip PBS ile mm³’ te 104 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınıp 80 µl % 0,7’lik low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırılıp, lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi.

3. Agaroz jel kuruduktan sonra slâytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda (100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM trizma base) bekletilerek hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı. Lizis buffer’a çalışmadan hemen önce % 1 oranında triton X-100 ve % 10 oranında DMSO karıştırılıp soğutulduktan sonra kullanıldı.

4. Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA, 300 mM sodyum hidroksit ve pH= 13) 30 dakika

inkübasyona bırakıldıktan sonra 300 mA, 17 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

5. Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı.

6. Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütmeli floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 50 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

7. Bu yöntemde DNA migrasyonu vizüel olarak değerlendirildi. Oluşan hasarın derecesine göre DNA'lar beş kategoriye ayrıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar Class 0, maksimum hasar olan DNA'lar ise Class 4 olarak değerlendirildi. Değerlendirilen 50 hücreye ait DNA'lardaki hasar dereceleri tespit edilip çıkan sonuç 2 ile çarpılıp, değerlendirme 100 üzerinden yapıldı.

3.9. Stereolojik İncelemeler

Deney hayvanlarından alınan deri dokusu örnekleri % 10'luk tamponlu formalinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömülerek mikrotomla 4 µm'lik kesitler alındı.

Histolojik çalışmalar, genel olarak çeşitli organlardan doku kesitleri alınarak bu örneklerin histolojik yönden değerlendirilmesini kapsamaktadır. Histolojide, öncelikle organizmanın en küçük canlı birimi olan hücrenin temel yapısal özellikleri ve fonksiyonları incelenmektedir. Bunu takiben doku, organ ve sistemlerin mikroskobik yapısı ele alınmaktadır. Işık mikroskopide kullanılan histoloji tekniği ışığı geçiremeyecek kadar kalın olan dokulardan ışığı geçirebilecek incelikte kesitler almak ve canlıda renksiz olan doku unsurlarını boyayarak mikroskop altında görülebilir hale getirmektir. Çalışmamızda bu esasa dayanarak işlemler yapıldı.

Histoloji laboratuvarlarında dokuların incelenmek üzere hazırlanması için yapılan gereken işlemler genel olarak yedi aşamadan oluşur. Bunlar;

- Tespit (Fiksasyon)
- Suyunu alma (Dehidratasyon)
- Saydamlaştırma
- Parafinle muamele (Parafinizasyon)
- Blok hazırlama
- Kesit hazırlama ve
- Boyama işlemleridir.

Tespit işleminde öncelikli olan, dokuyu olabildiğince hızlı bir şekilde ve bozmadan sabit hale getirmektir.

3.9.1. Tespit

Tespit işleminde amaca göre farklı solüsyonlar kullanılır. Genel olarak en çok kullanılan solüsyon formalin solüsyonudur. İdeal tespit için % 10'luk konsantrasyonda kullanılması yeterlidir. Formalin dışında kullanılan diğer bazı solüsyonlar şunlardır:

- %2'lik gluteraldehit solüsyonu
- %70–90 etanol solüsyonu
- Bouin solüsyonu
- Zenker solüsyonu

İdeal bir tespit için; Dokunun hacminin 10 katı miktarda tespit solüsyonuna gereksinim vardır.

Biz çalışmamızda % 10'luk formalin solüsyünü kullandık.

3.9.2. Suyunu alma (Dehidratasyon)

Dokuların mikrotom yardımıyla birkaç mikron kalınlığında kesilebilmesi, dokunun sert olması halinde mümkün olur. Bu amaçla öncelikle doku içindeki suyun alınıp su yerine alkolün geçmesi sağlanmalıdır. Daha sonra alkol alınıp yerine ksilol ve en son olarak ksilol alınıp yerine parafin geçirildi.

3.9.3. Saydamlaştırma

Kesit alma öncesi uygulanan ikinci aşama dokudaki alkolü alıp yerine ksilol geçirme işlemidir. Ksilol yağları eritilip ve doku saydamlaştırır.



Şekil 10. Dehidratasyon serisi (<http://www.dicle.edu.tr/Contents/c6a20279-52b8-4c4f-bfa2-ba9fe2a400aa.pdf>. Erişim tarihi: 15.10.2015).

3.9.4. Parafinizasyon

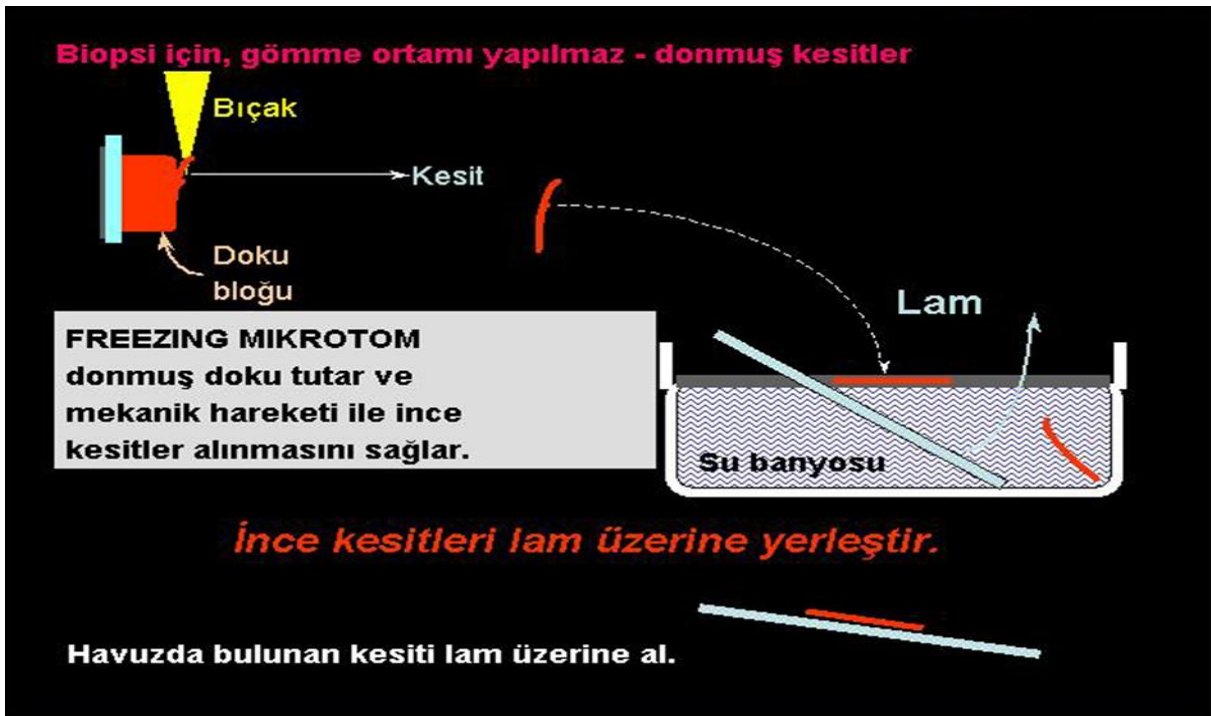
Bu aşamada dokular kullanılan parafinin özelliğine bağlı olarak 58-65 °C sıcaklıktaki parafin içinde en az 2 saat bekletilir. Böylece dokulardaki ksilol yerine parafin geçirilir.

3.9.5. Blok hazırlama

Sertleştirilen dokuların kesilecek yüzleri alt tarafa gelecek şekilde parafin içine gömülerek bloklar hazırlandı. Hazırlanan bloklar soğuduktan sonra kesilmeye hazır hale gelir.

3.9.6. Kesit hazırlama

İçerisinde doku bulunan parafin blok, mikrotom olarak adlandırılan dilimleyici alete monte edilerek kesilir. Çalışmamızda deri dokusu 4µm kalınlığında her 40. kesit olmak üzere yaklaşık her bireyden toplam 6 adet kesit alındı. Bloktan kesilen kesitler 35 – 40 °C sıcaklıktaki su banyosuna (benmari) atılır ve kesilme esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlanır. Düzgün doku lam yardımıyla sudan alınır. Lamlar etüvde bekletilir. Bu sırada doku içindeki parafin erir ve akar. Lam üzerinde sadece doku kesiti kalır.



Şekil 11. Kesitlerin hazırlanması (<http://www.dicle.edu.tr/Contents/c6a20279-52b8-4c4f-bfa2-ba9fe2a400aa.pdf>. Erişim tarihi: 15.10.2015).

3.9.7. Boyama

Lam üzerine alınan doku kesitinin boyanabilmesi için öncelikle parafinden kurtarılması gerekmektedir. Bu amaçla preparatlar tüm parafini temizlemek ve dokuyu saydamlaştırmak için lam üzerine alınan doku 30 dk 80 °C etüvde bekletildi. Etüvde çıkarılan preparatlar ksilol serisinden (20 + 20 dk) geçirildi. Daha sonra absolute alkolden başlamak suretiyle alkol

serisinden (15 + 15 dk) geçirildi. Sonrasında 3 dk suda bekletildi. Bundan sonra gerekli boyama yöntemleri uygulandı.

Tablo 2. Doku kesitlerinin alındıktan sonra Hemotoksilen-Eozin ile boyanma prosedürü

1. ETÜVDE	30 DK
2. XİLOL	20+20 DK
3. ALKOL	15+15 DK
4. SU	3 DK
5. HEMATOKSİLEN	1-3 DK
6. SU	3 DK
7. AMONYAK	3 DK
8. SU	3 DK
9. EOZİN	2-5 DK
10. SU	3 DK
11. ALKOL	10+10 DK
12. XİLOL	5+5 DK
13. MONTELEME	

Boyanmamış parafin kesitlerde çoğu doku elemanı renksizdir. Işık mikroskobu ile histolojik yapıyı ayırt etmek oldukça güçtür. Bu nedenle doku kesitlerinin boyanması gerekir. Boyama, çeşitli hücre ve doku kısımlarının boyaları farklı şekilde tutmaları esasına dayanır. Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında rutin olarak genellikle hematoksilen-eosin birleşik boyama yöntemi kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda bu boyama yöntemini kullandık.

Boyanan örnekler daha sonra entellan adı verilen özel bir madde ile kapatılarak kurumaya bırakıldı.

Dokulardan alınan kesitler üzerinde uygulanan bu işlemler dizisi neticesinde hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmeye hazır hale gelmiş olur.

3.9.8. Doku preparatlarının incelenmesi

Hazırlanan doku preparatları ışık mikroskobunda x40 sayısal açıklığı 0.65 Zeiss Achroplan özellikteki objektif kullanılarak fotoğraf alındı. Fotoğraf çekimlerinde ışık yükünü azaltmak amacıyla her doku preparatında ölçüm cetvelindeki 64 karelik alandan 1 kare fotoğraflandı. Daha sonra kesit görüntüsü noktalı alan ölçüm cetveli kullanılarak total volüm ve damar volüm hesabı yapıldı. Bunun için SHTEREOM 1.3 Paket Stereoloji programından

yararlanıldı. İlgili dokulara ait nokta sayılarından yola çıkarak damarın dermisteki volüm fraksiyonu çıkarıldı. Doku kesit sayısının her birey için yeterlilik testi olan Hata katsayısı (Coefficient of Error; CE) uygun olduğu yaklaşık 0.05 olarak tespit edildi, her gruptaki birey sayısının yeterlilik testi olan Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation; CV) nin de 0.02 olarak uygun olduğu belirlendi (Tablo 5-6).

3.10. İstatistiksel Analizler

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler, medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Önem derecesi bütün testler için $p < 0.01$ olarak kabul edilecektir.

4.BULGULAR

UVB'nin deride oluşturduğu oksidatif, genotoksik ve DNA hasarına karşı, AS'nin koruyucu etkisini incelediğimiz bu çalışmadan elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde kendi içinde başlıklara ayrılmış şekilde aşağıda verilmiştir.

Gruplar kontrol (K), UVB, AS 150 mg/kg (AS₁₅₀), UVB ve 100 mg/kg AS (UVB + AS₁₀₀), UVB ve 200 mg/kg AS (UVB + AS₂₀₀) olarak adlandırılmıştır.

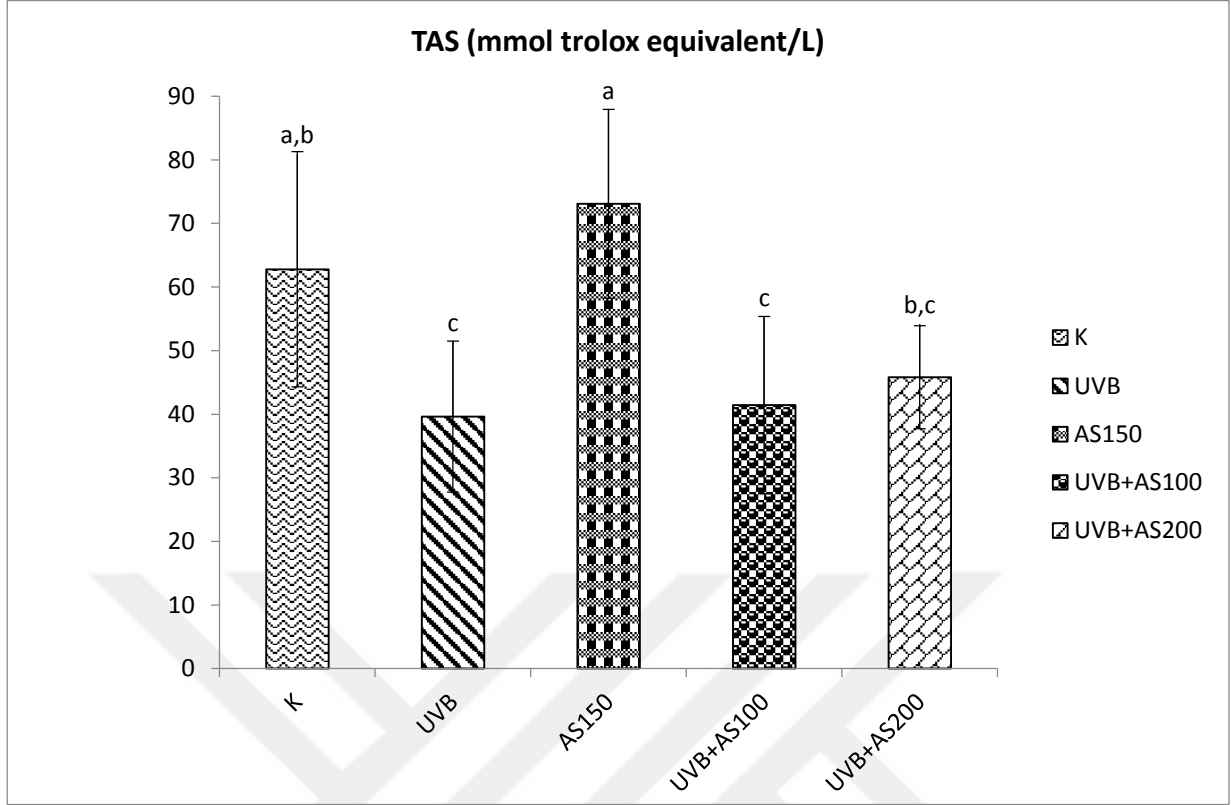
4.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları

Deri dokusunda bakılan oksidatif stres belirteçlerinin (TAS, TOS, OSI) tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırmalı sonuçları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Deri dokusunda ölçülen TOS, TAS, OSİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

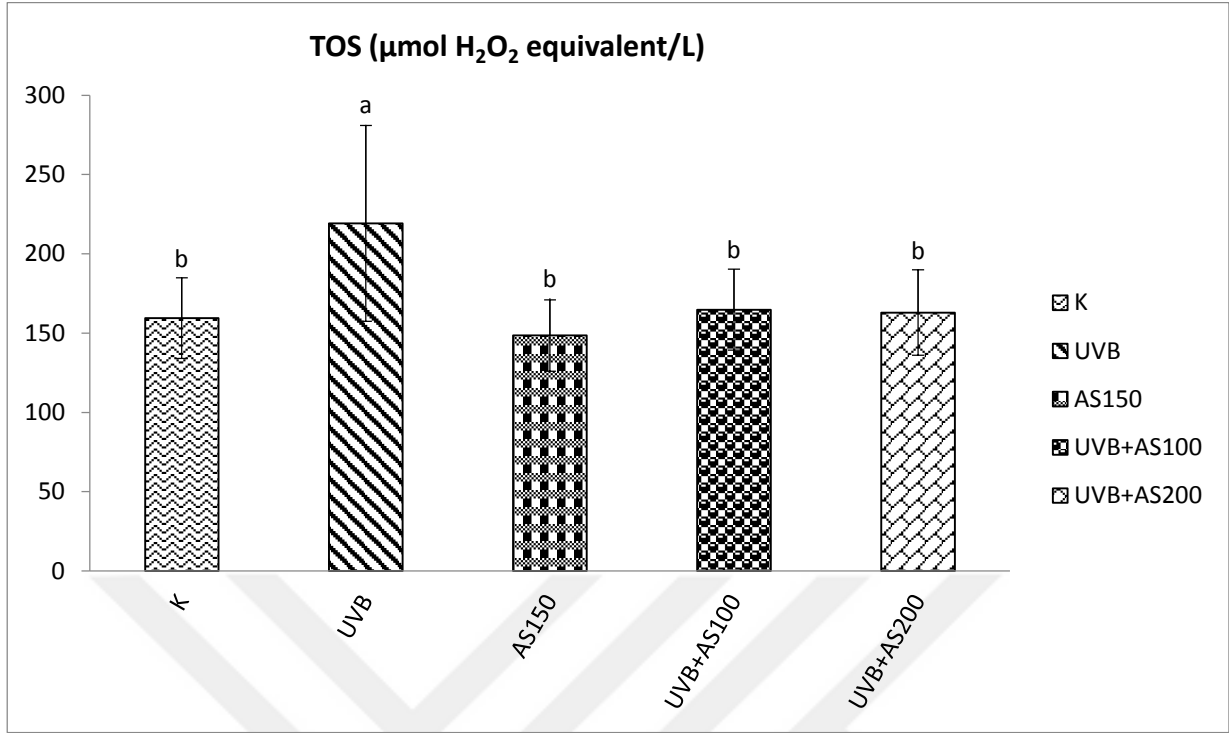
	Grup	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.	P
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	K	157.725	159.423 b	25.371	131.710	205.320	0.141
	UVB	201.630	219.208 a	61.739	143.090	325.000	
	AS ₁₅₀	155.285	148.508 b	22.500	108.940	167.480	
	UVB+AS ₁₀₀	155.285	164.770 b	25.539	141.460	200.000	
	UVB+AS ₂₀₀	160.980	162.928 b	26.949	128.460	200.000	
TAS(mmol trolox equivalent/L)	K	64.235	62.800 ab	18.477	35.000	85.000	0.011
	UVB	42.010	39.628 c	11.893	23.470	54.580	
	AS ₁₅₀	73.610	73.102 a	14.860	54.440	94.310	
	UVB+AS ₁₀₀	42.430	41.435 c	13.936	21.810	59.440	
	UVB+AS ₂₀₀	43.060	45.806 bc	8.099	37.360	56.390	
OSİ (Arbitrary unit)	K	2.525	2.730 bc	0.944	1.910	4.550	0.001
	UVB	5.525	5.855 a	1.968	3.690	8.870	
	AS ₁₅₀	2.005	2.117 c	0.612	1.450	3.080	
	UVB+AS ₁₀₀	3.755	4.527 ab	2.262	2.380	8.870	
	UVB+AS ₂₀₀	3.470	3.568 bc	0.255	3.370	4.010	

Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.01$).



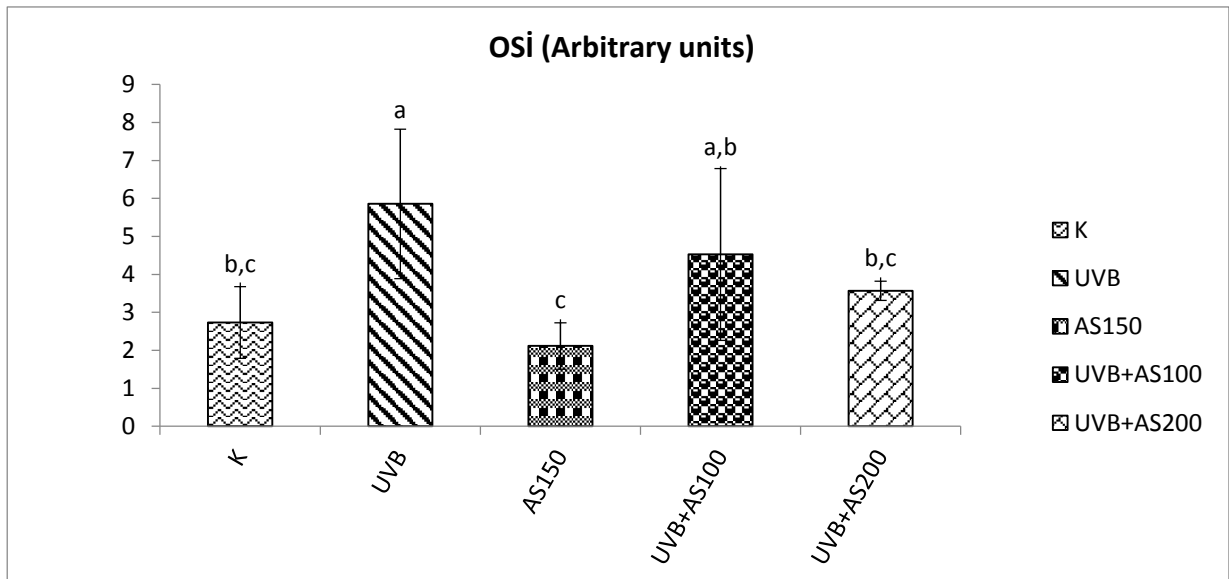
Şekil 12. Deri dokusu TAS sonuçlarının grafiği (**a:** UVB, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** UVB, AS₁₅₀ ve UVB + AS₁₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **c:** K ve AS₁₅₀ gruplarına göre fark anlamlıdır).

K grubu ile mukayese edildiğinde UVB verilen gruplarda TAS istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.01$) düşerken, AS₁₅₀ grubunda anlamlı ($p < 0.01$) bir artış olduğu görülmektedir. AS verilen gruplar UVB grubuyla kıyaslandığında ise TAS seviyesinde anlamlı olmayan ($p > 0.05$) artış görülmektedir (Şekil 12).



Şekil 13. Deri dokusu TOS sonuçlarının grafiği (**a:** K, UVB + AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** UVB grubuna göre fark anlamlıdır).

Şekil 13'ye göre UVB grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.01$) yüksektir. AS gruplarında ise UVB grubuna göre TOS değerinde anlamlı derecede ($p<0.01$) düşüşler saptanmıştır.



Şekil 14. Deri dokusu OSI değerlerinin grafiği (**a:** K, UVB + AS₁₅₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** UVB ve AS₁₅₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **c:** UVB ve UVB + AS₁₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır.)

OSI değerleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında UVB grubunda K'ya göre anlamlı ($p<0.001$) bir artış, AS₁₅₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler ($p<0.001$) görülmektedir (şekil 14).

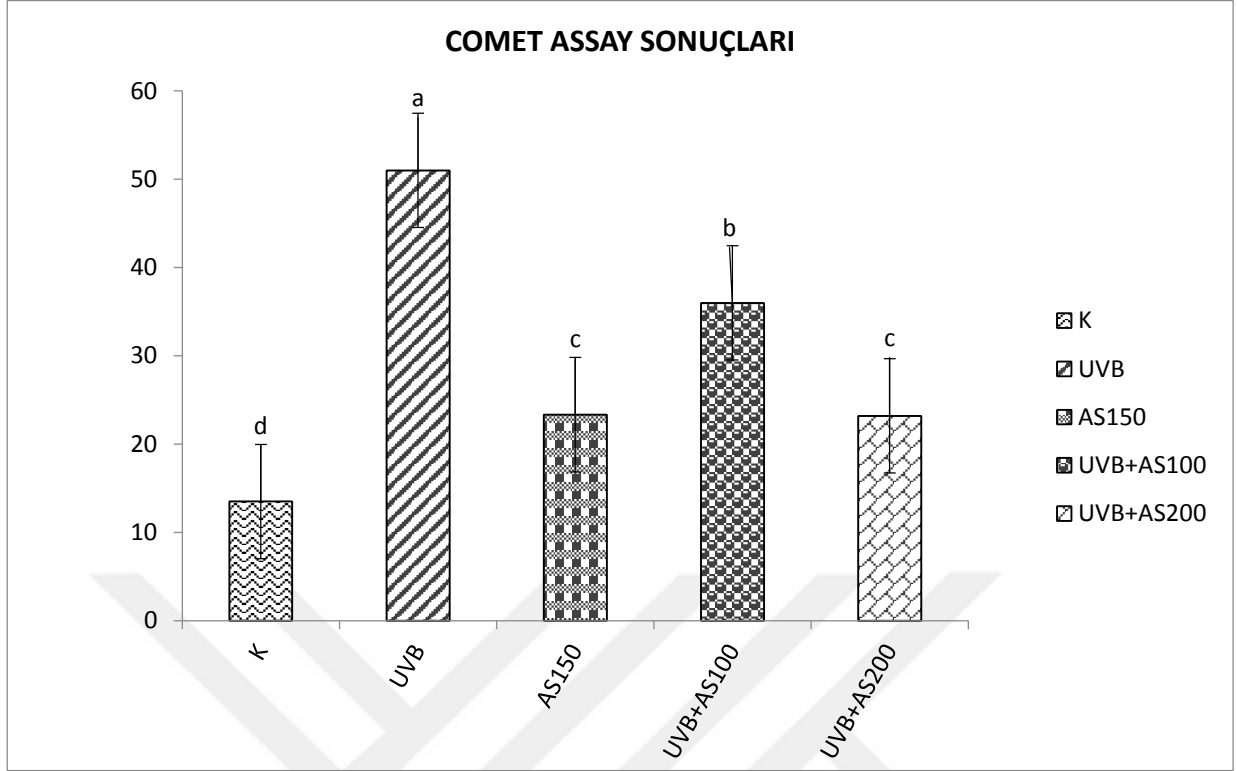
4.2. Antigenotoksik Etkilerin Analiz Bulguları

Kanda comet assay yöntemi ile belirlenen antigenotoksik etkilerin karşılaştırmalı bulguları verilmiştir.

Tablo 4. Kanda comet assay sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Mak.	P
COMET	K	12.50 d	13.50	4.18	9.00	21.00	0.001
	UVB	52.00 a	51.00	11.78	31.00	66.00	
	AS ₁₅₀	25.00 c	23.33	6.98	14.00	32.00	
	UVB+AS ₁₀₀	33.50 b	36.00	6.48	30.00	46.00	
	UVB+AS ₂₀₀	23.00 c	23.20	4.15	18.00	29.00	

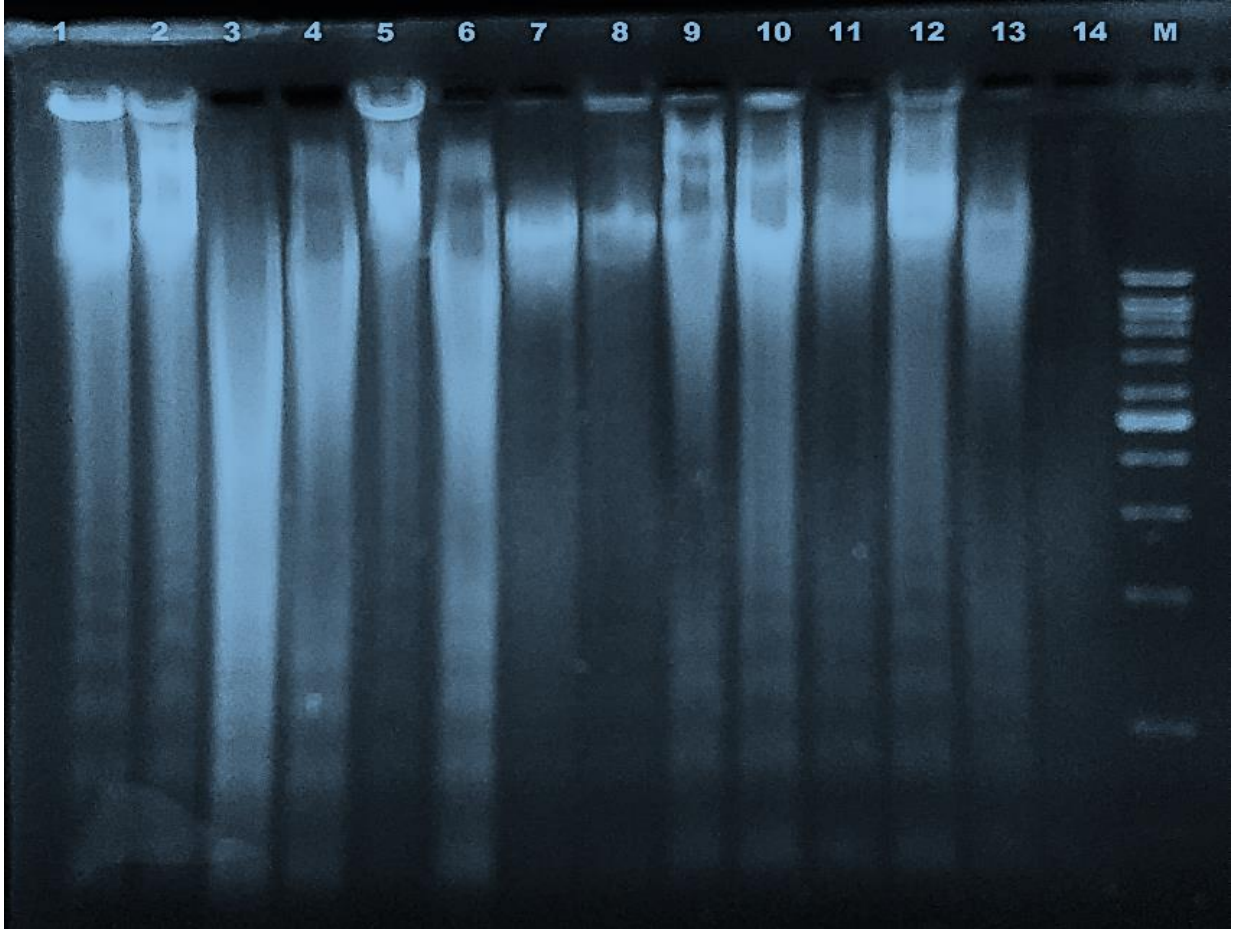
Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 15. Kanda comet assay düzeylerinin grafiği (**a:** K, AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** K, UVB, AS₁₅₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **c:** K, UVB ve UVB + AS₁₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır, **d:** UVB, AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır.)

Şekil 15'e göre UVB grubuna ait comet değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p < 0.001$) yüksektir. AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler ($p < 0.001$) görülmektedir.

4.3. Kan Dokusu Apoptoz Görüntüsü



Şekil 16. Kan dokusu apoptoz görüntüsü (M: markır, 1-3. bant: UVB+AS₁₀₀, 4-6.bant: AS₁₅₀, 7-9.bant: UVB+AS₂₀₀, 10-12.bant: UVB, 13-14.bant: kontrol).

Şekil 16 analiz edildiğinde K grubuna ait 13-14 nolu bantlarda neredeyse hiç DNA kırığı olmadığı görülmektedir. Aynı zamanda UVB verilmeyen AS₁₅₀ grubuna ait 4-6 nolu bantlarda da çok az DNA kırığına rastlanmıştır. Sadece UVB'nin uygulandığı gruba ait bantlarda (10-12) kırık sayısı en fazla olup, UVB+AS 100 mg/kg ve UVB+AS 200 mg/kg gruplarına ait 1-3 ve 7-9 nolu bantlarda hasarın tedavi edildiği yani UVB grubuna göre kırıkların azaldığı tespit edilmiştir.

4.4. Stereoloji Analiz Bulguları

Stereolojik yöntemlerle elde edilen sonuçlar ve karşılaştırmalı istatistiksel veriler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 5. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis total hacim CE ve CV değerleri

GRUP ADI	SIÇAN NO	TOTAL NOKTALAR	CE	CV	TOTAL VOLÜM	CV
K	1	517	0.043	0.05273	186120000	0.05271
	2	544	0.042		195840000	
	3	580	0.041		208800000	
	4	505	0.044		181800000	
	5	525	0.043		189000000	
	6	576	0.041		207360000	
UVB	1	799	0.035	0.10512	287640000	0.15017
	2	657	0.038		236520000	
	3	750	0.036		270000000	
	4	567	0.041		204120000	
	5	704	0.037		253440000	
	6	727	0.036		261720000	
UVB+AS₁₅₀	1	788	0.035	0.08027	283680000	0.08029
	2	614	0.040		221040000	
	3	696	0.037		250560000	
	4	770	0.035		277200000	
	5	759	0.036		273240000	
	6	722	0.037		259920000	
UVB+AS₁₀₀	1	719	0.037	0.14411	258840000	0.14414
	2	631	0.039		227160000	
	3	705	0.037		253800000	
	4	651	0.039		234360000	
	5	919	0.032		330840000	
	6	616	0.040		221760000	
UVB+AS₂₀₀	1	801	0.035	0.12327	288360000	0.12335
	2	535	0.043		192600000	
	3	761	0.036		273960000	
	4	667	0.038		240120000	
	5	663	0.038		238680000	

Çalışmamızda Stereoloji sonuçlarının CV değerleri hesaplanarak birey sayısına bağlı yeterlilik belirlenmiştir. Belirlenen bu yeterlilik çalışmamızın güvenilirliğini arttırmıştır.

Tablo 6. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis damar hacminin CE ve CV değerleri

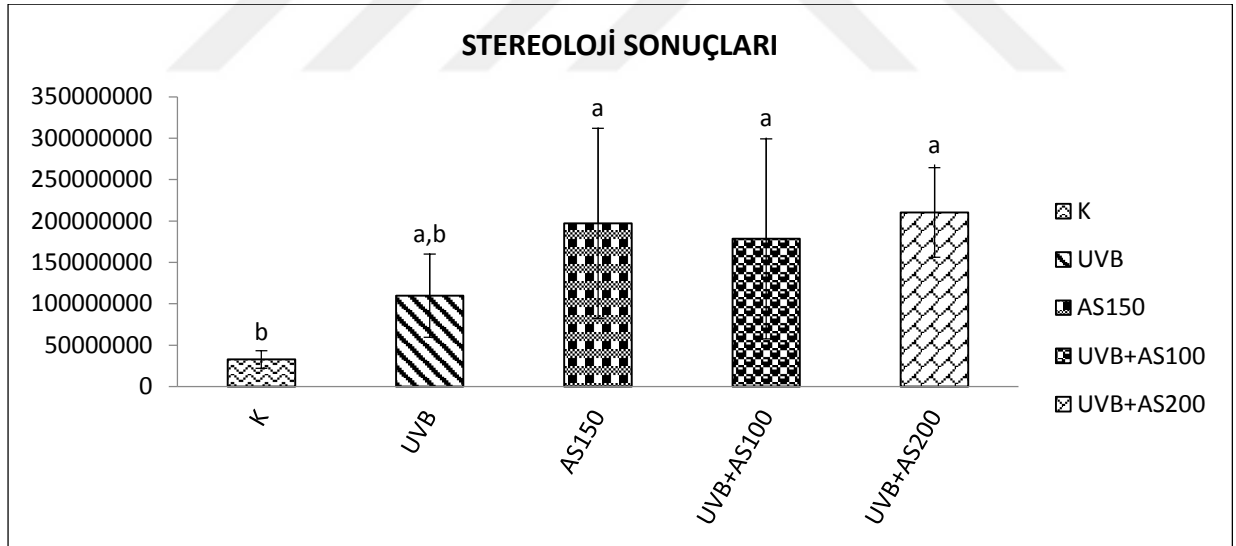
GRUP ADI	SIÇAN NO	DAMAR NOKTALAR	CE	CV	DAMAR VOLÜM	CV
K	1	129	0.095	0.29565	825600	0.29619
	2	48	0.153		307200	
	3	113	0.098		723200	
	4	73	0.118		467200	
	5	102	0.105		652800	
	6	80	0.113		512000	
UVB	1	547	0.046	0.41772	3500800	0.41841
	2	233	0.067		1491200	
	3	263	0.069		1683200	
	4	339	0.060		2169600	
	5	130	0.089		832000	
	6	315	0.057		2016000	
UVB+AS₁₅₀	1	1166	0.043	0.53144	7462400	0.53144
	2	427	0.032		2732800	
	3	373	0.049		2387200	
	4	443	0.053		2835200	
	5	286	0.048		1830400	
	6	593	0.059		3795200	
UVB+AS₁₀₀	1	403	0.054	0.61734	2579200	0.61775
	2	674	0.044		4313600	
	3	1098	0.034		7027200	
	4	239	0.066		1529600	
	5	265	0.062		1696000	
	6	295	0.062		1888000	
UVB+AS₂₀₀	1	813	0.036	0.20943	5203200	0.20955
	2	396	0.053		2534400	
	3	603	0.043		3859200	
	4	569	0.043		3641600	
	5	540	0.045		3456000	

Çalışmamızda Stereoloji sonuçlarının CV değerleri hesaplanarak birey sayısına bağlı yeterlilik belirlenmiştir. Belirlenen bu yeterlilik çalışmamızın güvenilirliğini arttırmıştır.

Tablo 7. Deri dokusunda stereolojik damar hacmi (μm^3) sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

S T E R E O L O J İ	Grup	Medyan	Ortalama	St. Sap.	Min.	Mak.	P
	K	32760000 b	32700000	10609723.84	17280000	46440000	0.006
	UVB	104040000 ab	109620000	50243284.92	46800000	196920000	
	AS ₁₅₀	156600000 a	197280000	114848915.01	102960000	419760000	
	UVB+AS ₁₀₀	125640000 a	178440000	120752751.02	86040000	395280000	
	UVB+AS ₂₀₀	204840000 a	210312000	54091961.69	142560000	292680000	

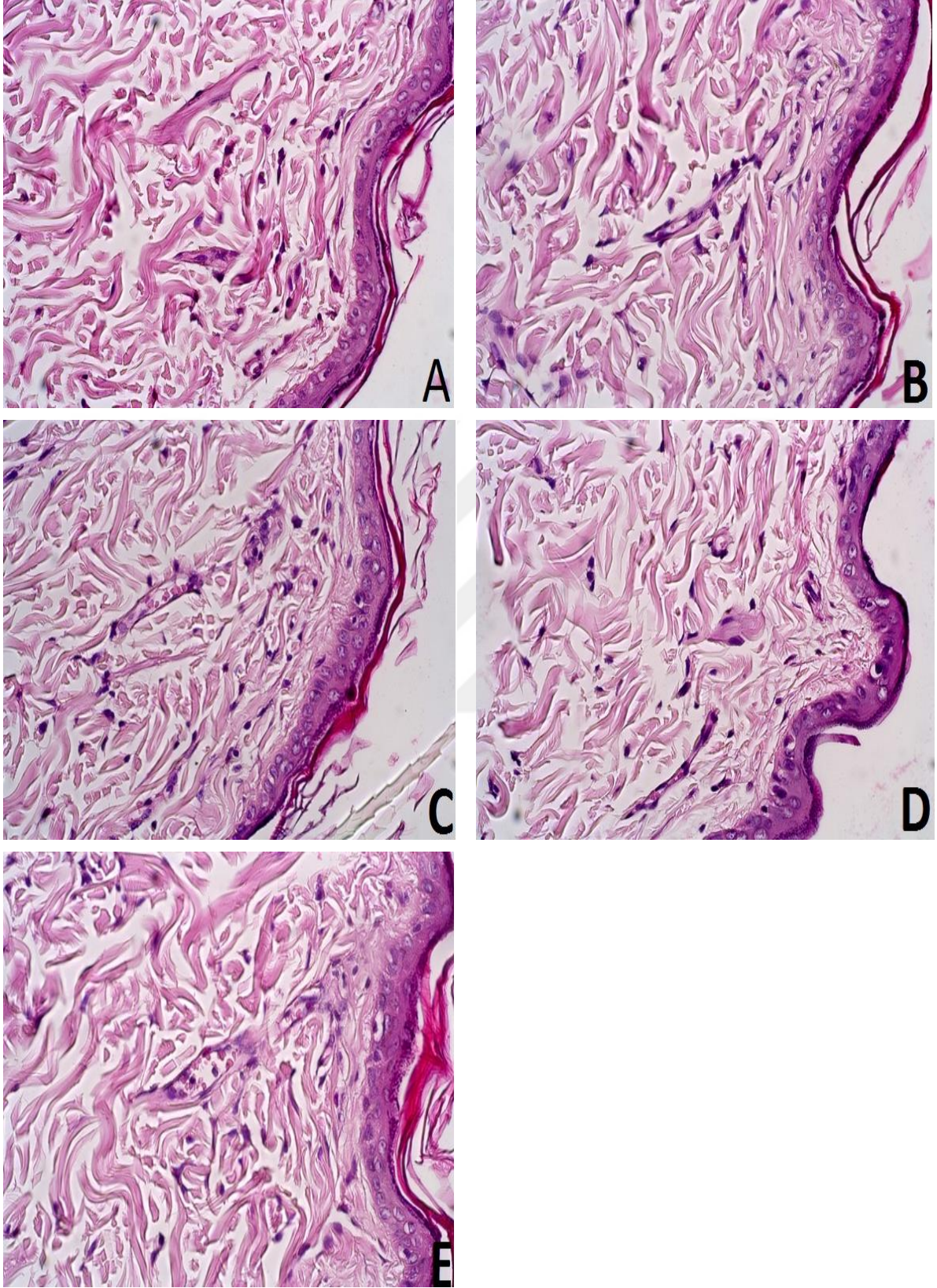
$p < 0.05$ ise gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 17. Deri dokusunun stereoloji değerlerinin grafiği. Birim: μm^3 (**a:** K grubuna göre fark anlamlıdır, **b:** AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarına göre fark anlamlıdır.)

Stereoloji değerleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında UVB grubunda K'ya göre artış, AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre artış görülmektedir (Şekil 17).

4.5. Stereoloji Resimleri



Şekil 18. Doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri (H&E Obj X 40: A-E) (A) K; (B) UVB; (C) UVB + AS₁₅₀; (D) UVB + AS₁₀₀; (E) UVB + AS₂₀₀.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Güneş dünya yüzeyinde 200-400 nm dalga boylarında, geniş spektrumda UV ışını yayar. Bu ışınlar UVA, UVB ve UVC olmak üzere üç spektrumda izlenir. UVC; 200-280 nm dalga boylarındaki güneş ışınıdır. Karsinojenik olup statosferdeki moleküler oksijen tabakası ve ozon tabakası tarafından asorbe edilerek yeryüzüne ulaşması engellenirken, ozon tabakasının incelmesi ve delinmesi UVC ile ilgili endişeleri artırmaktadır. UVB; 280-320 nm, UVA; 320-400 nm dalga boylarındaki güneş ışınlarıdır. UVB ışınının büyük miktarı statosferdeki moleküler oksijen tabakası ve ozon tabakası tarafından absorbe edilirken, UVA ışını bu tabakalar tarafından absorbe edilmez. Enerjisi en yüksek olan ışın UVC olup, daha sonra sırasıyla UVB ve UVA'dır. Dalga boyu arttıkça UV ışınlarının dokulara penetrasyonu artmaktadır. Günümüzde insanların yaşantıları gereği güneş ışınları ile temas süreleri uzamıştır. Yanlış güneşlenme alışkanlıkları, ozon tabakasının incelmesi ve delinmesi ile UV ışınlarının güneş yanığı, deri yaşlanması, immünsüpresyon ve deri kanserleri oluşturma gibi istenmeyen etkilerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu etkilerden en önemlisi insan vücudunun immünolojik mekanizmalarını etkileyerek, genlerde oluşturdıkları mutasyonlar ile deri kanserlerine sebep olmalarıdır (Akkayave Erturan; 2004). Çalışmamızda AS'nin UVB uygulanmış sıçanların deri dokusu üzerindeki koruyucu etkisi sözkonusu dokuya ait TAS, TOS, OSI değerleri izlenerek ve ayrıca stereolojik yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Buna ilaveten kan dokusunda AS'nin antiapoptotik ve antigenotoksik etkisi de araştırılmıştır. Bulgular aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda K grubu ile mukayese edildiğinde UVB verilen gruplarda TAS istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmüştür. Bu durum literatürle de uyumludur (Saeed ve Salmo, 2012). TAS'ın düşmesinin nedeni UVB'nin ROS'u arttırması olabilir (Piao ve ark., 2015). TAS seviyesinde sadece AS₁₅₀ grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Shidfar ve ark. (2015)'ın yapmış olduğu çalışmada da AS'nin TAS seviyesini anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir. Bu artışın nedeninin AS'nin antioksidan etki göstermesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü Cavuşoğlu ve ark. (2011) AS'nin antioksidan aktivite gösterdiğini bildirilmiştir. Bu da bizim çalışmamızla uyumludur (Tablo 3, Şekil 12). AS'nin tedavi amaçlı UVB ile birlikte verildiği gruplar sadece UVB'nin verildiği grupla kıyaslandığında TAS seviyesinde anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir artış görülmüştür (Tablo 3, Şekil 12).

Şekil 13'ye göre UVB grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede yüksektir (Tablo 3). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak daha önce yapılan bazı çalışmalarda da UVB radyasyonunun TOS'u arttırdığı bildirilmiştir (Pektas ve ark., 2013). Bunun nedeni olarak UVB'nin oksidatif strese neden olması gösterilebilir (Sırerol ve ark., 2015). AS₁₅₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler görülmüştür (Tablo 3, Şekil 14). TOS seviyesindeki bu düşüş ulaşabildiğimiz literatür çalışmalarına göre ilk kez bizim çalışmamızda tespit edilmiştir. Bunun nedenini AS'nin oksidatif stresi azaltması olabilir. Pourmoradian ve ark. (2014)'ın yaptıkları çalışma da AS'nin oksidatif stresi azalttığı sonucunu desteklemektedir.

OSI değerleri bakımından ise gruplar karşılaştırıldığında UVB grubunda K'ya göre anlamlı bir artış görülmektedir. Literatürde de bununla uyumlu çalışmalar yapılmıştır (Pektas ve ark., 2013). UVB'nin ROS'u arttırması OSI'nin artmasına neden olmuş olabilir (Wu ve ark., 2015). AS₁₅₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler görülmektedir (Tablo 3, Şekil 14). Bunun nedeni ise büyük olasılıkla AS'nin antioksidan özellik göstermesidir (Delkhoshe Kasmaie ve ark., 2014).

Şekil 15'e göre UVB grubuna ait comet assay sonucu diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede yüksektir (Tablo 4). Bu sonuç literatürle de uyumludur (Janjetovic ve ark., 2014). Calo ve ark. (2015)'ın yaptığı çalışmada da bu sonuç artmıştır. Bu durumun UVB'nin DNA hasarına yol açmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ryu ve ark. (2015)'ın yaptığı çalışmada da UVB radyasyonunun DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. AS₁₅₀, UVB + AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler görülmektedir. AS'nin sebep olduğu bu düşüş ulaşabildiğimiz literatür çalışmalarına göre ilk kez bizim çalışmamızda tespit edilmiştir. AS'nin genotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Cavuşoğlu ve ark., 2009). Tablo 4 ve Şekil 15 de bu durumu desteklemektedir.

p53 geni hem tümör baskılayıcı hem de apoptoz yöneticisi olarak görev yapmaktadır (Oltvai ve Korsmeyer, 1994). Gelişmekte olan hücrelerde DNA hasarı ortaya çıktığında, hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktadır (Barr ve Tomei, 1994; Bellamy ve ark., 1995). Bu fazda hücre DNA onarım yoluna gider. Hasar çok büyükse hücre intihar eder. p53 işlevinin yetersiz olduğu hücrelerde apoptoz gerçekleşmeden veya DNA onarımı tamamlanmadan DNA çiftleşmesi ile neoplasi gelişebilir (Lane, 1994; Symonds, ve ark., 1994). Çalışmamızda kan

dokusunun apoptozis görüntüleri (Şekil 16) analiz edildiğinde K grubuna ait 13-14 nolu bantlarda neredeyse hiç DNA kırığı olmadığı görülmektedir. Aynı zamanda UVB verilmeyen AS₁₅₀ grubuna ait 4-6 nolu bantlarda da çok az DNA kırığına rastlanmıştır. Sadece UVB'nin uygulandığı gruba ait bantlarda (10-12) kırık sayısı en fazla olmuştur. Bu durumun nedeni büyük ihtimalle UVB'nin apoptozu artırmasıdır (Ubels ve ark., 2015, Büyük ve ark., 2012). UVB + AS 100 mg/kg ve UVB + AS 200 mg/kg gruplarına ait 1-3 ve 7-9 nolu bantlarda ise hasarın tedavi edildiği yani UVB grubuna göre kırıkların azaldığı tesbit edilmiştir. UVB + AS 100 mg/kg ve UVB + AS 200 mg/kg gruplarında UVB grubuna göre kırıkların daha az olmasının nedeninin oluşan serbest radikallere karşı AS'nin antioksidan özellik göstermesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca Valiollahpoor Amiri ve ark. (2015)'ın yaptığı bir çalışmada da AS'nin antiapoptotik özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Stereolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlarda UVB grubunda K grubuna göre vazodilatasyona bağlı damar yoğunluğunda artış gözlenmiştir (Tablo 7, Şekil 18). Bu sonuç literatürle de uyumludur (Gonzalez ve ark., 2015). Ayrıca bizim çalışmamıza uyumlu olarak daha önce yapılan başka bir çalışmada da UV ve sıcaklık maruziyetinin deride vasküler dilatasyona sebep olduğu bildirilmiştir (Ozkol ve ark., 2015). AS₁₅₀, UVB+AS₁₀₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarında ise damar yoğunluğunun UVB grubuna göre daha fazla arttığı tespit edilmiştir. Bu artış verilen AS miktarıyla doğru orantılıdır (Tablo 7, Şekil 18). Bu sonuç, ölçtüğümüz diğer parametrelerle de uyduğundan, AS'nin vazodilatasyonu daha fazla arttırmasının tedavi yönünde bir artış olduğunu düşünmekteyiz. AS'nin vazodilatasyona sebep olduğu Aslan ve ark. (2012)'ın yaptığı bir çalışmada da bildirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma AS ile yapılan tedavinin UVB'nin neden olduğu hasarı azalttığını ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Zorer B. Albino Sıçanlarda Ultraviyole B ile İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Arı Sütünün Antiapoptotik, Antigenotoksik ve Antioksidan Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2016. Yapılan önceki bazı çalışmalarda ultraviyole B (UVB) radyasyonunun oksidatif stres ve DNA hasarına neden olduğu, arı sütünün (AS) ise antioksidan özellik gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan UVB hasarına karşı AS'nin farklı dozlardaki tedavi etkinliğini literatüre göre ilk kez araştırıldı. Bu amaçla, oksidatif stres, genotoksisite ve apoptozda meydana gelen değişiklikler stereolojik inceleme ile birlikte değerlendirildi. Herbiri 6 Wistar türü albino erkek sıçandan oluşan 5 grup oluşturuldu. Bu gruplar kontrol (K), UVB, AS 150 mg/kg (AS₁₅₀), UVB+AS 100 mg/kg (UVB + AS₁₀₀) ve UVB+AS 200 mg/kg (UVB+AS₂₀₀) olarak isimlendirildi. UVB, UVB+AS₁₀₀ ve UVB+AS₂₀₀ grubundaki hayvanlar 30 gün boyunca günde 2 saat süreyle UVB ışınına maruz bırakıldı. AS₁₅₀, UVB+AS₁₀₀ ve UVB + AS₂₀₀ grubundaki hayvanlara ise 30 gün boyunca gün aşırı olarak sırasıyla 150, 100 ve 200 mg/kg arı sütü verildi. Bütün hayvanlar otuzuncu günde sakrifiye edildi. Analizler için kan ve deri dokuları alındı. UVB grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.01$) yükseldi. AS verilen gruplarda ise UVB grubuna göre TOS değerinde anlamlı derecede ($p<0.01$) düşüşler saptandı. K grubu ile mukayese edildiğinde UVB grubunda TAS istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.01$) düşerken, AS₁₅₀ grubunda tekrardan anlamlı ($p<0.01$) olarak artmıştır. OSI değerine gelince, UVB grubunda K'ya göre anlamlı ($p<0.001$) bir artış, AS₁₅₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarında ise UVB grubuna göre anlamlı düşüşler ($p<0.001$) görülmüştür. Çalışmamızın apoptoz görüntüsü analiz edildiğinde K ve AS₁₅₀ gruplarında DNA kırığının az olduğu, UVB hasarı oluşturulan gruplarda ise DNA kırıklarının arttığı görülmüştür. UVB+ AS₁₀₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarında ise kırıkların olduğu ancak UVB grubuna göre kırıkların azaldığı tesbit edilmiştir. UVB grubuna ait comet assay analiz sonucu diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.001$) yüksekti. Bu analizin sonucu AS'nin uygulandığı bütün gruplarda çarpıcı şekilde ($p<0.001$) düşmüştür. Stereoloji değerleri (hacim fraksiyonu) bakımından gruplar karşılaştırıldığında UVB grubunda K'ya göre artış, AS₁₅₀, UVB+AS₁₀₀ ve UVB+AS₂₀₀ gruplarına göre ise azalış görülmektedir. Bu çalışma, arı sütünün UVB hasarının tedavisinde faydalı olabildiğini ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Sıçan, Apoptoz, Genotoksisite, Oksidatif stres, UVB, Arı sütü, Stereoloji

SUMMARY

Zorer B. Investigation on the Antiapoptotic, Antigenotoxic and Antioxidant Effects of Royal Jelly by Molecular, Biochemical and Stereological Methods in Ultraviolet B-induced Skin Damage Model of Albino Rats. Yuzuncu Yil University Institute of Health Sciences, Department of Histology-Embryology Master Thesis, Van, 2016. Ultraviolet B (UVB) was reported to cause oxidative stress, DNA damage and royal jelly (RJ) was informed to exhibit antioxidant feature in some previous studies. In this study, for the first in the literature, treatment effectiveness of different doses of RJ was investigated against experimentally formed UVB damage. For this purpose, changes which occurred in oxidative stress, genotoxicity and apoptosis were evaluated together with stereological examination. Five equal groups were constituted each including 6 Wistar albino rats. These groups were named as control (C), UVB, RJ 150 mg/kg (RJ₁₅₀), UVB+RJ 100 mg/kg (UVB+RJ₁₀₀) and UVB+RJ 200 mg/kg (UVB+RJ₂₀₀). The animals of UVB, UVB+RJ₁₀₀ and UVB+RJ₂₀₀ groups were exposed to UVB radiation for 2 hours once a day during 30 days. RJ was given to rats of RJ₁₅₀, UVB+RJ₁₀₀ and UVB+RJ₂₀₀ groups at 150, 100 and 200 mg/kg doses respectively. All animals were sacrificed on the 30th day. Blood and skin samples were taken for analysis. TOS level of group UVB was significantly ($p<0.01$) higher compared to all other groups. Marked ($p<0.01$) decreases of TOS were determined in RJ treated groups comparing to UVB group. When compared with C group, TAS level decreased dramatically ($p<0.01$) in UVB group whereas significantly ($p<0.01$) increased again in RJ₁₅₀ group. With regard to OSI value, its significant ($p<0.001$) increase was seen in UVB group compared to C and its marked ($p<0.001$) decrease was seen in RJ₁₅₀ and UVB+RJ₂₀₀ groups compared to UVB group. When apoptotic image of our study is analyzed, less DNA fracture was seen in C and RJ₁₅₀ groups whereas increased DNA fracture was seen in groups where UVB damage was formed. Decrement of DNA fracture was determined in UVB+RJ₁₀₀ and UVB+RJ₂₀₀ groups compared to UVB. Comet assay analyze result of UVB group was significantly ($p<0.001$) higher than those of all other groups. This result was markedly ($p<0.001$) lower in all RJ treated groups compared to UVB group. When stereological values (volume fraction) were evaluated, a dramatical ($p<0.001$) increment was seen in UVA group compared to C. This study revealed that RJ could be beneficial in the treatment of UVB damage. Further studies are needed to verify results of this study.

Key words: Rat, Apoptosis, Genotoxicity, Oxidative stress, UVB, Royal jelly, Stereology

KAYNAKLAR

- Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z (1995). UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 44, 26071-26077.
- Afag F, Mukhtar H (2001). Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways, *Journal Photochem Photobiol B*, 63, 61-69.
- Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2002). Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis, *Front Biosci*, 7, 784-792.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense?, *Journal of Clinical Investigation*, 77, 319-321.
- Agrawal A, Chandra D, Kale RK (2001). Radiation induced oxidative stress: II Studies in liver as adistant organ of tumor bearing mice, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 224, 1-2.
- Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1-132.
- Akkaya VB, Erturan İ (2004). Güneşten Koruyucuların İmmün Fonksiyonlar Üzerine Etkileri, *Türkiye Klinikleri Journal of Cosmetology*, 5, 4, 167-172.
- Altunkaynak BZ, Özbek E (2008). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 2, 93-104.
- Ananthaswamy HN, Pierceall WE (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis, *Photochem Photobiol*, 52, 17, 1119-1136.
- Arabacı H, Çukuçayır F, Ekici M, Aksoy B (2003). Ultraviyole B radyasyonu, Online: <http://www.meteor.gov.tr>.
- Aruoma OI (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *American Oil Chemists Society*, 75, 199-212.
- Aslan A, Cemek M, Buyukokuroglu ME, Altunbas K, Bas O, Yurumez Y (2012). Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits, *Food Chemical Toxicol*, 50, 7, 2554-2559.

Ayçiçek A, Erel Ö, Kocyigit A (2005). Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking, *European Journal of Pediatrics*, 164, 775-778.

Azab KS, Bashandy M, Salem M, Ahmed O, Tawfik Z, Helal H (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats, *International Journal of Medical Sciences*, 3, 6, 268-276.

Barr PJ, Tomei LD (1994). Apoptosis and its role in human disease, *Bio/Technology*, 12, 487-493.

Barbor DA, Harris SR (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: A review, *American Pharmacy*, 34, 9, 26-35.

Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis, *Semin Cancer Biology*, 6, 3-16.

Berglund CM, Radesater AC, Persson MA, Budd Haeberlein SL (2004). UV induced apoptosis in SH-SY5Y cells: contribution to apoptosis by JNK signaling and cytochrome c, *Journal of Neuroscience Research*, 78, 4, 580-589.

Bishop ML, Janet LP (1996). Free Radicals in Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations.3rd ed. Philadelphia, New York, 765-777.

Bölükbaş C, Bölükbaş FF, Horoz M, Aslan M, Çelik E, Erel Ö (2005). Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection, *BioMed Central Infectious Diseases*, 31, 5, 95.

Büyük İ, Soydam AS, Aras S (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69, 97- 110.

Calò R, Visone CM, Marabini L (2015). Thymol and Thymus Vulgaris L. activity against UVA and UVB induced damage in NCTC 2544 cell line, *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 791, 30-37.

Carson DA, Ribeiro JA (1993). Apoptosis and disease, *Lancet*, 341, 1251-1254.

Cavuşoğlu K, Yapar K, Yalçın E (2009). Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice, *Journal of Medicinal Food*, 12, 6, 1286-1292.

Cavuşoğlu K, Yapar K, Oruç E, Yalçın E (2011). The protective effect of royal jelly on chronic lambda-cyhalothrin toxicity: serum biochemical parameters, lipid peroxidation, and genotoxic and histopathological alterations in swiss albino mice, *Journal of Medicinal Food*, 14, 10, 1229-1237.

Ceyhan A, Günel S, Çıkan T, Bababalım M, Ünal N (1996). Serbest radikaller ve anestezi, *Sendrom*, 65-69.

Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to tree radical biochemistry, *British Medical Bulletin*, 49, 3, 479-480.

Compton MM, Cidlowski JA (1986). Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid, *Endocrinology*, 118, 1, 38-45.

Conroy LA, Alexander DR (1996). The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis, *Leukemia*, 10, 9, 1422-1435.

Cowie MR (2002). Coronary Risk-Time For a More Sophisticated Approach, *European Heart Journal*, 23, 589-591.

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI (1997). Apoptosis, *American Journal of Surgical Pathology*, 21, 1, 88-101.

DelkhosheKasmaie F, Malekinejad H, Khoramjouy M, Rezaei Golmisheh A, JanbazeAcyabar H (2014). Royal jelly protects from taxol-induced testicular damages via improvement of antioxidant status and up-regulation of E2f1, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60, 2, 80-88.

Duthie MS, Kimber I, Norval M (1999). The effects of ultraviolet radiation on the human immune system, *British Association of Dermatologists*, 140, 995-1009.

Ediz L, Hız Ö, Özkol H, Gülcü E, Toprak M, Ceylan MF (2011). Relationship between anti-CCP antibodies and oxidant and anti-oxidant activity in patients with rheumatoid arthritis, *International Journal of Medical Sciences*, 8, 2, 139-147.

Eisenstark A (1989). Bacterial genes involved in response to near-ultraviolet radiation, *Advances in Genetics*, 26, 48, 99-147.

Ekici M, Acar Y (2003). UV- B radyasyon ve etkileri. Meteoroloji Genel Müdürlüğü Web Sitesi, <http://www.meteor.gov.tr/arge/ozon/>.

Erdoğan BB (2003). Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis, *Akciğer Arşivi*, 4, 165-174.

Erel Ö (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, 37, 277-285.

Erel Ö (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-1111.

Eroschenko VP (2008). *diFiore Histoloji Atlası*, Palme yayıncılık, 10. Baskı, Ankara 186-193.

Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö (2001). Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi, *Cerrahi Tıp Bülteni*, 2, 4, 154-167.

Esselty CB (2000). In cholesterol lowering, moderation kills, *Cleve Clin J Med*, 67, 8, 560-564.

Ferner H (1974). *Sobotta İnsan Anatomi Atlası*, 3. Cilt, Berlin 191.

Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K (1999). *Dermatology in general medicine*, Ed. 5th ed. McGraw-Hill, New York.

Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, et al. (1990). Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*;53, 331-337.

Gill RF, Coohill TP (1987). A comparison of mammalian cell sensitivity to either 254 nm or artificial "solar" simulated radiation, *Photochem Photobiol*, 45(2), 264-271.

Girotti AW (2000). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *Journal of Lipid Research*, 39, 1529-1542.

Goihman-Yahr M (1996). Skin Aging and Photoaging, *Clinical Dermatology*, 14, 153-160.

Goldsmith LA (1990). My organ is bigger than your organ, *Archives of Dermatological Research*, 126-301.

Gonzalez VC, Beheregaray AC, Peres BM, Sallis ES, Varela Junior AS, Trindade GS (2015). Histopathological Analysis of UVB and IR Interaction in Rat Skin, *Photochem Photobiol*, 91, 4, 895-900.

Greenwald RA(1991). Oxygen radicals, inflammation and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatments, *Seminars in Arthritis and Rheum*, 20, 4, 219-240.

Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chemico-biological Interactions*, 91, 133-140.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1992). Free Radicals in Biology and Medicine, second ed, Clarendon Press, Oxford, 12, 1, 93-95.

Hawk JIM (1992). Cutaneous photobiology, Chapter 21, in: Rook, Williams-Ebling, *Textbook of Dermatology*.

Hayes JD, Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 445-600.

Hikim APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S (1995). Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment, *Endocrinology*, 136, 6, 2770-2775.

Hockenbery D (1995). Defining apoptosis, *American Journal of Surgical Pathology*, 146, 1, 16-19.

Hollingworth RM, Dong K (2008). The Biochemical and Molecular Genetic Basis of Resistance to Pesticides in Arthropods: Global Pesticide Resistance in Arthropods, Cromwell, UK, 40-90.

Hom DB (1998). Wound healing in relation to scarring, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 6-11.

Howard H (1990). Effects of ultraviolet radiation, *Medical clinics of North America*, 74, 2, 509-514.

Janjetovic Z, Nahmias ZP, Hanna S, Jarrett SG, Kim TK, Reiter RJ, Slominski AT (2014). Melatonin and its metabolites ameliorate ultraviolet B-induced damage in human epidermal keratinocytes, *Journal of Pineal Research*, 57, 1, 90-102.

Jena B, Kaul CL, Ramarao P (2002). Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement For drug Discovery and Development: Impact of ICH Guidelines, *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 86-99.

Junqueira LC, Carneiro J (2009). Temel Histoloji, 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 360-372.

Kamb A (1994). Sun protection factor p53, *Nature*, 372, 730-731.

Kane AB (1995). Redefining cell death, *American Journal of Surgical Pathology*, 146, 1, 1-2.

Karaduman A (1999). Solar radyasyon ve deri üzerine etkileri, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 7, 8.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994). Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73, 8, 2013-2026.

Kılınç K (1985). Serbest Oksijen Radikallerinin Biyokimyasal Etkileri ve Metabolizması, *Biyokimya Dergisi*, 2, 60-89.

Korkmaz A, Ayas B, Bahadır A, Yıldırım Ş (2002). Uygulamalı Stereoloji Kursu Dökümanları ve Uygulama Rehberi, 1-14.

Koya Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M (2004). Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism, *Biosci Biotechnol Biochem*, 68, 767-773.

Kösecik M, Erel Ö, Sevinç E, Selek S (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking, *international journal of cardiology*, 100, 61-64.

Kramer PJ (1998). Genetic Toxicology, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 395-405.

Kulms D, Schwarz T (2002). Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis, *Biochem Pharmacol*, 64, 5-6, 837-841.

Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA (1994). The role of p53 in the apoptotic response. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 345, 277-280.

Levine SA, Kidd PM (1986). Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology. Biocurrents Division. Allergy Research Group, San Leandro, California, 376.

Madronich S, De Gruijl FR (1993). Skin cancer and UV radiation, 366.

Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *American Journal of Surgical Pathology*, 146, 1, 3-15.

Mak T (2003). The E. Donnall Thomas Lecture-apoptosis: "'tis death that makes life live", *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 9, 8, 483-488.

Mannervik B, Awashi Y, Board P, Hayes J, Dilio C, Ketterer B (1992). Nomenclature for human glutathione S transferase, *Biochemical Journal*, 282, 305-308.

Mantle T, McCusker F, Phillips M, Boyer S (1990). Glutathione S-transferases, *Isoenzymes*, 18, 175-177.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery, *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 26-30.

Mason RP (1999). Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential, *Cancer*, 85, 10, 2093-2102.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry*, 32, 8, 595-603.

Meyer LM, So derberg P, Dong X, Wegener A (2005). UVR-B induced cataract development in C57 mice, *Experimental Eye Research*, 81, 389–394.

McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte, *Journal Biology Chemistry*, 244, 6049-6055.

McCord J (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance, *Clinical Biochemistry*, 26, 351-357.

McPhie DL, Coopersmith R, Peralta AH, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL (2003). DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3, *The Journal of Neuroscience*, 23, 17, 6914–6927.

Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca J V, Alperi JD (2006). Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants, *Arch Gerontol Geriatr*, 42, 3, 289-306.

Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ (2005). Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma, *European Respiratory Journal*, 26, 257-264.

Morrow LO, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts L (1991). Formation of unique biologically active prostaglandins in vivo by a noncyclooxygenase free radical and catalyzed mechanism, *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 21, 125-128.

Mutlu B, Toros H, Şen O(2003). Ultraviyole radyasyonunun insan sağlığı üzerine etkileri, *III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu*, 19-21 Mart, İTÜ, İstanbul.

Nakano A, Koyama I, Matsunaga T, Nakajima T, Hirose H, Sato M, Komoda T (1999). Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose, *Rinsho Byori*, 7, 676-681.

Ono M, Sekiya C, Ohhira M, Namiki M, Endo Y, Suzuki K, Matsuda Y, Taniguchi N (1991). Elevated level of serum Mn-SOD in patients with primary biliary cirrhosis: possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 118, 5, 477-483.

Olson RL, Everett MA (1975). Epidermal apoptosis: cell deletion by phagocytosis, *Journal of Cutaneous Pathology*, 2, 53-57.

Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994). Checkpoints on dueling dimers foil death wishes, *Cell*, 79, 189-192.

Ozkol HU, Calka O, Akdeniz N, Baskan E, Ozkol H (2015). Rosacea and exposure to tandoor heat: Is there an association? *International Journal of Dermatology*, Jul 14.

Özkol H, Musa D, Tülüce Y, Koyuncu I (2012). Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma, *Drug and Chemical Toxicology*, 35, 3, 251-257.

Özkol H, Tuluçe Y, Dilsiz N, Koyuncu I (2013). Therapeutic potential of some plant extracts used in Turkish traditional medicine on streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats, *Journal of Membrane Biology*, 246, 1, 47-55.

Pektas SD, Akoglu G, Metin A, Neselioglu S, Erel O (2013). Evaluation of systemic oxidant/antioxidant status and paraoxonase 1 enzyme activities in psoriatic patients treated by narrow band ultraviolet B phototherapy, *Redox Report*, 18, 5, 200-204.

Piao MJ, Susara Ruwan Kumara MH, Kim KC, Kang KA, Kang HK, Lee NH, Hyun JW (2015). Diphenylmethoxyhydroxycarmalol Suppresses Ultraviolet B-Induced Matrix Metalloproteinases via Inhibition of JNK and ERK Signaling in Human Keratinocytes, *Biomolecules Therapeutics (Seoul)*, 23, 6, 557-563.

Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD (1977). Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 16, 932–939.

Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M (2014). Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial, *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 20, 5, 347-352.

Ribeiro JM, Carson DA (1993). $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis, *Biochemistry*, 32, 35, 9129-9136.

Romay C, Pascual C, Lissi EA (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples, *Brazilian Journal Of Medical and Biological*, 29, 175-183.

Ryu B, Ahn BN, Kang KH, Kim YS, Li YX, Kong CS, Kim SK, Kim DG (2015). Dioxinohydroxyethyl protects human keratinocyte cells from UVB-induced apoptosis modulated by related genes Bax/Bcl-2 and caspase pathway, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 153, 352-357.

Saeed AK, Salmo N (2012). Epidermal growth factor receptor expression in mice skin upon ultraviolet B exposure - Seborrheic Keratosis as a coincidental and unique finding, *Advanced Biomedical Research*, 1, 59.

Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993). Wavelengths effective in induction of Malignant Melanoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 6666–6670.

Shidfar F, Jazayeri S, Mousavi SN, Malek M, Hosseini AF, Khoshpey B (2015). Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients? , *Iranian Journal of Public Health*, 44, 6, 797-803.

Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Boligon AA, Walker CI, Klafke JZ, Oliveira SM, Silva CR, Athayde ML, Ferreira J (2014). Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats, *Journal Photochemistry Photobiol B*, 133, 47-54.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease, *British journal of hospital medicine*, 43, 334-344

Singh NP, Stephens RE, Schneider EL (1994). Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *International Journal of Radiation Biology*, 66, 23–28.

Sirerol JA, Feddi F, Mena S, Rodriguez ML, Sirera P, Aupí M, Pérez S, AsensiM, Ortega A, Estrela JM (2015). Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis, *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 1-11.

Soderberg PG (1988). Acute cataract in the rat after exposure to radiation in the 300 nm wavelength region. A study of the macro-, micro- and ultrastructure, *Acta Ophthalmologica (Copenh)*, 66, 141–152.

Sözmen EY (1997). Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri, Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir. ED. T. Onat. 1.Baskı, 521-528.

Svobodova A, Psotova J, Walterova D (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. a review, *Biomed*, 147, 2, 137-145.

Svobodova AR, Galandakova A, Sianska J, Dolezal D, Ulrichova J, Vostalova J (2011). Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 4, 471-479.

Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo, *Cell*, 78, 703-711.

Tebbe B (2001). Relevance of oral supplementation with antioxidant for prevention and Treatment of Skin Disorders, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14, 296-302.

Tülüce Y, Özkol H, Koyuncu I (2012). Photoprotective effect of flax seed oil (*Linum usitatissimum* L.) against ultraviolet C-induced apoptosis and oxidative stress in rats, *Toxicol Ind Health*, 28, 2, 99-107.

Ubels JL, Glupker CD, Schotanus MP, Haarsma LD (2015). Involvement of the extrinsic and intrinsic pathways in ultraviolet B-induced apoptosis of corneal epithelial cells, *Experimental Eye Research*, 145, 26-35.

Umemura U, Yokota K (1997). Effectiveness of a healthy education class to increase fish intake evaluated by serum fatty acids compositions, *Nippon Kosho Eisei Zasshi*, 44, 12, 901-909.

Urso ML, Clarkson PM (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation, *Toxicol*, 189, 41-54.

Uysal M (1998). Serbest Radikaller, Lipid Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar, *Klinik Gelişim II*, 336-341.

Vince P (1999). Antioxidant Potential of Vitamin A and Carotenoids and Their Revelence to Heart Disease, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 746-761.

Weedon D, Searle J, Kerr JFR (1979). Apoptosis: its nature and implications for dermatopathology, *American Journal of Dermatopathology*, 1, 133-144.

Wintrobe M, Thorn G (1976). Harrisons’’s Priciples of Internal Medicine, Menteş Kitapevi, 385.

Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Shi W, Furue M (2015). Z-ligustilide amelioratedultraviolet B-induced oxidative stress and inflammatory cytokine production inhuman keratinocytes through upregulation of Nrf2/HO-1 and suppression of NF-κBpathway. *Experimental Dermatology*, 24, 9, 703-708.

Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G (1992). The apoptosis endonuclease and its regulation, *Semin Immunol*, 4, 6, 389-397.

Yang XY, Yang DS, Wei-Zhang (2010). 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: A potential medicine for RA, *Journal Ethnopharmacol*, 128, 314–321.

Yazıcı C, Köse K (2004). Melatonin: karanlığın antioksidan gücü, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13,2, 56-65.

Zhou FQ (2001). Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions, *Acta Pharmacol Sin*, 5, 385-392.

Ziegler A, Jonason AS, Lefell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer, *Nature*, 372, 773-776.

<http://www.anagen.net/rali.htm>

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Siirt'in Baykan ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Van'da tamamladı. 2010 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinde hemşire olarak çalıştı.



EKLER

Ek 1: Etik kurul raporu





T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı	Albino Ratlarda Ultraviyole B ile İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Arı Sütünün Antiapoptotik, Antigenotoksik ve Antioksidan Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması
Title of the Research	Investigation on the Antiapoptotic, Antigenotoxic and Antioxidant Effects of Royal Jelly by Molecular, Biochemical and Stereological Methods in Ultraviolet B Induced Skin Damage Model of Albino Rats.
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Doç.Dr.Halil ÖZKOL / Assoc.Prof.Dr.Halil ÖZKOL Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Prof. Dr. M. Çetin RAĞBETLİ, Doç. Dr. Yasin TULÜCE, Doç. Dr. Hatice Uce ÖZKOL, Burcu ZORER
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date: 20.06.2014	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date: 21.12.2015	
Proje Süresi / Total Time of Project: 1 ay	
Proje No / Project Number: 2014-SBE-YL162	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available): YYÜ, BAP	
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding: 11,000.00 TL	
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28/01/2016 tarih ve 2016/01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 28/01/2016 (decision number 2016/01).	
Başkan / Chair Prof. Dr. Semiha DEDE	
Üyeler/Members	
Prof. Dr. Duran BOLAT	Prof. Dr. Sıddık KESKİN
Prof. Dr. Fazıl ŞEN	Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Doç. Dr. Şenol GÜZEL	Doç. Dr. Nalan ÖZDAL
Doç. Dr. M. Fatih GARÇA	Doç. Dr. Abdülbaki AKSAKAL
Yrd. Doç. Dr. Fatih KAZANCI	Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ
Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN	Vet. Hekim İsmail Hakkı BEHÇET
Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	