

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE A İLE İNDÜKLENMİŞ
DERİ HASARI MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER VE
ERDOSTEİN'İN ANTİAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK VE
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

ESMA ZEREN
ANATOMİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

VAN - 2016

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE A İLE İNDÜKLENMİŞ
DERİ HASARI MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER VE
ERDOSTEİN'İN ANTİAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK VE
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

ESMA ZEREN
ANATOMİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

VAN - 2016

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2014-SBE-YL163
nolu proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALBİNO SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE A İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ
HASARI MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER VE ERDOSTEİN'İN
ANTIAPOPTOTİK, ANTİGENOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN
MOLEKÜLER, BİYOKİMYASAL VE STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Esmâ ZEREN
ANATOMİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ersan KALAY

İmza

Doç. Dr. Halil ÖZKOL

Üye

İmza

Yrd. Doç. Dr. Ece BURU

Üye

TEZ KABUL TARİHİ

..... / / 2016

TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı bana yüksek lisans tezi olarak veren, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran, tezimin hazırlanmasında her türlü destek ve yardımlarıyla yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Halil ÖZKOL'a, yine her türlü desteğini gördüğüm kıymetli hocam Doç. Dr. Yasin TÖLÜCE'ye, çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU'ya, tez seminerime katılarak beni onurlandıran Prof. Dr. Ersan KALAY'a, Anatomi Anabilim Dalı hocalarım Yrd. Doç. Dr. Necat KOYUN'a ve Yrd. Doç. Dr. Ece BURU'ya, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ'ye, Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN'a, istatistiksel değerlendirmeler aşamasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e, ayrıca yakın bir tarihte kaybettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Şener Atıf Aydınlioğlu'na, değerli arkadaşım Burcu ZORER'e, tezimin ve hayatımın her anında destekçim olan başta anne-babama ve bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
Teşekkür	II
İçindekiler	III
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Tablolar Listesi	VIII
Şekiller Listesi	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Derinin Anatomik Yapısı	2
2.1.1. Epidermis	3
2.1.2. Dermis	6
2.1.3. Hipodermis.....	6
2.2. Güneş Işınlığının Derideki Zararlı Etkileri	7
2.2.1. Minimal eritem doz (MED)	8
2.2.2. Güneş ışınlığındaki radyasyon	9
2.3. Ultraviyole Işınları (Mor ötesi ışınlar)	10
2.3.1. Ultraviyole A (UVA)	12
2.3.2. Ultraviyole ışınlığının deri üzerine etkileri	15
2.4. Serbest Radikaller	15
2.4.1. Serbest radikallerin kaynakları	16
2.4.2. Serbest radikallerin etkileri	18
2.4.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)	19
2.4.4. Serbest radikallerle ilişkili hastalıklar	21
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	21
2.5.1. Enzimatik antioksidanlar	22
2.5.2. Non-enzimatik antioksidanlar	24
2.6. Çalışmamızda Etkinliği Araştırılan Moleküller	26
2.6.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)	26
2.6.2. Erdosteine (ERD)	29
2.7. Çalışmamızda Takip Ettiğimiz Belirteçler	30

2.7.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSİ)	30
2.7.2. Apoptoz	30
2.7.3. Genotoksisite	34
2.8. Çalışmamızda Kullandığımız Stereolojik Yöntemler	35
2.8.1. Referans hacminin hesaplanması (Cavalieri metodu)	38
2.8.2. Hacim fraksiyonu (Yoğunluğu)	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	40
3.2. Deney Hayvanlarının Tıraşlanması	41
3.3. Etkinliği Araştırılan Moleküllerin Uygulanması	41
3.4. UVA'nın Uygulanması	42
3.5. Analizlerde Kullanılan Kit Ve Kimyasallar	42
3.6. Analizlerde Kullanılan Cihazlar Ve Malzemeler	43
3.7. Kan Ve Doku Örneklerinin Hazırlanması	43
3.8. Stereolojik Çalışmalar İçin Doku Örneklerinin Alınması Ve İşlenmesi	44
3.8.1. Tespit	44
3.8.2. Suyunu alma (Dehidratasyon)	45
3.8.3. Saydamlaştırma	45
3.8.4. Parafinizasyon	45
3.8.5. Blok hazırlama	46
3.8.6. Kesit hazırlama	46
3.8.7. Boyama	46
3.9. Analizlerin Yapılması	47
3.9.1. Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm tayini	47
3.9.2. Total oksidan seviyesi (TOS) ölçüm tayini	47
3.9.3. Oksidatif stress indeksi (OSİ)'nin hesaplanması	48
3.9.4. Apoptozun tespiti	48
3.9.5. Comet assay (Alkali mononükleer hücre elektroforezi) yöntemi ile antigenotoksisite tayini	49
3.9.6. Stereolojik çalışmalar için doku preparatlarının incelenmesi	50
3.10. İstatistiksel Analizler	50
4. BULGULAR	51

4.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları	51
4.2. Antigenotoksik Etkilerin Analiz Bulguları	54
4.3. Kan Dokusu Apoptoz Görüntüsü	56
4.4. Stereolojik Bulgular	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
ÖZET	67
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	82
EKLER	83



SİMGELER VE KISALTMALAR

Ao	: Angstrom
AU	: Arbitrary Unit
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
Cu	: Bakır
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ERD	: Erdostein
EtBr	: Ethidium Bromide
Fe ⁺²	: Demir
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GSSG-R	: Glutatyon redüktaz
GST	: Glutatyon-s-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
i.p	: İntraperitoneal
KAT	: Katalaz
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
M.Ö	: Morötesi ışın
MDA	: Malondialdehit
MED	: Minimal erythematik doze
Mn	: Mangan
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NO	: Nitrik oksit
¹ O ₂	: Singlet (tekli) oksijen
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonlar
OH ⁻	: Hidroksil radikali

OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Soğuk fosfat tamponu
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
TAS	: Total antioksidan seviyesi
TNF- α	: Tümör nekrotizan faktör
TOS	: Total oksidan seviyesi
UV	: Ultraviyole
Zn	: Çinko

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Cilt tiplerine göre Minimal Eritem Doz (MED) değerleri.....	9
Tablo 2.	UVA'nın UVB ile kıyaslanması.....	13
Tablo 3.	Stereolojik sondalar ve objelerde duyarlı oldukları geometrik özellikler	35
Tablo 4.	Deri dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ sonuçları.....	51
Tablo 5.	Kan dokusu comet assay sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler.....	54
Tablo 6.	Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis total hacim CE ve CV değerleri.....	57
Tablo 7.	Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dermis damar hacminin CE ve CV değerleri	58
Tablo 8.	Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Derinin anatomik yapısı	4
Şekil 2. UV ışınlarının dalga boyları	11
Şekil 3. UVA'nın oluşturduğu deri hasarı	14
Şekil 4. Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi.....	17
Şekil 5. Kafeik asit (CA) ve CAPE'nin molekül yapısı	28
Şekil 6. İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması. .	35
Şekil 7. Taneciklerin yöneliminin kesitlerle örneklenme şansına etkisi	36
Şekil 8. Tanecik büyüklüğünün örneklenme şansına etkisi.....	37
Şekil 9. Deney hayvanlarına UVA ışınının uygulanması.....	42
Şekil 10. Dehidratasyon serisi	45
Şekil 11. Doku kesitlerinin lam üzerine alınması.....	46
Şekil 12. Deri dokusu TAS sonuçlarının grafiği	52
Şekil 13. Deri dokusu TOS sonuçlarının grafiği	53
Şekil 14. Deri dokusu OSI değerlerinin grafiği.....	54
Şekil 15. Kan dokusu comet assay değerlerinin grafiği	55
Şekil 16. Kan dokusu apoptoz görüntüsü	56
Şekil 17. Doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri	59
Şekil 18. Deri dokusu stereoloji değerlerinin grafiği	60

1. GİRİŞ

İnsanlar yaşamları boyunca çok sayıda fiziksel karsinojene birebir maruz kalmaktadır. Bu maruz kalınan karsinojenlerden biri de ultraviyole radyasyonudur. Doğada ultraviyole (UV) ışınlarının kaynağı güneştir. Güneş enerjisi içerisinde önemli bir bölüm teşkil eden 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 içerisinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan UVA ışınlarıdır. Güneş kaynaklı UVA ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan geçebilmektedir. Dermis olarak bilinen içderiye kadar nüfuz edebilmektedir. Bu yüzden erken yaşlanmaya ve deride kırışıklıklara, deri kanserinin ise ilerlemesine neden olmaktadır (Coohill ve ark., 1987 ; Gill ve ark., 1987). UV radyasyonuna uzun süre maruz kalan deride serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. UV radyasyonu DNA'da, protein, yağlar ve karbohidratlarda oksidatif hasara yol açmaktadır. Antioksidanlar ise reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumunu engellemektedir.

Ayrıca yaşlanmayı hızlandıran çevresel faktörlerinin başında güneş ışınlarının içerisindeki UV radyasyonu gelmektedir. UV etkisi UVB üzerinden doğrudan DNA yıkımı veya UVA üzerinden ROS aracılığıyla oluşan dolaylı yıkımlarla tetiklenir ve başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere içsel faktörlerin devreye sokulmasıyla sürer (Breuckmann ve ark., 2004).

Çalışmamızda olası antioksidan etki göstermesi beklenen kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve Erdosteine (ERD) kullanılmıştır. UVA'nın albino ratların derilerinde yol açtığı oksidatif hasara karşı CAPE ve ERD'nin koruyucu etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

UVA'nın deride oluşturduğu oksidatif, genotoksik ve DNA hasarına karşı, CAPE ve ERD'nin koruyucu etkisinin in vivo olarak ilk defa belirlenmiş olması bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Doku koruyucu olduğu bilinen CAPE ve ERD'nin UVA'dan korunmada kullanılıp kullanılamayacağı hakkında bulgulara ulaşılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Anatomik Yapısı

Vücut yüzeyini örten ve derinindeki yapıları yaralanma, enfeksiyonla bulaşma ve kuruma gibi çeşitli fiziki ve kimyasal zararlı etkilere koruyan deri, vücudun en büyük organıdır (Goldsmith ve ark., 1993). Ağırlığı üzerini örttüğü iskelet kaslarının yaklaşık % 8'i kadardır ve 1.2–2.2 m² alana sahiptir. Bunun % 9'u baş, % 9'u üst ekstremiteler, % 18'i alt ekstremiteler, % 18'i göğüs ve karın ön duvarı % 18'i de arka duvarında bulunur. Kalınlığında muhtelif yerlerde farklı olup 1.5–4.0 mm arasında değişir. Deri vücudun tüm dış yüzü, dış kulak yolu ve kulak zarının dış yüzünü örter. Deride birçok periferik sensitif sinir sonlanmaları bulunur. Bunların sayesinde sıcak soğuk ıslaklık ve kuruluk gibi duyularla bir cismin sertliği yüzeyinin şekli gibi vasıfları gözümüzle görmeden de fark edebiliriz. İçerisinde bulunan ter bezleri sayesinde vücut ısısının ayarlanmasında önemli rol oynadığı gibi, salgıladığı yağlı madde deriyi, dolayısıyla altındaki yapıları kurumaktan korur. Bunun yanında sınırlı olarak salgı yapma ve emme fonksiyonu vardır. Derinin eklentileri tırnak kıl ile ter, yağ ve meme bezleridir (Arıncı ve Elhan, 1997).

Derinin yerine getirdiği işlevler karmaşık bir yapıyı gerekli kılmıştır. Bu nedenle deri, her biri farklı bir doku yapısına sahip üç ayrı katmandan oluşur. Yüzeyden derine doğru bu tabakalar şunlardır:

- Epidermis (Üst deri),
- Dermis (Corium),
- Hipodermis (Subkutanöz tabaka).

Derinin esas bölümünü mezansimal menşeli sıkı bağ dokusundan yapılmış dermiş (corium) oluşturur. Bunun üzerini örten ektodermal menşeli epitel tabakasına ise epidermis denir. Dermisin yüzeyinde damar ihtiva eden papillalar bulunur. Burası sinir sonlanmaları bulunması nedeniyle hassastır. Dermisin içinde veya altında ter bezleri, yağ bezleri ve kıl kökleri gibi özel görevi olan bazı organlar bulunur (Arıncı ve Elhan, 1997).

Epidermis ve bunların eklentileri olan kıl, tırnak, yağ ve ter bezleri ektodermal menşelidir. İntrauterin hayatın yaklaşık 5. haftasında epidermis sadece iki tabakalı hücreden ibarettir. Bunlardan derin tabakalılar rete mucosumun karşılığıdır. Deri altındaki tela subcutanea (subcutis) ve yağ dokusu intrauterin hayatın 4. ayında, cutisin yüzeyindeki papillalar ise yaklaşık 6. ayda görülmeye başlarlar. Fötal hayatta epidermis döküntüsü çok

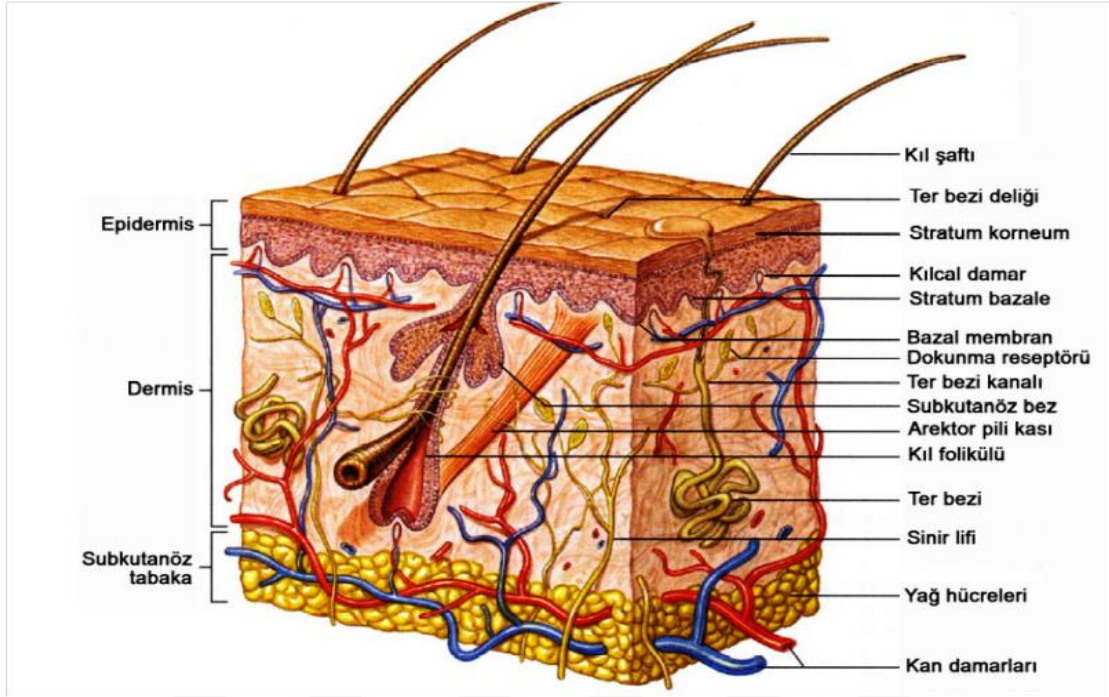
olur. Bu döküntü yağ bezlerinin salgısı ile karışarak vernix serosae denilen krem gibi bir madde oluşturur. Yavrunun derisi intrauterin hayatın son üç ayında vernix serosae ile sıvanmış durumdadır. Tırnaklar 3. ayda oluşmaya başlar ve yaklaşık 6. ayda, epidermisden görünür şekilde ortaya çıkar. Kıllar yaklaşık 3.-4. aylarda epidermisin derinlerinde oluşmaya başlar. Kıllar canlılık özelliklerini kaybetmiş hücrelerden oluşur (Arıncı ve Elhan, 1997).

2.1.1. Epidermis (Üst Deri)

Epidermis ektodermal kökenli olup çok katlı yassı epitel hücrelerinden meydana gelmiştir. Damarsız olan bu tabakanın çeşitli katlarındaki hücreler farklı yapılardadır. Epidermisin keratinize hücrelerden oluşan yüzeyel katına stratum corneum doğurgan olan derin katına ise stratum germinativum denilir. Epidermisin dış yüzünde farklı derinliklerdeki oluklar muhtelif yönlerde uzanır ve birbirini keserek ağlar oluşturur. Sulci cutis denilen bu oluklar arasında poligonal eşkenar dörtgen şeklinde sahalar kalır. Özellikle eklemlerin katlanma yerlerinde bulunan oluklar derindir. Epidermisde görülen kenarlara crista cutis denilir. Bunlar özellikle el ayası ve ayak tabanında belirgindir ve belirli kavisler, kişiye özgü şekiller oluşturur. Coriumun yüzeyel tabakasında bulunan papillaların dizilimlerinde epidermisin yüzeyelindeki crista cutislerin dizilimine uymaktadır. Parmak uçlarındaki crista cutislerin dizilimi her şahısta farklıdır. Kriminolojide hüviyet tesbitinde kullanılan (parmak izi) bu yapılar, corium tabakasındaki papillalar tahrip edilmedikçe tekrar aynı crista cutisler oluşur (Arıncı ve Elhan, 1997).

Epidermis dıştan içe doğru beş tabakadan oluşmuştur (Gökmen Gövsa, 2003).

- Stratum corneum (Boynuzsu tabaka)
- Stratum lucidum (Aydınlık tabaka)
- Stratum granulosum (Taneciksi tabaka)
- Stratum spinosum (Dikensi tabaka)
- Stratum basale (Temel tabaka)



Şekil 1. Derinin anatomik yapısı (http://www.ybu.edu.tr/sinancanan/contents/files/322009_Duyu.pdf, Erişim tarihi: 10.10.2015)

Stratum corneum: Birbirine yapışmış kabuk şeklinde cansız, çekirdeksiz epitel hücrelerinden oluşur. Bu hücreler keratin içeren hücre atıkları olup zamanla kendi altındaki tabakalarda bulunan canlı hücrelerden ayrılarak dökülür (saçlı derideki kepek gibi). Bu tabakadaki hücreler keratinleşmiş olduklarından mekanik ve kimyasal etkilere karşı çok dayanıklıdırlar. Örttüğü yapıları koruması bakımından bu tabaka derinin çeşitli tabakaları arasında en önemli rolü oynar. Devamlı travmaya maruz kalan bölümleri zamanla kalınlaşır (nasır gibi), bunun aksine travmaya maruz kalmayan bölümleri ise incelir.

Stratum lucidum: Camsı görünümlü olan bu tabaka parmak uçları, ayak tabanı gibi sadece epidermin çok kalın olduğu bölgelerde bulunur. İnce olan bu tabakanın hücreleri elaidin içerir. Homojen ve şeffaf olan elaidin maddesinden dolayı bu hücrelerin çekirdekleri ve hücre sınırları pek belirgin değildir.

Stratum granulosum: Deri yüzeyine paralel üç ya da beş kat yassı hücrelerden oluşan tabakadır. Bu hücreler keratohyalin denilen tanecikleri içerir. Bu tabakadaki hücreler bölünmezler. Bu hücreler dışa doğru gittikçe keratohyalin granülleri azalır. Yerini elanın maddesi alır.

Stratum spinosum: Çok sayıda hücre katından kurulu olup hücreleri birbirine sitoplazmik köprüler bağlar. Hücreler birbirinden ayrıldığında bu bağlar hücrelerin dış

yüzeyinde diken gibi görülürler. Hücreleri birbirine bağlayan sitoplazmik köprüler aracılığı ile bir hücreden diğerine tonofibril adı verilen iplikler uzanır. Tonofibriller deri üzerinden gelen basıncı daha fazla alana dağıtarak darbeden korurlar. Deri üzerine basınç olunca tonofibrillerin kavisleri alçalır, basınç ortadan kalkınca eski haline dönerler. Stratum spinosum, stratum basale ile birlikte malpighi tabakası adını alır. Derinden gelen tonofibriller yön değiştirmeksizin crista cutislere kadar gelir ve bunların konveksliğine uyacak şekilde kıvrılarak tekrar geldiği yönde derine dalar. Bu da parmak uçlarına gelen bir basıncın, tonofibrillerin dik seyretmesi sebebiyle, etrafa dağılmadan sadece temas eden yerin derindeki Meissner cisimciklerine (duyu hücreleri) iletilmesini sağlar (Arıncı ve Elhan, 1997).

Stratum basale: Bu tabakada yer alan keratinositler en derin tabakayı oluşturup, bazal membran üzerine yerleşmiştir. Silindirik hücrelerden yapılmış olduğundan bu tabakaya stratum silindricum da denir. Stratum basale de oluşan yeni hücreler eskileri yüzeye doğru iterler. Stratum basaledaki canlı hücrelerin stratum corneuma gelerek ölmesi için ortalama 30 günlük bir süreye ihtiyaç vardır.

Stratum corneuma gelen hücreler çekirdeklerini kaybederler; ortalarında bir boşluk oluşur ve cansız duruma geçerler. Boşluğun etrafında keratin denilen bir madde oluşur ve hücre de dıştan sert bir madde ile sarıldığından sertleşir. Bu sertleşmiş hücreler, vücudun korunmasında diğer tabakalara göre daha önemli rol oynarlar. Epidermis sadece çoğalma yeteneğine sahip canlı hücrelerden oluşmuş olsaydı, deri uğradığı etkilere dayanamazdı. Stratum basalede ki deri yüzeyine dik olarak uzanırken stratum lucidumdan itibaren yatay bir pozisyonda deri yüzeyine paralel olarak uzanır (Gökmen Gövsa, 2003).

Derinin bir alttaki tabakası olan "Dermis" ten farklı olarak epidermisde damarlar bulunmaz. Beslenme, altta bulunan dermisten doğrudan geçiş (difüzyon) yoluyla olur.

2.1.2. Dermis (Corium)

Epidermisi destekleyen bağ dokusudur. Mezoderm kökenli olup damar ve sinir bakımından zengindir. Dermis iki tabakadan oluşmuştur (Ozan, 2004).

1. Stratum papillare
2. Stratum reticulare

Stratum papillare: İnce yüzey tabakası olan stratum papillare ince elastik lifler içerir ve adeta bir parmak gibi çıkıntılar oluşturarak daha üstteki tabakanın deriye sağlam bir şekilde

tutunmasını sağlar. Bu parmaksı çıkıntılarının içinde yoğun bir kılcal damar ağı mevcuttur ve epidermise kan gitmesini sağlarlar. Stratum papillare aynı zamanda çeşitli savunma hücreleri de içerir (histositler, fibroblastlar, mast hücreleri ve bağışıklık hücreleri). Ayrıca hissetmemizi sağlayan serbest sinir uçları ile dokunma ve basınç algılayıcıları gibi yapılar da bu tabakada bulunmaktadır. Kulak zarı scrotum ve koltukaltı derisinde ise papilla bulunmaz. Papillalar içinde temasa karşı hassas olan Meissner cisimcikleri bulunur ve sayıları çeşitli bölgelerde farklıdır.

Stratum reticulare: Daha alttaki "Stratum reticulare" ise asıl olarak vücut yüzeyine paralel uzanan kalın kollajen lif demetleri ve elastik liflerden ibaret bir ağ yapısı oluşturmaktadır. Çeşitli tipte salgılar üreten ter ve yağ bezleriyle bunların salgılanmasında rol oynayan kas hücreleri ile birlikte kıl ve tüylerle ilgili yapılar da bu tabaka içinde yer alır. Ayrıca tüm bu yapıları birleştiren ve desteğini sağlayan bağ doku hücreleri de bu tabaka da yer alır.

Daha alttaki deri altı dokusuna bitişik olan asıl deri bölümü ana işlevi vücut sıcaklığı ile kan basıncını düzenlemek olan küçük ve orta boy damarların oluşturduğu bir ağ yapısına da sahiptir (Gökmen Gövsa, 2003).

2.1.3. Hipodermis (Subcutis)

Tüm vücutta deri ile kasları örten fascia ya da periosteum arasında bulunan bir tabakadır. Corium ile subcutis arasında kesin bir sınır yoktur. Subcutis, başlıca kollajen ve elastik lifler arasında bulunan yağ hücrelerinden oluşur. Subcutis tabakasında kollajen, elastik liflerin yanısıra damarlar, sinirler, kıl kökleri, ter bezleri ve yağ dokusu bulunur. Kollajen ve elastik liflerden oluşan bağ dokusu bir takım lameller yapar. Bu lamellerin yüzey uçları corium katının iç yüzüne, derin uçları ise kasların üzerini örten fascia veya periosteuma tutunurlar. Böylece bir takım bölmeler oluşur. Hipodermis lamina superficialis ve lamina profundus olarak iki yaprakтан oluşur. Bu bölmelerin içi yağ dokusu ile doludur. Bu bölmeler yağ dokusunun yanlara kaymasına engel olur. Bu şekilde hem elastik ve aynı zamanda çok sağlam bir tabaka oluştururlar. Ayak tabanı ve el ayasında durum böyledir. Lamina profunda ince bir zar şeklinde olup yağ dokusu içermez. Subcutisin bu iki tabakası vücudun çoğu yerinde birbirine sıkıca yapışırken bazı alanlarında kolaylıkla birbirinden ayrılır (Gökmen Gövsa, 2003).

Hipodermis her kişide ve kişinin her bölgesinde aynı kalınlıkta değildir. Göz kapaklarının derisinde hiç bulunmayan bu tabaka, özellikle kadınlarda meme, göbek ve kalça bölgesinde yağ dokusu ile birlikte kalın bir tabaka halindedir (Arıncı ve Elhan, 1997).

Yaşlanma ve ihtiyarlama ile birlikte derinin gelişimi tersine döner. Epidermis ve dermis inceler, melanosit yoğunluğu azalır. Dermisteki damar ağı ve adneksler zayıflar ve elastin fibrilleri kalınlaşır, ileri yaşlarda kıl folikülleri, yağ bezleri, apokrin ve ekrin bezler atrofiye uğrar. Zamanla deri kendisini koruyucu, duyuşal ve iletişimsel özelliklerini kaybeder. İlerleyen yaşla birlikte, deri, yeterli yağ ve su depolayamaz doğal elastikiyetini kaybeder ve inceler (Sütlaş, 2005).

2.2. Güneş Işınlarnının Derideki Zararlı Etkileri

İnsanlar zamanlarının çoğunu dışarıda, güneşli ortamlarda geçirmekten hoşlanırlar. Çalışarak, oynayarak veya egzersiz yaparak gün boyu sürdürülen aktivitelerde, genellikle vücudumuzun çoğu yeri açıkta kalır. En son yapılan tıbbi araştırmalar, güneşin UV ışınlarına fazlaca maruz kalmanın cilt kanseri (melanoma, temel hücre kanseri, pullu hücre kanseri), diğer cilt problemleri, katarakt, diğer göz problemleri ve bağışıklık sisteminin baskı altına alınması gibi ciddi sağılık problemlerine neden olabileceğini göstermiştir (Mutlu ve ark., 2003).

UV ışınlar; insan sağılığı üzerine olan zararlı etkilerini daha çok deri hücrelerini ve göz dokusunu etkileyerek gösterirler. Deri üzerine olan etkilerini cildin alt katmanlarına dek nüfuz ederek gösterirler. Kök hücreleri etkilerler ki, bu zararlı cilt yapısının oluşmasına neden olur ve cildin genetik yapısına (DNA) zarar verir. Bu süreçte, vücuttaki kollajen proteini azalmakta ve cilt daha ince, güçsüz, pürüzlü ve kırışıklıklarla dolu olmaya başlamaktadır. Aşırı güneş ışığında sadece birkaç dakika kalmak bile kollajen üretimini zarara uğratmaktadır.

Cilt rengi de güneş kaynaklı hastalıklar için önemli bir faktör olarak kabul edilebilir. Çünkü cilt rengine göre güneşten etkilenme oranı değişmektedir. Cildin güneşten ten rengine göre etkilenmesine "fototip" denir. Açık tenlilerin cilt kanserine yakalanma ihtimalleri daha yüksektir (Karamangil, 2015).

2.2.1. Cildin minimum yanma dozu (Minimal Erythemal Dose (MED))

Güneş yanığı, insan cildi üzerinde, cildin güneşe maruz kalmasından kaynaklanan güneşin zararlı bir etkisidir. Bu nedenle ultraviyole radyasyonun cilde zarar verici etkisinin

bilinmesi ve değerlendirilmesi gerekir. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen, minimum etkili radyasyon miktarı minimal erythemal dose (MED), ultraviyole radyasyonun zararlı (ciltte olağan dışı kızarmalara neden olan) miktarının belirlenmesi için kullanılır ve sayısal bir değerdir. Anlaşılabacağı üzere MED ultraviyole radyasyon birimidir. MED değeri önceden güneş yanığı olmamış bir cildin olağan dışı kızarmasına neden olan miktardır. Bununla beraber, insanlar farklı cilt tip ve yapısına sahip olduklarından, aynı miktarda güneş radyasyonuna maruz kaldıklarında ciltleri farklı etkileşime uğrar. Yapılan bir çalışmada, Avrupa kıtasındaki insanların 1 MED ultraviyole radyasyona karşı aynı tepkimeleri vermeleri için tespit edilmiş radyasyon miktarının 200 ile 500 J/m² arasında değiştiği bulunmuştur. Ciltlere göre farklı MED değerleri Tablo 1’de özetlenmiştir. Herkes için MED birimi değişmeyeceği için, aynı birime karşı insanların alacağı farklı önlemler belirlenmiştir (Anonim, 2014).

Çalışmamızda sıçanlara verilecek UVA MED miktarı gözönünde bulundurularak ayarlandı.

Tablo 1. Cilt tiplerine göre MED değerleri (<http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx?s=uv>. Erişim tarihi: 20.12.2015)

Cilt Tipi	Cildin Durumu	Verdiği Tepkime	Saç Rengi	Göz Rengi	1 MED
1	Hiç yanmamış	Hemen etkilenir	Kırmızı	Mavi	200 J/m ²
2	Bazen yanmış	Zaman zaman yanar	Sarı	Mavi/yeşil	250 J/m ²
3	Yanmış	Nadiren etkilenir	Kahve	Gri/Kahve	350 J/m ²
4	Yanmış	Etkilenmez	Siyah	Kahve	450 J/m ²

2.2.2. Güneş ışınlarındaki radyasyon

Güneş ultraviyole ışınlarının en büyük kaynağıdır. Güneş enerjisi içerisinde önemli bir bölüm teşkil eden 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 içerisinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan UVA ışınlarıdır. Enerjisi az olmasına karşın en fazla maruz kalınan UVA ışınıdır.

1970 ve 1987 yılları arasında ozon tabakasının yapısında oluşan incelmeler ya da delinmeler sonucu UV yeryüzüne daha fazla ulaşmaya başlamıştır (Gough ve ark., 1990).

Böylelikle UV ye uzun süre maruz kalan deride serbest oksijen türevleri oluşmaktadır. Bu türevler DNA, protein, yağlar ve şekerler de oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu oksidatif hasarın sonucunda hücre metabolizmasında, morfolojisi ve ultra yapısında zararlı değişikliklere neden olmaktadır. UV'den dolayı oluşan serbest radikaller hücresel farklılaşma, çoğalma ve apoptoz mekanizmasını etkilemektedir. Hücrede meydana gelen bu değişiklikler de foto yaşlanmayı ve deri kanseri oluşumunu tetiklemektedir (Haagen ve ark., 1992).

Atmosferik kirlenmeden dolayı yeryüzüne daha fazla miktarda ulaşan UV radyasyonu canlılar üzerinde zararlı etkilerini de göstermeye başlamıştır. UV, yeryüzüne ulaşan güneş radyasyonunun çok az bir kısmını oluşturur. UV güneş yanığı, bronzlaşma, erken deri yaşlanması ve kanser gelişimi olmak üzere birçok biyolojik hastalığa neden olabilmektedir. Ayrıca UV'nin başta vitamin D3 sentezi olmak üzere epidermin ve derinin kalınlaşması gibi yararları, zararları karşısında çok azdır (Eckerson ve ark., 1983).

Güneş'ten yayılan enerjinin yaklaşık % 9'u UV radyasyondur. UV deri kanserlerinin en önemli oluşum nedenidir, neredeyse % 90 veya üzerinde etkilidir. UVC atmosferde tutulduğu için yeryüzüne ulaşamaz. Ancak UVB ve UVA çok etkilidir. Güneş kaynaklı UVA ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan geçebilmektedir. Dermis olarak bilinen içderiye kadar nüfuz edebilmektedir. UVB ise doğrudan DNA tarafından tutulur ve doğrudan DNA hasarı yapar. UVA diğer kromoforlar tarafından tutulur ve serbest radikaller aracılığıyla DNA hasarı yapar (Mutlu ve ark., 2003).

UV'nin ilk etkileri arasında güneş yanığı, bronzlaşma, hiperplazi (elastikiyette bozulma), immunosupresyon (bağışıklık sisteminde zayıflama), D vitamini sentezi ve fotoonikoliz (tırnak uçlarında ayrılma) bulunmaktadır. Güneş yanığı iltihaplanması, UV'nin ilk ve en bilinen ani deri tepkisidir (Kaiser ve ark., 1995).

2.3. Ultraviyole Işınları (Mor Ötesi Işımlar)

Ultraviyole ışınları (Alm. "*Ultraviolette Strahlen*"; Fr. "*Rayons*", "*Ultraviolets*"; İng. "*Ultraviolet Rays*") görünen ışın ile X-ışınları arasında kalan elektromanyetik radyasyonlardır. Ultraviyole (mor ötesi) ışınların dalga boyları, X-ışınlarınınkinden uzun, görünen ışınlarınınkinden ise kısadır. Dalga boylarının kısalığı sebebiyle insan gözüyle görülemezler. Fakat bazı böcekler; mesela bal arıları tarafından rahatlıkla görülebilirler.

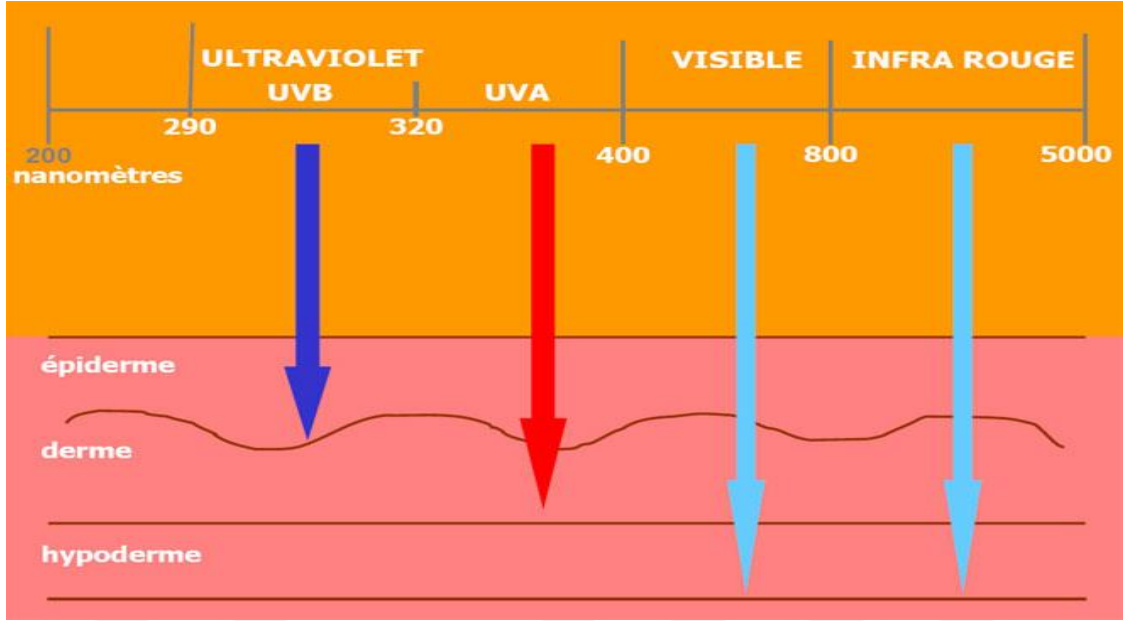
Ultraviyole ışınlarının varlığı, ilk defa 1801 yılında Ritter isimli bir Alman fizikçi tarafından tespit edilmiştir. Ritter, X ışığının kimyasal maddelere etkisini incelerken mor ışığın ötesindeki karanlık bantta enerji çıkışının olduğunu fark etmiştir (Rehber ansiklopedisi).

Elektromanyetik ışınım, dalga boyuna göre çeşitli sınıflara ayrılır. Bunlar, en uzun dalga boyundan en kisasına doğru radyo, mikrodalga, kızılötesi, görünür, morötesi X-ışını ve gama ışıınımlarıdır. Dalga boyu arttıkça, ışıının enerjisi de artar. Morötesi-UV ışıını, dalga boyu 10 ile 400 nm arasındaki ışıına denir. Gözümüz, 40 ile 70 nm dalga boyları arasında duyarlıdır ve bunun dışındaki ışıını algılayamaz. Görebildiğimiz en küçük dalga boylu ışıını mor olarak algıladığımızdan, bundan daha küçük dalga boyuna sahip olan ışıına "morötesi ışıını (M.Ö.)" adı verilir. Işııkta olduğu gibi, M.Ö. ışıımada da, dalga boyu nanometre (nm) olarak tanımlanır. 1nm ise 1 metrenin bir milyarda biridir (Rehber ansiklopedisi).

Görünen ışın ile mor ötesi ışınların arasındaki ısıtır radyasyonun dalga boyu, 4000 Angstrom (1 Angstrom = 10^{-8} cm) olarak kabul edilir. Ancak bu sınır, yaşa göre değişir. Genç kimseler, mor ötesi bölgesine ait 3130 Angstrom (A°)'luk dalga boylu radyasyonları görebilirler.

Ultraviyole ışın bandı, kabaca üç bölgeye ayrılır:

1. 4000-3000 A° arasındaki "yakın" bölge (UVA).
2. 3000-2000 A° arasındaki "uzak" bölge (UVB).
3. 2000-40 A° arasındaki "vakum" ultraviyole bölgesi (UVC).



Şekil 2. UV ışınlarının dalga boyları (<http://yesilanneyim.blogspot.ncom.tr/2014/05/gunesten-korunma-uygun-gunes-kremleri.Html>. Erişim tarihi: 12.06.2015)

Ultraviyole ışınlarının en büyük kaynağı, Güneş'tir. Güneş'ten yayılan enerjinin yaklaşık % 5'i ultraviyole radyasyonudur. Güneş'ten gelen mor ötesi ışınların yarıdan fazlası atmosferde tutulur. Atmosferde tutulan (absorbe olan) radyasyonun ekserisi küçük dalga boylu radyasyonlardır. Öyle ki, 3000 Å olan küçük dalga boylu ışınlar yeryüzüne hemen hemen hiç gelmez.

Ultraviyole ışınlar, görünen ışınlar gibi optik kurallara uyarlar. Kuvars, florit ve damıtık sudan rahatlıkla geçtikleri halde, görünen ışınlar için geçirgen olan birçok madde tarafından tutulurlar. Örneğin basit bir pencere camı, 3000 Å'dan kısa dalga boylu ışınları geçirmez. 2000 Å'dan kısa dalga boylu ışınların havanın kısa bir mesafesinde tutulmaları ihmal edilebilecek kadar az olduğu halde, atmosfer tabakası boyunca tutulma yeterli olmaktadır. Daha kısa dalga boylu radyasyonlar, oksijen tarafından tutulur. Bu olayla da oksijenden ozon meydana gelir.

Ultraviyole ışınların şiddeti, foto-elektrik hücreler veya radyometrelerle ölçülür. Kezâ, kimyevi maddelere ya da fotoğraf materyallerine olan etkilerinden de ölçülebilirler (Rehber ansiklopedisi).

Stratosferik ozondan başka faktörler de dünyamıza ulaşan UV radyasyon miktarını etkilemektedir. Güneş ışınlarının yeryüzüne eğik veya dik gelmesi yeryüzüne ulaşan UV radyasyon miktarını etkiler. Bunun yanında, güneşin gün içerisindeki konum değişikliği, atmosfer içerisinde geçen UV radyasyon miktarını etkiler. Güneş gökyüzünde alçak

olduğunda, sabah ve akşam saatlerinde ışınlar atmosfer içerisinde daha uzun bir mesafe kat etmektedir ve su buharı ile diğer atmosferik bileşenler tarafından saçılmaya uğrayabilir ve yutulabilirler. Güneş kendisinin en yüksek noktasında olduğunda (öğlen), yani gün ortası civarında UV'nin daha büyük miktarları dünyaya ulaşır. Ayrıca topoğrafik yükseklik de etkilidir. Hava parselleri dağ zirvelerinde daha temiz ve daha az yoğunluktadır, bundan dolayı daha fazla UV'yi geçirir. Bulut dünya yüzeyine erişen UV radyasyonun miktarı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İnce bulut örtüsünden çok daha fazla UV radyasyon geçişi olur (Mutlu ve ark., 2003).

2.3.1. Ultraviyole A (UVA)

Ultraviyole 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 (Banks ve Freeman, 2006).

UVB'nin mutajenik potansiyeli UVA'dan çok daha yüksek olmasına rağmen UVA'da küçümsenmemelidir. Bunun birinci sebebi, UVA'nın UVB'den yaklaşık 30 kat daha fazla dünya yüzeyine ulaşmasıdır, ikinci sebebi de UVA'nın derinin daha derinlerine (dermise) penetre olmasıdır (Bruls ve ark. , 1984).

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, hücrel deformasyon, hiperplazi, immün süpresyonu, DNA hasarı, foto yaşlanma ve melanogenez oluşmaktadır. Bu olgular da direkt veya indirekt olarak deri kanseri oluşumuna sebep olmaktadır (Beutler, 1984; Kaiser ve ark., 1995; Ji ve ark., 2007).

UVA'ya maruz kalma sonucu, deri kollajeninin yapısında çok sayıda çapraz bağ oluşumu, çözünürlüğünde azalma, denatürasyon gibi değişiklikler olur. Sonuçta deride elastoz, ince ve kalın kırışıklıklar, kuruluk, gevşeme, kabalaşma, kılcal damar kümeleri, düzensiz pigmentasyon, yer yer sarımsı renk, çok sayıda iyi ya da kötü huylu tümörler görülür (Fujimoto ve ark., 1997).

Tablo 2. UVA'nın UVB ile kıyaslanması

	UV B	UV A
Enerji	1000	1
Dünyaya ulaşan oran	1	20
Penetrasyon	Epidermis	Retiküler Dermis
Yoğun mevsim	Yaz	Her mevsim
Yoğun saat	11-13	Güneşin olduğu her saat
Bulut	Çok az geçer	Geçer
Cam	Geçmez	Geçer

Dünya yüzeyine ulaşan ultraviyole ışınlarının % 95'ini UVA ışınları oluşturur. Yıl boyu, hatta bulutlu günlerde bile etkisini gösterir. Diğer ultraviyole ışınlarının aksine bulutlardan, camdan ve deriden geçer, acısızdır ve cildin derinine işleyerek alt katmanlardaki hücrelere ulaşır. Serbest radikaller üreterek uzun vadede hücreleri değiştirip foto-yaşlanmaya, pigmentasyon bozukluklarına (hamilelik maskesi, lekeler), güneş dayanıksızlığına ve cilt kanserine sebep olur. Elastin ve kolajen liflerinin yönlerinin değişmesiyle cildin gevşeyip sıkılığını kaybederek çizgilerin belirmesine yol açabilirler.

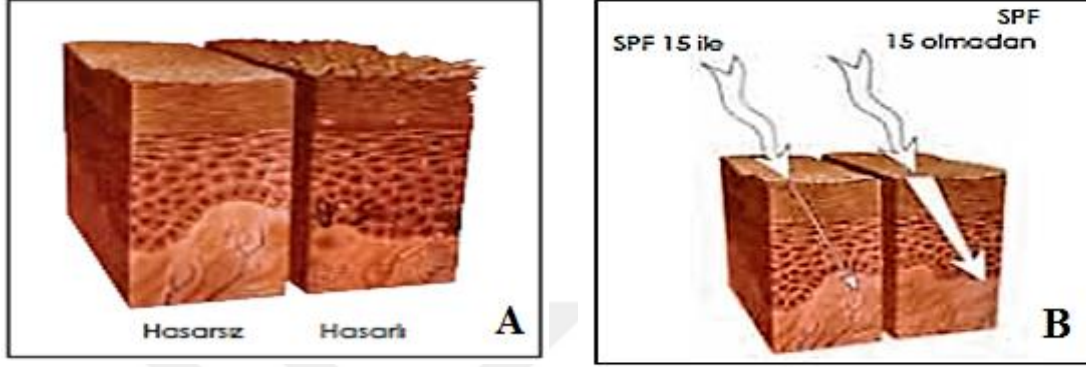
Diğer taraftan UV ışınları, langerhans hücrelerinin işlevlerini bozarak immün sistemi baskılar. Bütün bu etkiler ve mutasyonlar, hücre bölünmesini bozarak tümör gelişimine neden olur (Kosecik ve ark., 2005).

UV'ye uzun süreli maruz kalma sonucu insanlarda ve deney hayvanlarında deri kanseri olduğu bilinmektedir. Çalışmalarda, deney hayvanlarında kanser oluşturan UV ışınının UVB olduğu gösterilmiştir. UVA ışınları ise UVB'ye eklendiğinde karsinojenik etki artmıştır. UV'ye 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 etkisi ile tümör süpresör gen (p53 geni) mutasyonu da olmaktadır (Lerch ve ark.,1992).

Güneş ışığındaki UVA'ya maruz kalan insan vücudundaki ilk bölge deridir ve diğer organlar kan dolaşımı yoluyla etkilenmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar UVA'nın en az UVB kadar mutajenik ve karsinojenik olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni UVB ile karşılaştırıldığında UVB'ye göre daha derin penetrasyona sahip olmasıdır. Tümör oluşumuna

neden olan UVA, UVB'nin tümör indüksiyonunda gereksinim duyduğu enerjiden daha fazlasına ihtiyaç duyar (Strickland, 1986).

Sevin ve ark. (2007) UVA'nın deri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında UVA'nın güneş yanığını ve dermo-epidermal aktiviteyi artırdığını göstermişlerdir.



Şekil 3. UVA' nın oluşturduğu deri hasarı (A, B) ([http://guzelliksirlariuzmani.blogspot.com.tr/2013/05/uva-uvb-nedir-nasl korunmalyz.html](http://guzelliksirlariuzmani.blogspot.com.tr/2013/05/uva-uvb-nedir-nasl%20korunmalyz.html). Erişim tarihi:20.06.2015)

UVB'nin mutajenik potansiyeli UVA'dan çok daha yüksek olmasına rağmen UVA'da küçümsenmemelidir. Bunun birinci sebebi, UVA'nın UVB'den yaklaşık 30 kat daha fazla dünya yüzeyine ulaşmasıdır, ikinci sebebi de UVA'nın derinin daha derinlerine (dermise) penetre olmasıdır (Bruls ve ark., 1984).

UVA ışınları camdan geçer ve bu nedenle korunduğunuzu sandığınız zaman bile hasara yol açabilir. Ancak güneş yanığına sebep olmadığı için farketmeyiz ve bu nedenle UVA ışınlarına daha fazla maruz kalırız.

2.3.2. Ultraviyole ışınlarının deri üzerine etkileri

UV radyasyonuna uzun süre maruz kalan deride serbest oksijen türevleri oluşmaktadır. Bu türevler DNA'da, proteinler, yağlar ve şekerlerde oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu oksidatif hasarın sonucunda hücre metabolizmasında, morfolojisi ve ultra yapısında zararlı değişikliklere neden olmaktadır. UV'den dolayı oluşan serbest radikaller ile hücre düzenlenme yoluyla interaksiyona 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).

UVA ışığına maruz kalan deride periferik ve merkezi sinirlerde aşırı duyarlılık oluşur (Andreev ve ark., 1994). Kobaylarda yapılan çalışmada UVA'nın katarakt oluşturduğu belirlenmiştir (Giblin ve ark., 2002).

Kanser oluşumu ile ilişkili olan DNA'daki 8-oxo-dG, UVA'ya maruz kaldıktan sonra meydana gelir. Ayrıca insan derisindeki sitotoksositeye neden olmaktadır (Tyrell ve Pidoux, 1987; Lee ve ark., 1989).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada UVA'nın serbest radikal artışına neden olduğu bildirilmektedir (Erden İnal ve ark., 2001).

2.4. 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 "reaktif oksijen türleri (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 peroksitler 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).

2.4.1. 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 (Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller normal hücrel 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.

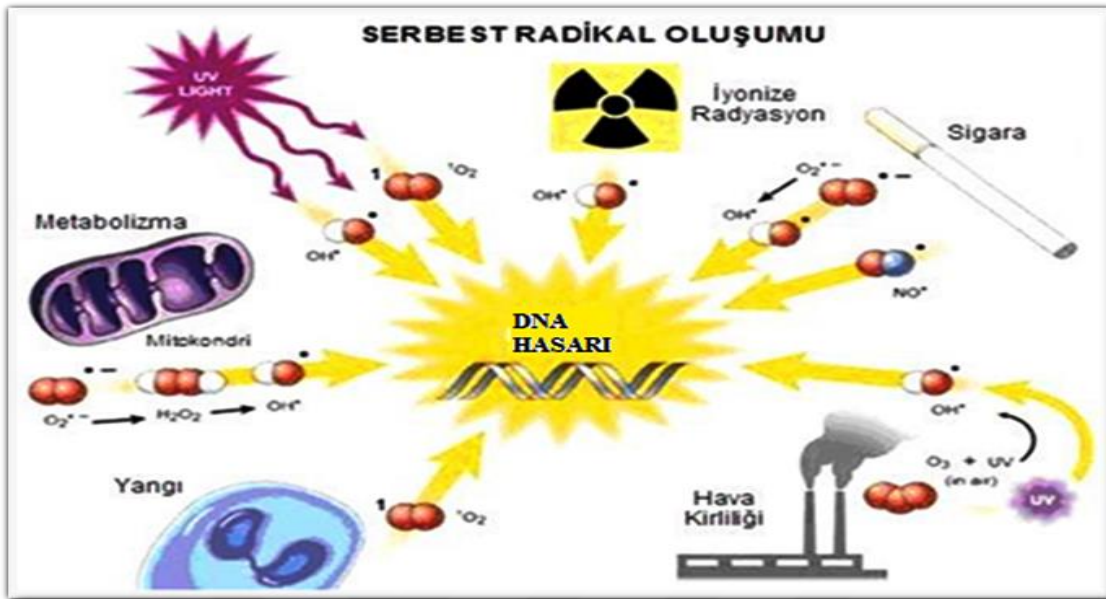
A) Eksojen kaynaklar

- 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, lipid peroksidasyonu)
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi, travma, intoksikasyon gibi)
- Yaşlanma

- Fagositik hücrelerin aktive olması sonucu ortaya çıkan solunumsal patlama (Ceyhan ve ark., 1996).



Şekil 4. Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi (<http://www.anagen.net/rali.html>. Erişim tarihi: 16.07.2015)

2.4.2. 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 asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfidlere dönüşür. Böylece proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (Girotti, 2000; Ertan ve ark., 2001).

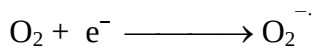
C) Karbohidratlar üzerindeki etkileri: Fizyolojik pH ve ısıda, glukoz gibi monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzalaldehidler meydana gelir. Oluşan okzalaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik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

D) Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri: Radyasyonla oluşan serbest radikaller, 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).

2.4.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)

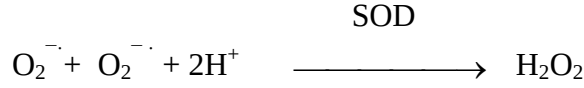
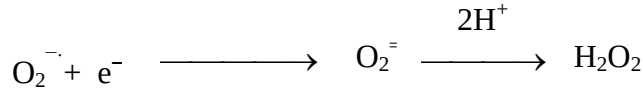
Düşük seviyelerdeki ROS, pek çok biyokimyasal süreçte kaçınılmazdır. Hücrede farklılaşması, hücre içi mesajlama, hücrenin gelişmesi ya da büyümesinin durdurulması, hücre ölümü, bağışık ve mikroorganizmalara karşı savunmayı bu süreçler arasında sayabiliriz. Aksine yüksek dozlarda ROS ve/veya ROS'un yeterince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



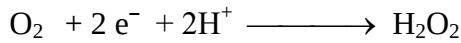
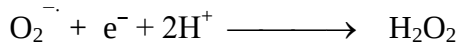
Hem çevresel etkenlerle, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir. Bu molekül bir serbest radikal olarak bilinmesine rağmen, biyolojik dokularda fazla hasar oluşturmaz.

Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (Greenwald, 1991).

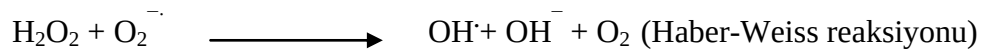
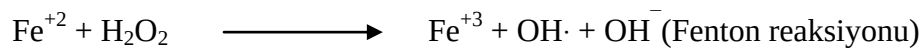
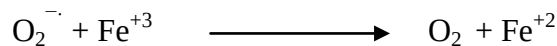


Hücresel ortamlarda üretilen süperoksit, indirgeyici ya da oksitleyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Süperoksit anyonu bir elektron daha alırsa peroksit anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 '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).

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 hidrojen peroksidi (H_2O_2) 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 ROS kapsamına girer. Çünkü hidrojen peroksit tarafından, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) oluşturulur. H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını, antioksidan enzimlerden olan katalaz ve peroksidaz sağlar (Cheeseman ve Slater, 1993).



C) Hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$): Hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) 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 ($^1\text{O}_2$): 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 lipid 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).

2.4.4. 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 immün 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).

Ayrıca UV radyasyonuna maruz kalınması sonucunda insanlarda ve deney hayvanlarında serbest radikallerin arttığı belirtilmiştir. (Erden İnal ve ark., 2001).

2.5. 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)

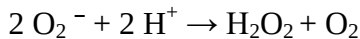
4. Onarıcı etki (Tamir fonksiyonu) olarak sayılır.

Vücuttaki antioksidan savunma ise enzimatik veya nonenzimatik yolla gerçekleşebilir.

2.5.1. 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 peroksite 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 ortamdaki uzaklaştırırlar. KAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkindir.

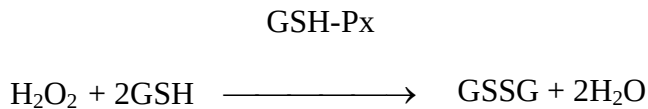
KAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



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

C) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Yapısında selenyum bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Sitozol ve mitokondride bulunabilir. Enzim aktivitesi, NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlarda ki H₂O₂, öncelikle glutasyon peroksidaz tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyonla 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, Pulford, 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 hücrel 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 glutatyonla dönüşümünü katalizler. Redükte glutasyon, antioksidan enzimler tarafından kullanılmaktadır (Akkuş, 1995).



2.5.2. Non-enzimatik antioksidanlar

Non-enzimatik antioksidanlardan endojen olanlar, glutasyon, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemogloblin, 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 glutasyon (GSH), glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid antioksidandır. GSH, peroksidaz reaksiyonu için zorunlu bir co-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu nedenle O_2^- , OH^- 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. 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 (Cowie, 2002). Bu nedenle oksidasyon sonucu C vitamini tükenmedikçe E vitaminin tükenmesi söz konusu değildir.

Vitamin A, zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Retinol etkili bir peroksil radikali süpürücüsüdür (Vince, 1999). β -karoten ise antioksidan özelliğe sahip olup süperoksit radikalinin 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 $\text{OH}^\cdot$ 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 $\text{O}_2^\cdot$ ve $\text{OH}^\cdot$ 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, $\text{O}_2^\cdot$ ve $\text{OH}^\cdot$ radikallerini toplar (Ayçiçek ve ark., 2005). Glukoz, $\text{OH}^\cdot$ 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 CAPE ve ERD'nin antioksidan özellikleri olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2004b; Erarslan ve ark., 2011).

2.6. Çalışmada Etkinliği Araştırılan Moleküller

2.6.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)

CAPE, arıların bitkilerden topladığı ekstraktın içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir (Hepşen ve ark., 1996).

Son yıllarda bazı doğal maddelerin tedavi edici özelliklerine karşı artan büyük bir ilgi vardır. Doğal bir arı ürünü olan propolis bu ilginin merkezi konumundadır. Propoliste yaklaşık 300 çeşitten fazla bileşen tespit edilmiştir (Gülçin ve ark., 2010). Bu bileşenler arasında en etkili olan ve miktarca bol bulunan CAPE [Phenethyl 3-(3-4 dihydroxyphenyl) acrylate] dir (Sforcin, 2007). Fonksiyonel iki OH⁻ grubu bulunduran CAPE, elektronları aktif bir şekilde alıp verme özelliğine sahip olup bu sayede oksitleyici ve redükleyici özellik gösterir. Ayrıca, aromatik ve alifatik yapıdaki uzun karbon zincirlerine bağlı olarak lipofilik karaktere de sahiptir. Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması sağlanır. (Widjaja ve ark., 2008).

CAPE; ornitin karboksilaz, 5- α redüktaz, proteaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, HIV-1 integras gibi enzimlerin potansiyel inhibitörü (Son ve ark., 2001) olmakla birlikte bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa B'nin aktifleşmesini de inhibe etmektedir (Sforcin ve Bankova, 2011).

Propolis, CAPE ve polen zengin flavonoid içeriği ile bilinen ekzojen kaynaklı antioksidan maddelerdir.

Ekzojen olarak alınan antioksidanların canlıda hem fizyolojik hem de biyokimyasal olarak olumlu etkiler yaptıkları bilinmektedir. Bu antioksidanlar arasında son yıllarda çok fazla dikkat çeken terapötik maddeler arasında doğal arı ürünleri yer almaktadır.

Propolis, eski çağlarda ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek inflamatuvar hastalıklarda ve ateroskleroz tedavisinde doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (Castaldo ve Capasso, 2002). Bu değerli arı ürününün antibakteriyel, antifungal, antiviral özellikleri yanında antiülser, lokal anestetik, antitümöral, antihipertansif, immün sistemi uyarıcı aktivite göstermesi ile tıp, apiterapi, gıda ve kozmetik alanında kullanımı yaygınlaşmıştır (Erdoğan ve ark., 2011).

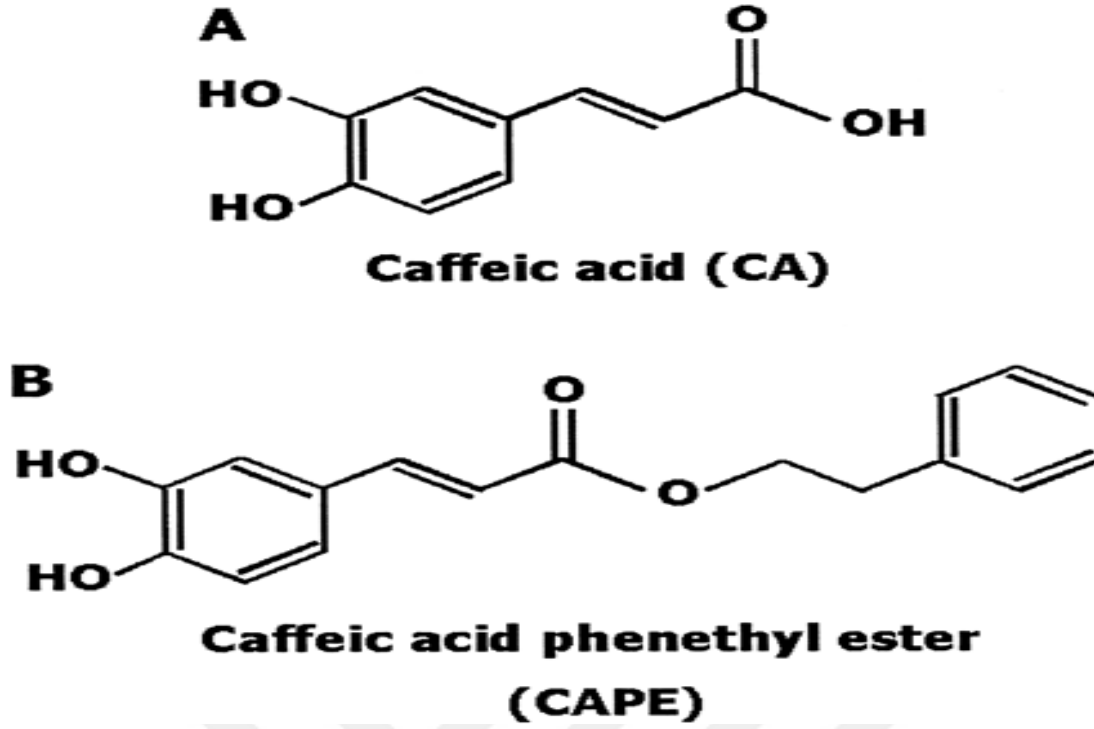
Arılar propolisi kovanın iç kısmına bir tabaka şeklinde uygulayarak kovandaki delik ve çatlakların kapatılmasında, peteklerin tamir edilmesinde, peteklerin birbirlerine yapıştırılmasında, petek gözlerinin parlatılmasında, kovan girişini daraltmada, çeşitli arı

hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etkenlerinin etkisiz hale getirilmesinde kullanılmaktadırlar (Silva ve ark., 2012). Propolisin içeriğinin yarısından fazlasını fenolik bileşikler ve esterleri oluşturmaktadır (Hepşen ve ark., 1996). Bu esterlerden en önemlisi ve propolisin en etken bileşenlerinden biri CAPE olarak bilinmektedir. CAPE [Phenethyl 3-(3-4 dihydroxyphenyl) acrylate]; propolis içeriğinde bulunan ve izole edilebilen çok geniş spektrumlu etkileri bulunan bir maddedir. Bu madde propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olmakla birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immün uyarıcı, karsinostatik, hasar önleyici, reperfüzyon özelliklerine de sahiptir. Farklı kaynaklardan elde edilen propolis örneklerinin benzer kalitatif kompozisyonlara sahip olmasının aksine CAPE örnekleri büyük oranda farklılıklar göstermektedir (Widjaja ve ark., 2008).

Polen yapısal olarak çiçek tozları, nektar ve bazı salgıların karışımıdır. Bu doğal ürün kovan içerisinde larvaların beslenmesinde kullanılmasının yanı sıra insanlar için potansiyel bir besin ve sağlık alanında da kullanılan apiterapötik bir üründür. Oldukça zengin bir kompozisyona sahip olan polenin yapısı; proteinler, mineraller, aminoasitler, karbohidratlar, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, vitaminler ve pek çok fenolik bileşikler kapsamaktadır (Paramas ve ark., 2006). Antioksidan bileşiklerin en iyi kaynağı şüphesiz insan diyetinde sıklıkla kullanılan meyve ve sebzelerdir. Fenolik bileşiklerin en önemli özelliği ROS'u nötralize etmektir. Bunlar aromatik halka içerisindeki hidroksil gruplarına çift bağlarla bağlanırlar.

Polenin bir diğer özelliği ise, hidroksil radikale karşı radikal süpürücü özellik göstermesi ve lipid peroksidasyonunu önlemesidir (Leja ve ark., 2007; Marghitas ve ark., 2009).

Etil asetat, dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanolde tamamen çözünebilen, molekül ağırlığı 284.31 g/mol olan liyofilize formdaki CAPE'nin kimyasal formülü C₁₇H₁₆O₄ olarak belirlenmiştir (Akyol ve ark., 2011).



Şekil 5. Kafeik asit (CA) ve CAPE'nin molekül yapısı (Akyol ve ark., 2011).

CAPE'nin yapısı, fonksiyonları ve biyolojik özellikleri

Yapısında fenol grupları ihtiva eden CAPE; antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immün uyarıcı ve karsinostatik, hasar önleyici reperfüzyon, antikanser özellikleri ile propolisin biyolojik olarak en aktif bileşenlerindendir (Güney ve ark., 2007). Birçok bitkisel kaynaktan elde edilen propolis örneklerinin benzer kalitatif kompozisyonlara sahip olmalarının aksine, CAPE örnekleri büyük oranda farklılıklar göstermektedir. Toksik etkiye sahip olmayan CAPE; oksijenden türevlenen serbest radikallerin süpürülmesinde önemli bir etkiye sahiptir (Widjaja ve ark., 2008). Sentetik bir madde olan CAPE ile *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar yapılmıştır. Li ve arkadaşları; insanda koroner arter endotel hücrelerinde okside LDL aracılı NF-κB artışı üzerine CAPE'nin etki ederek iskemiye bağlı hasarı önlediğini göstermişlerdir (Li ve ark., 2000). Yılmaz ve arkadaşları; streptozosin ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan karaciğer dokusunda CAPE'nin serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisini göstermişlerdir (Yılmaz ve ark., 2004b). Nötrofil veya ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen ROS'un *in vitro* koşullarda 10 µmol/kg konsantrasyonda CAPE tarafından bloke edildiği bildirilmiştir (Özyurt ve ark., 2001; Atik ve ark., 2006). Lipid peroksidasyonunu engelleyen CAPE'nin tirozin kinaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitesini baskıladığı da gösterilmiştir (Özen ve ark., 2004). Spesifik olarak NF-κB'nin oluşumunu inhibe eden CAPE, ROS'un oluşumunu engelleyerek başta Tümör

Nekrozis Faktör alfa (TNF- α) olmak üzere birçok inflamatuvar yolağın işleyişini de önlemektedir. Ayrıca CAPE'nin inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği de belirtilmiştir (Albukhari ve ark., 2009). Bağırsak kanser oluşumunu baskılayan CAPE, potansiyel koruyucu özellikleri ile kemoterapik etki de gösterebilmektedir (Biray ve ark., 2006).

2.6.2. Erdosteine (ERD=N-karboksimetiltioasetil-homosisteine tiolaktone)

ERD (N-karboksimetiltioasetil-homosisteine tiolaktone) kronik pulmoner hastalıkların tedavisi için geliştirilen mukolitik bir ajandır. Bu ajan ancak karaciğer metabolizması ile serbestleştirilebilen iki adet bağılı sülfhidril grubu içerir. ERD'nin temizleyici ve antioksidan mekanizmasında bu iki sülfhidril grubu rol oynar (Dechant ve ark., 1996; Braga ve ark., 2000). Deneyisel ve klinik çalışmalar ERD'nin antioksidan olarak serbest radikal temizleyici fonksiyonlarını göstermiştir (Biagi ve ark., 1989; Inglesi ve ark., 1994; Yıldırım ve ark., 2003).

ERD, nitrik oksit ve ksantin oksidaz aktivitesini önleyerek serbest radikal oluşumunu azaltır (Fadillioğlu ve ark., 2003). ERD ilaçlara bağılı toksik renal yetmezlikte başarıyla kullanılmaktadır. Renal doksorubisin ve sisplatin toksisitesinde etkinliği gösterilmiştir (Yagmurca ve ark., 2003; Ozyurt ve ark., 2004). İskemi reperfüzyon sonrası ratlarda böbreğin korunmasında ERD'nin koruyucu etkisi gösterilmiştir (Erdogan ve ark., 2006). Bütün bu veriler, ERD'nin ratlarda çeşitli oksidatif stres durumlarında koruyucu etkisini vurgulamaktadır.

2.7. Çalışmada Takip Ettiğimiz Belirteçler

2.7.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSI)

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. Kanın 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 ölçülmesi sağlanabilir (Bölükbaş ve ark., 2005). Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenmektedir (Kösecik ve ark., 2005).

2.7.2. Apoptoz

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğmak, büyümek, üremek, yaşlanmak ve ölmektir. Yaşamın sürdürülmesi organizmanın yapı ve fonksiyonunun fizyolojik gereksinimlerinin belirlediği sınırlar içerisinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında mutlak bir dengenin bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğünde ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Mak, 2003).

Tüm canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşir. Başlıca hücrenin iki ölüm şekline biri olan nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterizedir. Ani iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir (Kane, 1995). Bu tür de 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).

Apoptoz, eski Yunanca "apo" (ayrı) ve "ptosis" (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk

etmesi ve arkadan gelen hücelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi James Cormack'ın önerisiyle "apoptoz" olarak adlandırılmıştır (Cummings ve ark., 1997).

Her hücre, doğar, büyür, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. 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 patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (Mcphie ve ark., 2003). Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozun karsinogenezisde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, 1994).

Apoptoz, 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 apoptoz yolu ile yok edilmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptoz yoluyla gerçekleşir. Apoptoz, 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 apoptoz yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Erdoğan, 2003).

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer bir şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Bu parçalara apoptotik cisimcikler de denilir. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlarındaki hücre tarafından (bunlar genelde histiyositlerdir) fagosit edilerek ortadan kaldırılır (Lipponen ve ark., 1994).

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 ölümlerinin engellenmesinde önemli görülmektedir. Bu etkenler UV radyasyonu gibi dış kaynaklı etkenler olabileceği gibi metabolik bozukluklara bağlı olarak biriken metabolitler de olabilir.

UV radyasyonu, oksijen radikallerinin üretimini arttırarak hücre membranının hasarlanmasına ve DNA kırıklarının oluşmasına neden olarak hücrenin ölümüne ya da kanser hücresine 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).

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.

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 (epidermisin dökülmesi) 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 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 meydana gelmekte 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.

2.7.3. Genotoksisite

Genotoksisite DNA zincir kırıkları ile karakterize olduğundan “Comet Assay” ile belirlenebilmektedir. 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. tarafından geliştirilen comet metodu modifiye edilerek uygulanmıştır (Singh ve ark., 1988).

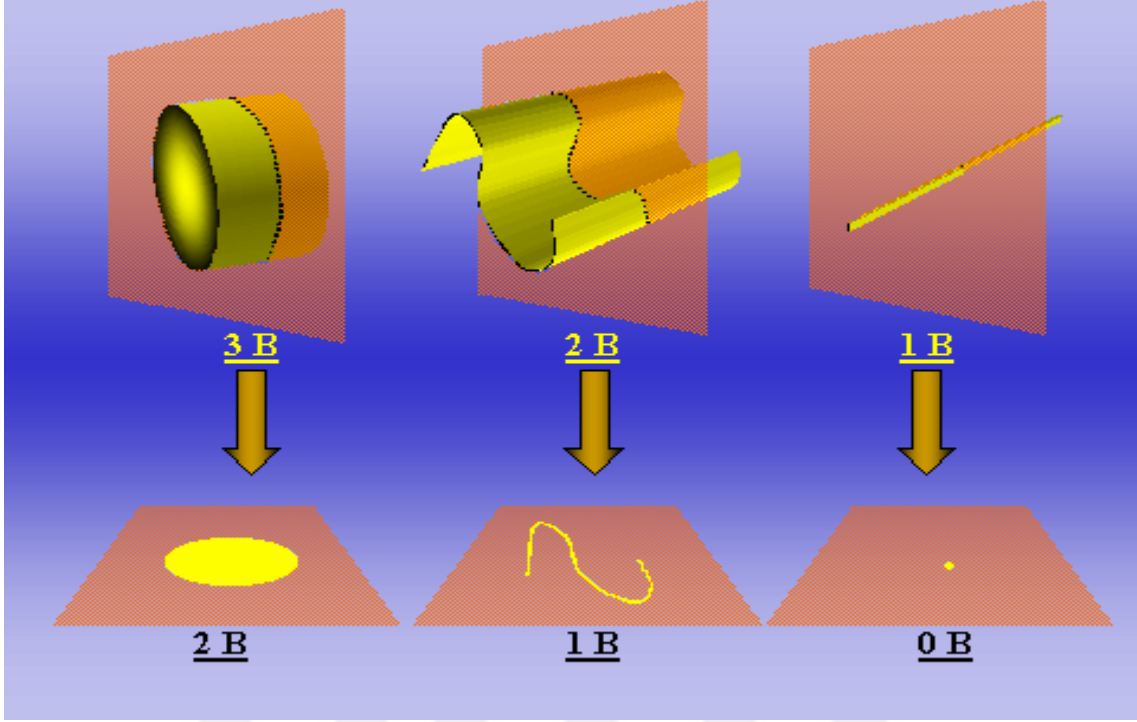
Oksidatif stresin kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin temelinde yer aldığı belirlenmesinden sonra araştırmalar antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidanlar farklı mekanizmalarla oksidatif hasarı önlemekte, sınırlamaktadır. Antioksidan özelliği bilinen çeşitli maddelerin klinik kullanımına ilişkin çalışmalar yürütülürken bir yandan da yeni bir takım bitkisel moleküllerin antioksidan özellikleri olup olmadığı araştırılmaktadır. “Comet Assay”, sayıları büyük bir hızla artmakta olan in vivo ve in vitro antioksidan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Briviba ve ark., 2008; Di Giacomo ve ark., 2009; Silva ve ark., 2009).

2.8. Çalışmamızda Kullandığımız 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.

Tablo 3. Stereolojik sondalar ve objelerde duyarlı oldukları geometrik özellikler

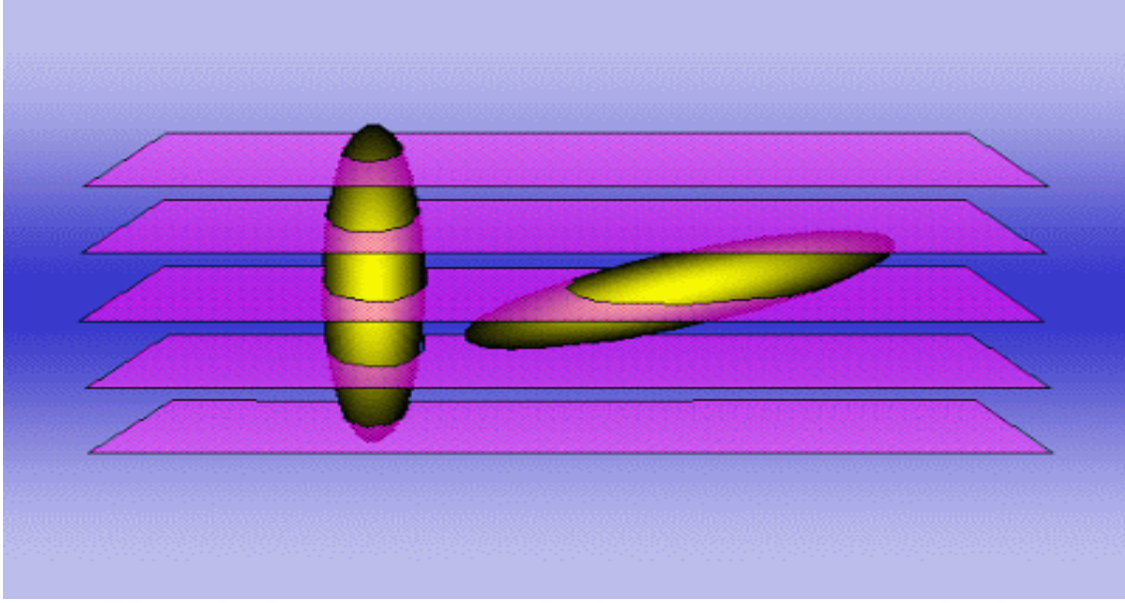
Sonda	Disektör(3B)	Düzlem(2B)	Çizgi(1B)	Nokta(0B)
Özellik	Sayı(0B)	Uzunluk(1B)	Yüzey(2B)	Hacim(3B)



Şekil 6. İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 13.07.2015)

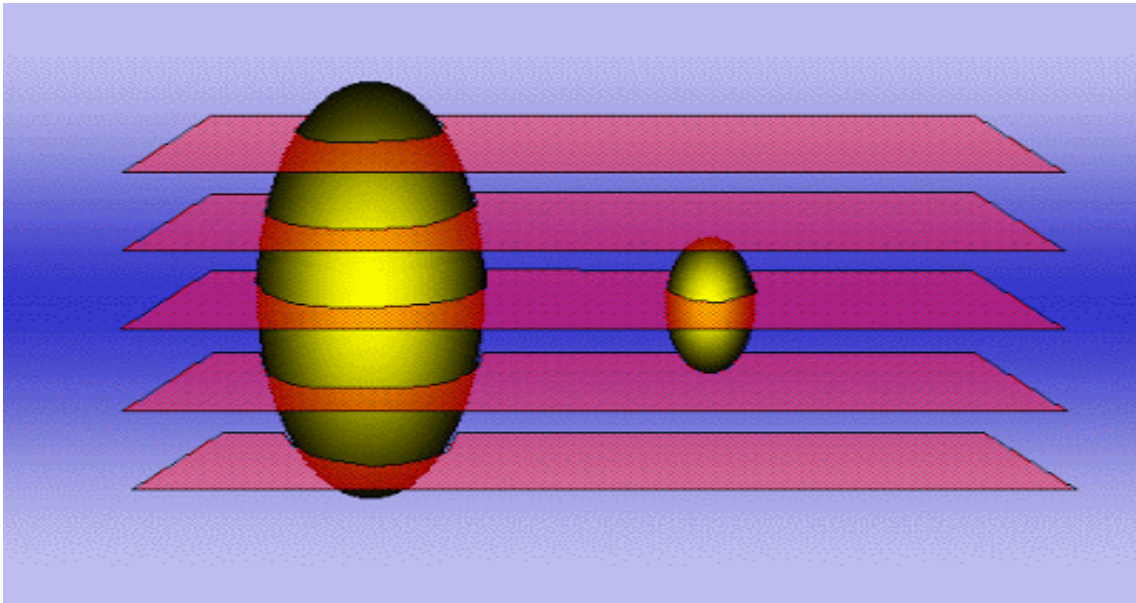
Stereolojide, objelerin geometrik özellikleri yine geometrik özellikte olan sondalarla belirlenir. Farklı boyutlardaki geometrik sondalar objelerin farklı geometrik özelliklerine duyarlıdırlar. Benzer şekilde objelerin sahip oldukları dört adet geometrik özelliğin her biri için duyarlı olan ayrı bir sonda vardır.

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 imkansızdır. Sayı ancak üç boyutlu bir örneklem sondası ile örneklenabilir.



Şekil 7. Taneciklerin yöneliminin kesitlerle örneklenme şansına etkisi. (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 13.07.2015)

Sözelimi, 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 7 ve 8).



Şekil 8. Tanecik büyüklüğünün örneklenme şansına etkisi (<http://stereoloji.blogspot.com.tr/p/stereoloji-nedir.html>. Erişim tarihi: 13.07.2015)

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 (Şekil 7). 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.

Kesit alma doğrultusuna göre partiküllerin yönelimlerinin, örneklenme ihtimali ile olan ilişkisi şematize edilmiştir. Uzun eksen kesit alma doğrultusuna paralel olan, veya, kesit düzlemine dik olarak yerleşim gösteren partiküller, eğik veya kesit düzlemine paralel yerleşmiş olanlara göre daha fazla kesit tarafından isabet alma şansına sahip olacaklardır (Şekil 8). Sonuçta, partiküllerin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin sayısı (yani partiküllerin seri kesitler tarafından örneklenme ihtimali), partiküllerin boyutları ve yönelimlerinin de etkili olduğu bir parametredir ve bu parametreden yola çıkılarak partikül sayısına ulaşmak istendiğinde, izdüşüm sayısına etkide bulunan bu faktörleri ortadan kaldırabilecek bir örnekleme mantığı uygulanmalıdır. Bu da ancak, iki boyutlu kesitler bu tip yanıltıcı bilgiler içerdiğinden, üç boyutlu örnekleme stratejileri ile gerçekleştirilebilir.

Sonda ile objenin geometrik özelliklerini belirleyebilmek için ilgili sonda 3B ortamda ilgilenilen objeye ratsgele 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.

2.8.1. 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 içerdiği nokta miktarı da azalır (Korkmaz ve ark., 2002).

2.8.2. 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 içerdiği 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 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 $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 'yi aşmaması için laboratuvar sürekli olarak aspiratör ile havalandırılmıştır.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 24 adet erkek Wister-Albino sıçan kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde üretilmiş olup, deney süresince 12;12 saat aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı ($22\pm2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (% 45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yapılmıştır.

Deney grupları:

Çalışmada her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde oluşturulan toplam 4 grup aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu:

- 1. Kontrol grubu:** Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir muamelede bulunulmadı;
- 2. UVA grubu:** Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle (10:00'dan-12:00'a kadar) 30 cm uzaklıktan UVA (1.25 mW/ cm^2) 'ya maruz bırakıldı.
- 3. UVA + CAPE grubu:** Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle (10:00'dan-12:00'a kadar) 30 cm uzaklıktan UVA (1.25 mW/ cm^2) 'ya maruz bırakıldı. UVA uygulamasından 30 dk önce her gün $10\text{ }\mu\text{mol/kg/gün}$ CAPE (Yılmaz ve ark., 2004a) i.p. yolla deney hayvanlarına uygulandı.

4. UVA + ERD grubu: Bu gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle (10:00'dan-12:00'a kadar) 30 cm uzaklıktan UVA (1.25 mW/cm^2) 'ya maruz bırakıldı. UVA uygulamasından 30 dk önce her gün 10 mg/kg/gün ERD (Yılmaz ve ark., 2004b) oral yolla deney hayvanlarına verildi.

Sıçanlara bu uygulamalar sırasında standart diyet (protein % 24, lizin % 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 Tıraşlanması

Deney hayvanları sinbo marka tıraş makinası ile sırt bölgelerinden yaklaşık 15 cm^2 'lik alanı kapsayacak şekilde tıraş edildi. Tıraşlama işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce yapıldı ve bunu takiben çalışmanın devam ettiği 30 gün içerisinde haftada bir kez olmak şartıyla toplamda çalışma boyunca beş kez deney hayvanları tıraşlandı. Uygulama gruplarının yanında kontrol grubu da olası standart sapmayı bertaraf etmek için aynı muameleye maruz bırakılmıştır.

3.3. Etkinliği Araştırılan Moleküllerin Uygulanması

CAPE: Çalışmamızda CAPE UVA uygulamasından 30 dk önce her gün 10 $\mu\text{mol/kg/gün}$ (Yılmaz ve ark., 2004a) olacak şekilde i.p. olarak UVA+CAPE grubundaki sıçanlara verilmiştir. Gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVA'ya maruz bırakılmıştır.

ERD: Çalışmamızda ERD UVA uygulamasından 30 dk önce her gün 10 mg/kg/gün (Yılmaz ve ark., 2004b) olacak şekilde oral yolla UVA+ERD grubundaki sıçanlara verilmiştir. Gruptaki hayvanlar 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVA'ya maruz bırakılmıştır.

3.4. UVA Işınının Uygulanması

126 cm boy, 30 cm yükseklik ve 65 cm eninde ratların standart kafeslerinin rahatlıkla sığdırılabileceği büyük bir (ahşap) kafes tasarlandı. Yaptırılan bu ahşap kafesin üst kısmına Philips markalı UVA (1.25 mW/cm^2) lambası monte edildi. 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVA ışını sıçanlara verildi. Koruyucu ekipmanlar ile gerekli önlemler alınarak deney süresince sıçanların genel durumları gözlemlendi.



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

3.5. 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, CAPE (Alfa Aesar LOT:F28X215), ERD (Evosten 175 mg/5 ml Toz).

3.6. 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 derin donduruculu 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.

3.7. Kan Ve Doku Örneklerinin Hazırlanması

Kan ve doku örneklerinin alınması amacıyla gruplardaki hayvanlara etkinliği araştırılan maddeler (CAPE, ERD) verilip, UVA 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. Bu işleminden sonra elde edilen süpernatantlar spektrofotometrik analizler için kullanıldı (Xia ve ark., 1994; Marklund).

3.8. Stereolojik Çalışmalar İçin Doku Örneklerinin Alınması Ve İşlenmesi

Histolojik çalışmalar, genel olarak çeşitli organlardan doku kesitleri alınarak bu örneklerin histo-patolojik 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 incelenmesini sağlamak için yapılması 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.

3.8.1. 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 glüteraldehit solüsyonu
- % 70–90 etanol solüsyonu
- Bouin solüsyonu
- Zenker solüsyonu

Solüsyon seçimi dokunun özelliğine bağlı olarak değişebilir. Örneğin yağ bakımından zengin dokuların tespitinde alkol uygun değildir.

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

3.8.2. 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 geçirilir. Her bir basamakta tutma süresi doku türüne ve uygulanacak boyama yöntemine göre değişmektedir. Bu süre 15 dakika ile 1 saat arasındadır.

3.8.3. Saydamlaştırma

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



Şekil 10. Dehidratasyon serisi (<http://www.dicle.edu.tr/Contents/c6a20279-52b8-4c4f-bfa2-ba9fe2a400aa.pdf>, Erişim tarihi: 15.07.2015)

3.8.4. 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.

3.8.5. Blok hazırlama

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

3.8.6. Kesit hazırlama

İçerisinde doku bulunan parafin blok, mikrotom olarak adlandırılan dilimleyici alete monte edilerek kesilir. Çalışmamızda deri dokusu 4 µm kalınlığında her 40 kesite bir kesit almak üzere 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. Doku kesitlerinin lam üzerine alınması (<http://www.dicle.edu.tr/Contents/c6a20279-52b8-4c4f-bfa2-ba9fe2a400aa.pdf>, Erişim tarihi: 15.07.2015)

3.8.7. 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. Etüvden 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.

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. Boyaların çoğu suda, bazıları ise alkol veya asetonda eritilerek hazırlanır. Tek bir boyama yöntemi ya da çoğu zaman birkaç boyama yöntemi bir arada kullanılarak boyama

gerçekleştirilir (Firidin, 2004).

Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında rutin olarak genellikle hematoksilen-eosin birleşik boyama yöntemi kullanılmaktadır. Biz 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 oldu.

3.9. Analizlerin Yapılması

3.9.1. TAS ölçüm tayini

TAS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedürlerinde 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).

3.9.2. TOS ölçüm tayini

TOS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedürlerinde belirtildiği gibi spektrofotometre cihazında 530 nm’de ölçüm yapılmıştır. Birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L’dir (Erel Ö., 2005).

3.9.3. OSİ’nin hesaplanması

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

3.9.4. Apoptozun tesbiti

- 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 santrifüj edildi.
- Yeni tüplere aktarıldı ve 70 °C desu banyosunda her tüpe ısıtılmış 200µl elution buffer eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüpte biriken sıvı kullanılarak 155 voltta 45 dakika boyunca jelde yüzdürüldü.

3.9.5. Comet assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) yöntemi ile genotoksisite tayini

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.

3.9.6. Stereolojik çalışmalar için doku preparatlarının incelenmesi

Hazırlanan doku preparatları ışık mikroskopunda 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 ve 6).

3.10. İstatistiksel Analizler

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler, medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değeri olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi % 1 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

UVA'nın deride oluşturduğu oksidatif, genotoksik ve DNA hasarına karşı, CAPE ve ERD'nin koruyucu etkisini in vivo olarak incelediğimiz bu çalışmadan elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde kendi içinde başlıklara ayrılmış şekilde aşağıda verilmiştir.

Gruplar:

(1) Kontrol (K); (2) UVA; (3) UVA+ERD ve (4) UVA+CAPE olarak adlandırılmıştır.

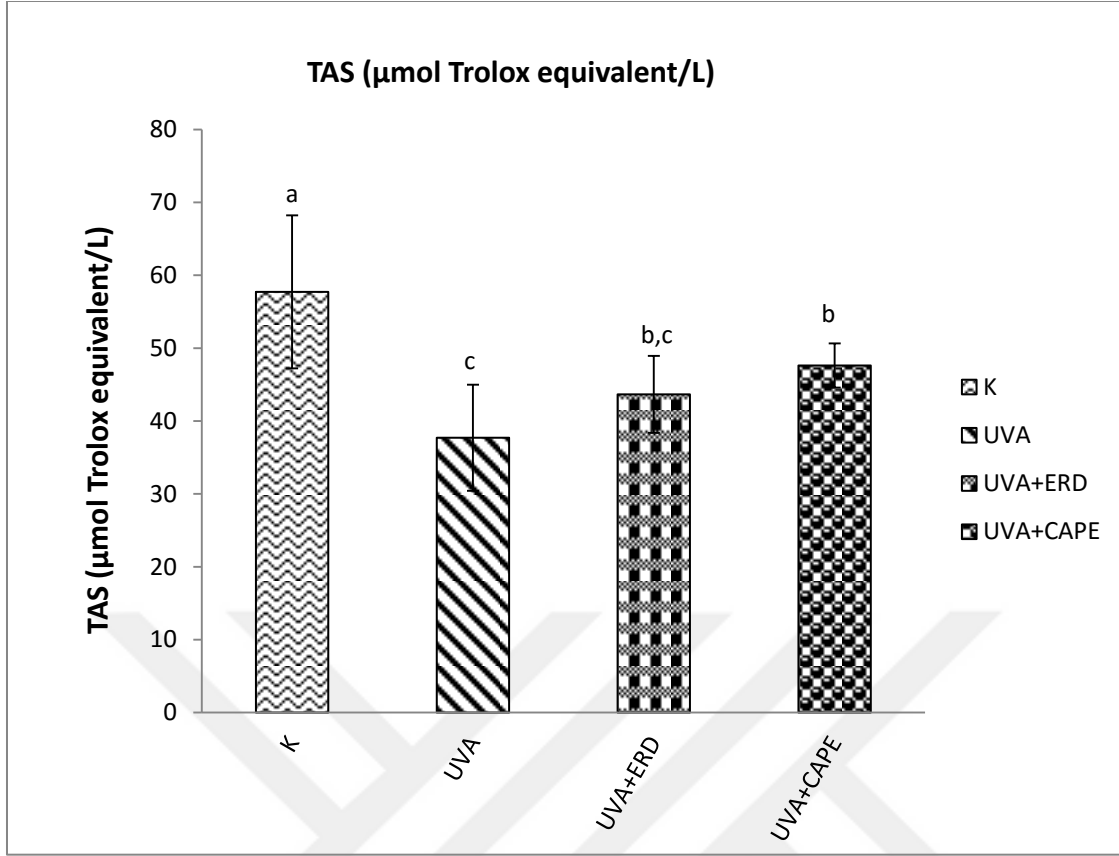
4.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları

Deri dokusunda bakılan oksidatif stres belirteçlerinin (TAS, TOS, OSİ) tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırmalı sonuçları Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. Deri dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

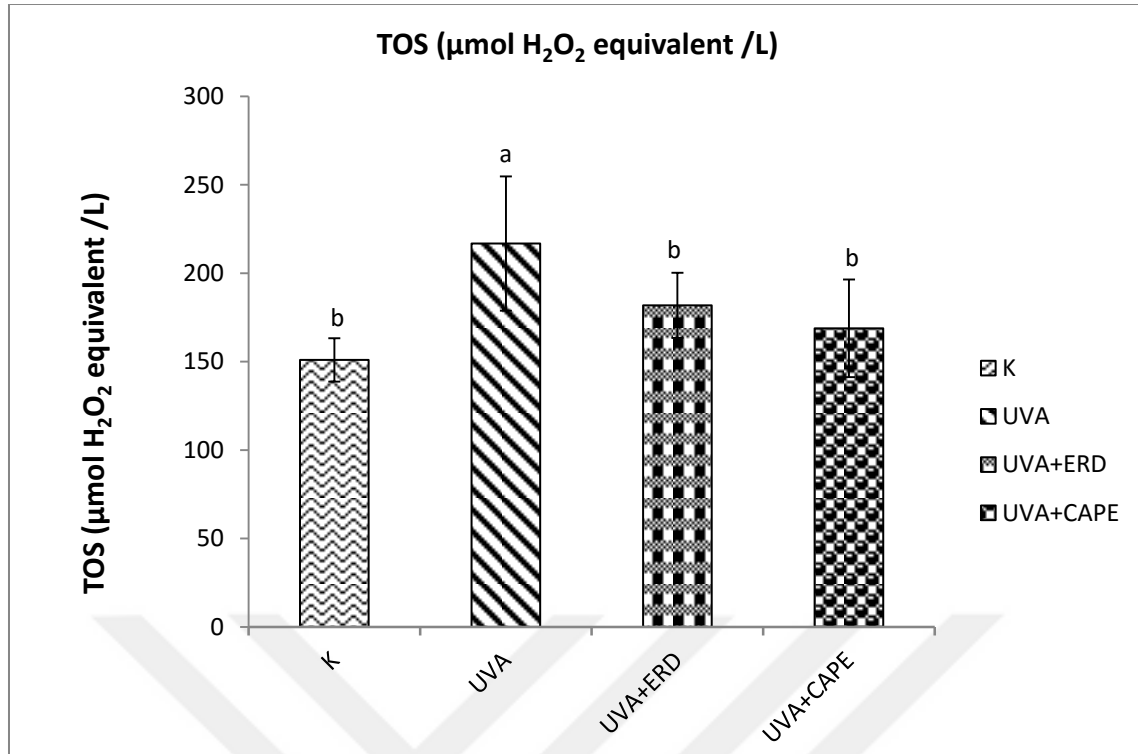
	Grup	Median	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	P.
TAS	K	59.720 a	57.719	10.495	43.470	71.250	0.005
	UVA	38.820 c	37.708	7.286	25.000	46.250	
	ERD	45.550b,c	43.657	5.290	36.670	48.750	
	CAPE	47.015 b	47.617	3.028	43.750	51.390	
TOS	K	149.590 b	150.986	12.22	138.21	167.48	0.007
	UVA	221.950 a	216.803	37.976	156.1	266.67	
	ERD	176.425 b	181.845	18.438	162.6	213.01	
	CAPE	165.855 b	168.835	27.6	139.84	206.5	
OSİ	K	0.272 c	0.270	0.058	0.207	0.347	0.000
	UVA	0.567 a	0.599	0.182	0.371	0.924	
	ERD	0.406 b	0.423	0.083	0.347	0.581	
	CAPE	0.350 b,c	0.353	0.043	0.307	0.404	

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



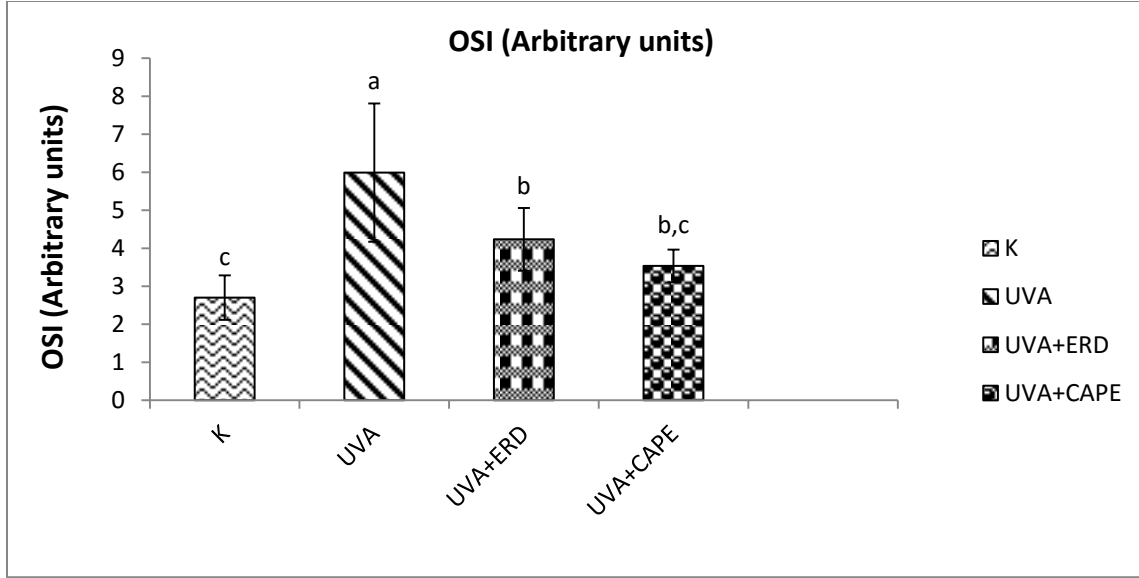
Şekil 12. Deri dokusu TAS değerlerinin grafiği (**a:** UVA, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** K ve UVA gruplarına göre fark anlamlıdır, **c:** K ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır.)

UVA'nın uygulandığı bütün gruplar K grubu ile kıyaslandığında TAS seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.01$) düşüş gözlenmiş iken, UVA+CAPE grubunda UVA grubuna göre tekrardan anlamlı ($p<0.01$) bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Deri dokusu TOS değerlerinin grafiği (**a:** K, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** UVA grubuna göre fark anlamlıdır.)

Şekil 14’de değerlendirme yapıldığında UVA grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.01$) yüksektir. Ancak UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında UVA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüşler ($p<0.01$) not edilmiştir.



Şekil 14. Deri dokusu OSI değerlerinin grafiği (a: K, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, b: K ve UVA gruplarına göre fark anlamlıdır, c: UVA ve UVA+ERD gruplarına göre fark anlamlıdır.)

Gruplara ait olan OSI değerleri kıyaslandığında UVA ve UVA+ERD gruplarında, K grubuna göre anlamlı ($p < 0.01$) bir artış, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise UVA grubuna göre anlamlı düşüşler ($p < 0.01$) görülmektedir (Şekil 15).

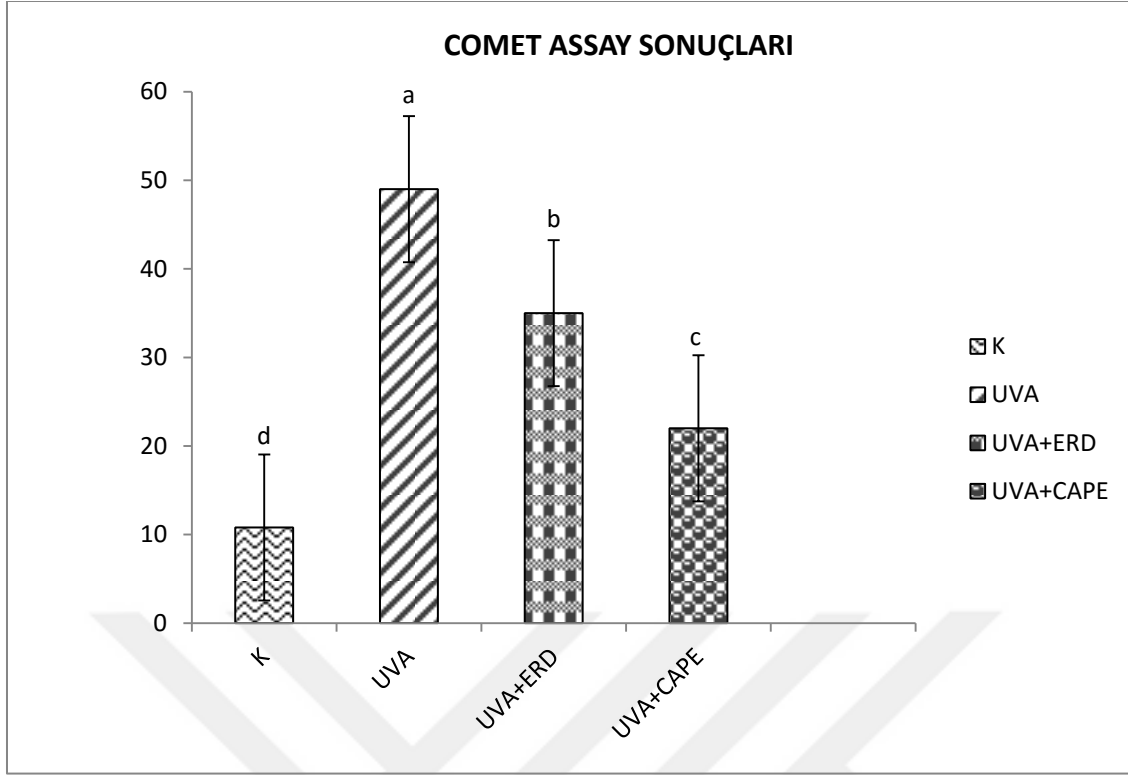
4.2. Antigenotoksik Etkilerin Analiz Bulguları

Kan dokusunda comet assay yöntemi ile belirlenen antigenotoksik etkilerin karşılaştırmalı bulguları verilmiştir.

Tablo 5. Kan dokusu comet assay sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

	Grup	Medyan	Ortalama	Standard Deviation	Minimum	Maximum	P.
Comet assay	K	10.00	10.80 d	2.95	7.00	15.00	0.001
	UVA	48.00	49.00 a	14.04	33.00	70.00	
	ERD	33.50	35.00 b	7.72	26.00	45.00	
	CAPE	22.50	22.00 c	7.43	11.00	31.00	

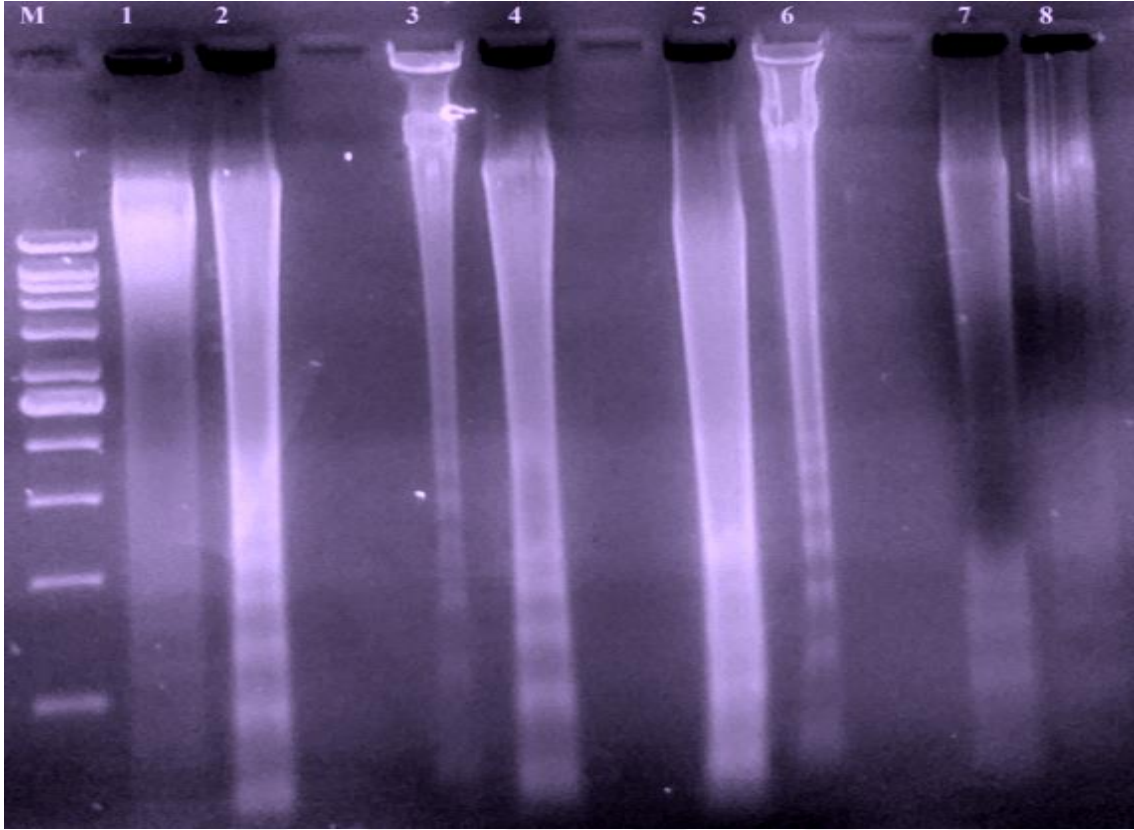
Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.001$).



Şekil 15. Kan dokusu comet assay değerlerinin grafiği (**a:** K, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, **b:** K, UVA ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, **c:** K, UVA ve UVA+ERD gruplarına göre fark anlamlıdır, **d:** UVA, UVA+CAPE ve UVA+ERD gruplarına göre fark anlamlıdır).

Comet assay değerleri kıyaslandığında bütün gruplarda, K grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) bir artış, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise UVA grubuna göre anlamlı düşüşler ($p<0.001$) görülmektedir (Şekil 16).

4.3. Kan Dokusu Apoptoz Görüntüsü



Şekil 16. Kan dokusu apoptoz görüntüsü (M: Markır, 1.-2.Bant: UVA+CAPE, 3.-4.Bant: UVA+ERD, 5.-6. Bant: UVA, 7.-8.BANT: Kontrol).

Çalışmamızın apoptoz görüntüsü analiz edildiğinde kontrol grubunda DNA kırığı olmadığı UVA hasarı oluşturulan gruplarda ise DNA kırıklarının arttığı görülmüştür. Sadece UVA hasarının olduğu bantlarda (5-6) kırık sayısı en fazla olup, ERD (3-4) ve CAPE (1-2) ile hasarın tedavi edildiği gruplarda ise kırıkların olduğu ancak sadece hasar oluşturulan gruba göre kırıkların azaldığı tesbit edilmiştir (Şekil 17).

4.4. Stereolojik Bulgular

Deri dokusunda stereoloji yöntemi ile belirlenen etkilerin karşılaştırmalı bulguları verilmiştir.

Tablo 6. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre Dermis Total hacim CE ve CV değerleri

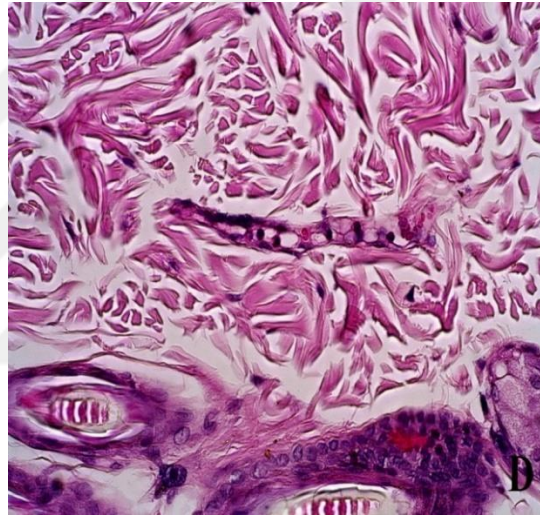
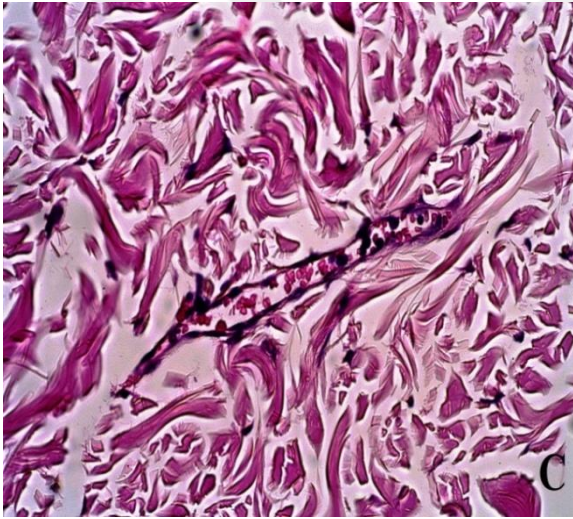
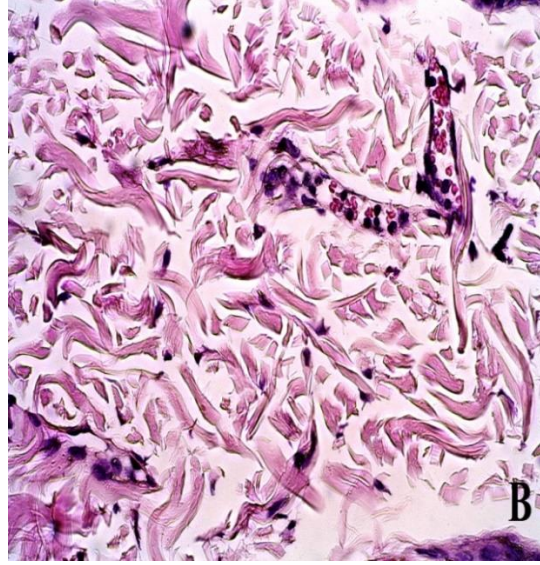
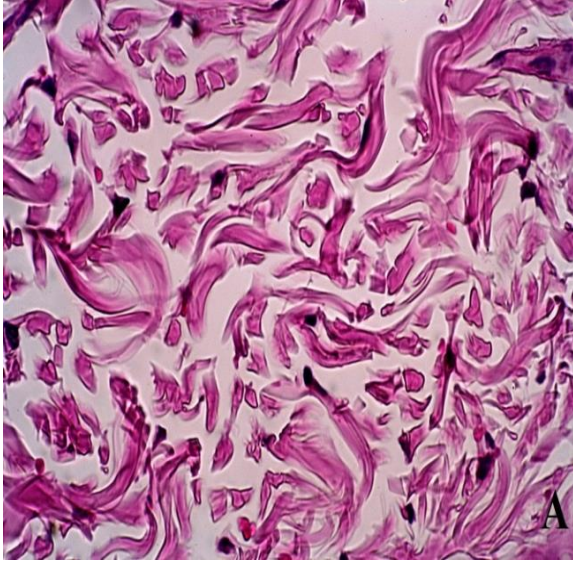
GRUP ADI	SIÇAN SAYISI	TOTAL NOKTALAR	CE	CV	TOTAL VOLÜM	CV
K	1	323	0.055	0.23307	80750000	0.29503
	2	298	0.057		107280000	
	3	455	0.046		163800000	
	4	590	0.040		212400000	
	5	402	0.049		144720000	
	6	488	0.045		175680000	
UVA	1	557	0.042	0.1557	200520000	0.15454
	2	499	0.044		179640000	
	3	739	0.036		265332736	
	4	474	0.045		170640000	
	5	517	0.043		186120000	
	6	594	0.040		213840000	
UVA+ERD	1	650	0.039	0.08801	234000000	0.08797
	2	603	0.040		217080000	
	3	728	0.036		262080000	
	4	697	0.037		250920000	
	5	669	0.038		240840000	
	6	795	0.035		286200000	
UVA+CAPE	1	666	0.038	0.09517	239760000	0.09521
	2	643	0.039		231480000	
	3	770	0.035		277200000	
	4	579	0.041		208440000	
	5	598	0.040		215280000	
	6	630	0.039		226800000	

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

Tablo 7. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre Dermis Damar hacminin CE ve CV değerler

GRUP ADI	SIÇAN SAYISI	DAMAR NOKTALAR	CE	CV	DAMAR VOLÜM	CV
K	1	51	0.149	0.44002	326400	0.44182
	2	60	0.132		384000	
	3	63	0.129		403200	
	4	98	0.102		627200	
	5	153	0.083		979200	
	6	59	0.132		377600	
UVA	1	222	0.068	0.49874	1420800	0.49931
	2	178	0.076		1139200	
	3	206	0.071		1318400	
	4	176	0.077		1126400	
	5	391	0.054		2502400	
	6	571	0.044		3654400	
UVA+ERD	1	796	0.039	0.21874	5094400	0.21867
	2	561	0.046		3590400	
	3	431	0.050		2758400	
	4	470	0.047		3008000	
	5	606	0.042		3878400	
	6	479	0.049		3065600	
UVA+CAPE	1	581	0.043	0.17338	3718400	0.17338
	2	476	0.048		3046400	
	3	577	0.044		3692800	
	4	490	0.047		3136000	
	5	329	0.057		2105600	
	6	463	0.049		2963200	

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

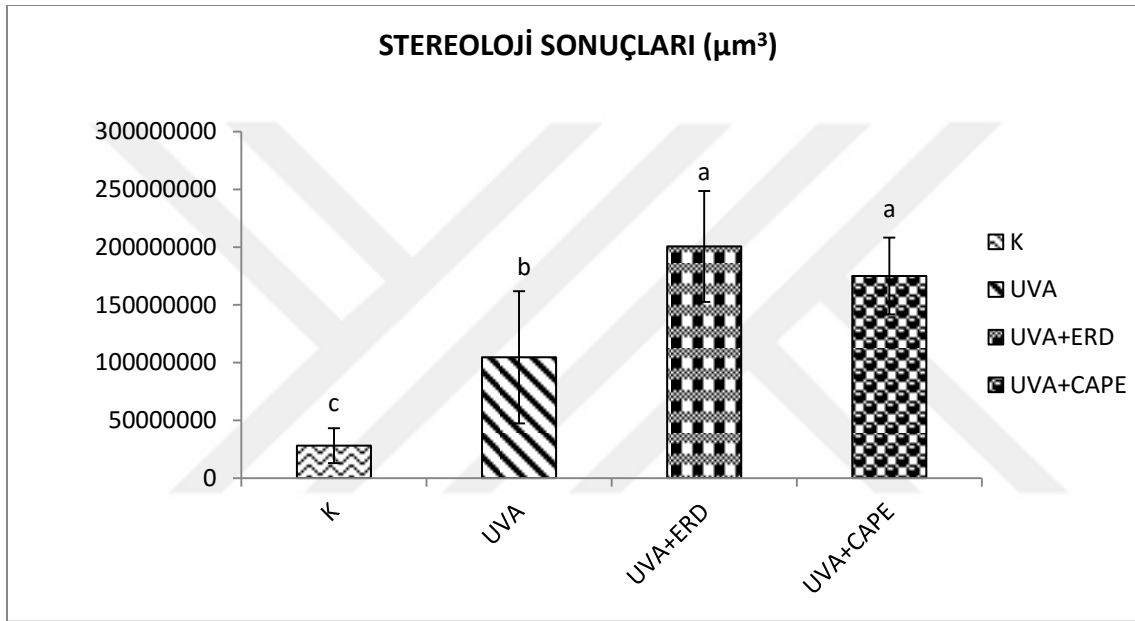


Şekil 17. Doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri (H&E Obj X 40: A-D) (A) Kontrol; (B) UVA; (C) UVA+ERD; (D) UVA+CAPE.

Tablo 8. Deri dokusu stereoloji sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

	Grup	Median	Ortalama	Standard Deviation	Minimum	Maximum	P.
DAMARIN HACMİ	K	22140000.00	28105000.00 c	15058427.21	12750000.00	55080000.00	0.001
	UVA	76941423.29	104607141 b	57255239.87	63360000.00	205560000.00	
	ERD	187200000.00	200580000 a	48048020.98	155160000.00	286560000.00	
	CAPE	173880000.00	174960000 a	33229384.59	118440000.00	209160000.00	

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



Şekil 18. Deri dokusu stereoloji değerlerinin grafiği (Birim: μm^3)

(a: UVA, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, b: K,UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre fark anlamlıdır, c: K ve UVA gruplarına göre fark anlamlıdır.)

Stereoloji (Hacim Fraksiyonu) sonuçları değerlendirildiğinde UVA grubunda, K grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 18).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda ozon tabakasının incilmesiyle güneşten dünyaya ulaşan UV miktarı artmıştır. Bunun dışında sıcak bölgelerde tatil yapılması, güneşlenme saatlerine dikkat edilmemesi, dışarıda geçirilen süre zarfında güneş ışınlarından tam anlamıyla korunmanın sağlanmaması ve teknoloji ile hayatımızın her alanına giren cihazların UV yayması insanların yoğun olarak UV'ye maruz kalmasına sebep olmuştur. Bu maruziyetin artması ile UV'nin zararlı etkileri de artış göstermiştir. Stratosferik ozondan başka faktörler de dünyamıza ulaşan UV radyasyon miktarını etkilemektedir. Güneş ışınlarının yeryüzüne eğik veya dik gelmesi yeryüzüne ulaşan UV radyasyon miktarını etkiler. Bunun yanında, güneşin gün içerisindeki konum değişikliği, atmosfer içerisinde geçen UV radyasyon miktarını etkiler. Güneş gökyüzünde alçak olduğunda, sabah ve akşam saatlerinde ışınlar atmosfer içerisinde daha uzun bir mesafe kat etmektedir ve su buharı ile diğer atmosferik bileşenler tarafından saçılmaya uğrayabilir ve yutulabilirler. Güneş kendisinin en yüksek noktasında olduğunda (öğlen), yani gün ortası civarında UV'nin daha büyük miktarları dünyaya ulaşır. Ayrıca topoğrafik yükseklik de etkilidir. Hava parselleri dağ zirvelerinde daha temiz ve daha az yoğunluktadır, bundan dolayı daha fazla UV'yi geçirir. Bulut dünya yüzeyine erişen UV radyasyonun miktarı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İnce bulut örtüsünden çok daha fazla UV radyasyon geçişi olur (Mutlu ve ark., 2003).

Güneş enerjisi içinde önemli bir bölümü oluşturan UV radyasyonu, dalga boylarına göre 3'e ayrılmaktadır. Bu ışınlar UVA (dalga boyu 320-380 nm), UVB (dalga boyu 280-320 nm) ve UVC (dalga boyu 280 nm'den küçük olanlar) olarak adlandırılmaktadır. UVC ozon tabakası tarafından tutulduğu için normal atmosfer şartlarında yeryüzüne ulaşmaz. Normal şartlarda UVA ve UVB ise yeryüzüne ulaşır. UV ışınları içerisinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan UVA ışınıdır. Ancak, UVA ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan geçebilmektedir. Dermis olarak bilinen içderiye kadar nüfuz edebilmektedir. Bu yüzden erken yaşlanmaya ve deride kırışıklıklara, deri kanserinin ilerlemesine neden olmaktadır (Gill ve ark., 1987; Coohill ve ark., 1987). Mutajenik etkileri kıyaslandığında UVB'nin mutajenik potansiyelinin UVA'dan çok daha yüksek olduğu farkedilir. Fakat, buna rağmen UVA'da küçümsenmemelidir. Bunun birinci sebebi, UVA'nın UVB'den yaklaşık 30 kat daha fazla dünya yüzeyine ulaşmasıdır, ikinci sebebi de UVA'nın derinin daha derinlerine (dermise) penetre olmasıdır (Bruls ve ark., 1984).

Güneş ışığındaki UVA'ya maruz kalan insan vücudundaki ilk bölge deridir ve diğer organlar da kan dolaşımı yoluyla etkilenmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar UVA'nın en az UVB kadar mutajenik ve karsinojenik olduğunu göstermiştir. Tümör oluşumuna neden olan UVA, UVB'nin tümör indüksiyonunda gereksinim duyduğu enerjiden daha fazlasına ihtiyaç duyar (Strickland, 1986). Sevin ve ark. (2007) UVA'nın deri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında UVA'nın güneş yanığı ve dermo-epidermal aktiviteyi artırdığını göstermişlerdir.

Breuckmann ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmalarında ise UV etkisinin UVB üzerinden doğrudan DNA yıkımı veya UVA üzerinden ROS aracılığıyla oluşan dolaylı yıkımlarla tetiklendiği sonucunu elde etmişlerdir. ROS diğer adıyla serbest radikaller vücudumuzda besinlerin oksijen kullanarak enerjiye çevrilmesi sırasında oluşan metabolik yan ürünlerdir. Serbest radikaller kararsız bir yapıdadırlar ve kararlı hale gelmek için hücrelere saldırarak hasar oluştururlar. Antioksidanlar ise serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri bu hasarlardan korurlar. Serbest radikaller ve antioksidanlar vücut içerisinde belirli bir dengede olduğu müddetçe, antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirebilir. Aksi halde serbest radikal seviyesi, antioksidan seviyesine göre artarsa serbest radikaller hücrelerde oksidatif hasarlara yol açar ve bu durumda oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres, ROS'daki artışa bağlı olarak meydana gelen doku zedelenmesinin göstergesidir. UVA'nın ROS da artışa sebep olduğu bilimsel çalışmalarla belirlenmiştir (Breuckmann ve ark.,2004).

Literatürde deri hasarına sebep olduğu bilinen UVA'nın zararlı etkisini ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli antioksidan maddeleri kullanmak çalışmamızın temelini oluşturmaktadır.

Çalışmamızda olası antioksidan etki göstermesi beklenen CAPE ve ERD kullanılmıştır. Deneysel ve klinik çalışmalar ERD'nin antioksidan olarak serbest radikal temizleyici fonksiyonlarını göstermiştir (Dechant ve ark., 1996; Yildirim ve ark., 2003). Yapılan bazı çalışmalarda CAPE'nin oksijenden türevlenen serbest radikallerin süpürülmesinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Widjaja ve ark., 2008). Yapmış olduğumuz çalışmamızda ise UVA'nın albino sıçanların derilerinde yol açtığı oksidatif hasara karşı CAPE ve ERD'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. CAPE 10 µmol/kg/gün (Yilmaz ve ark., 2004a) i.p. yolla, ERD ise 10 mg/kg/gün (Yilmaz ve ark., 2004b) oral yolla deney hayvanlarına uygulanmıştır. Bu maddelerin oluşan UVA hasarının tedavisindeki etkinliğini tesbit etmek amacıyla sıçanların deri dokusunda TAS, TOS, OSI

parametrelerine bakılmış ve deri dokusu stereolojik olarak incelenmiştir. Kan dokusunda ise CAPE ve ERD'nin antiapoptotik ve antigenotoksik etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda antioksidan kapasiteyi temsil eden TAS ölçüm sonuçları gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde sonuçların anlamlı olduğu görülmüştür. UVA'nın uygulandığı bütün gruplar K grubu ile kıyaslandığında TAS seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş gözlenirken, UVA+CAPE grubunda UVA grubuna göre tekrardan anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 13). Bu değer UVA'nın oksidatif hasar oluşturduğu bilgisini desteklerken (İbrahim, 2015). CAPE'nin de antioksidan etkisini ortaya koymuştur. CAPE'nin antioksidan etkisi literatür ile uyumludur (Özyurt ve ark., 2001; Atik ve ark., 2006; Güney ve ark., 2007).

TOS sonuçları değerlendirildiğinde UVA grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede yüksektir (Şekil 14). Bununla beraber UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında UVA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüşler not edilmiştir. Sonuçlar UVA'nın oksidan seviyeyi gruplarda arttırdığını göstermektedir. Önceki yapılan bir çalışmada da UVA'nın ROS'u arttırdığı ve fotoyaşlanmaya sebep olduğu sonucu elde edilmiştir (Hiramoto ve Yamate, 2015). Çalışmamızda UVA uygulanan gruplarda gözlemlenen TOS seviyesindeki artış UVA'ya bağlı artmış oksidatif stresi işaret etmektedir. Antioksidan etki göstermesi beklenen CAPE (Atik ve ark., 2006) ve ERD (Braga ve ark., 2000) maddelerinin de beklenen etkiyi oluşturdukları ulaşılan literatürle uyumludur.

OSI ise, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenmektedir (Kösecik ve ark., 2005). Gruplara ait OSI değerleri kıyaslandığında UVA grubunda, K grubuna göre anlamlı bir artış, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise UVA grubuna göre anlamlı düşüşler görülmektedir (Şekil 15). Elde edilen OSI değerleri çalışmamızdaki literatür ile uyumlu olan olan TAS ve TOS değerlerini desteklemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz oksidatif stres belirteçlerinin değerleri UVA'nın oluşturduğu deri hasarının tedavisinde kullandığımız CAPE ve ERD'in etkili olduğunu göstermiştir. Ulaşılabilen literatüre göre UVA'nın oluşturduğu deri hasarında CAPE ve ERD'nin antioksidan etkisi ilk defa çalışmamızda tesbit edilmiştir.

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; Bellamy ve ark., 1995). Bu fazda hücre ya DNA onarım yoluna gider (ve sonuç olarak 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 (Lane, 1994; Symonds, ve ark., 1994). Apoptozun en önemli özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. UVA ve UVB radyasyonunun canlılar üzerinde eritem, bronzlaşma, deri elastikiyetinde bozulma gibi etkilerinin yanısıra kanserojen DNA mutasyonlarına sebebiyet verdiği belirtilmiştir (Romanhole ve ark., 2015). Literatürdeki bu çalışmalara paralel sonuçlar elde ettiğimiz çalışmamızda ki apoptoz görüntüleri analiz edildiğinde kontrol grubunda DNA kırığının az olduğu UVA hasarı oluşturulan gruplarda ise DNA kırıklarının arttığı görülmüştür. DNA kırıklarının artışı oluşan UVA hasarını göstermiştir. Başka bir çalışma da UVA'nın p53'e bağımlı apoptozu etkinleştirdiği sonucu elde edilmiştir (Liu ve ark., 2014). Sadece UVA hasarının olduğu bantlarda (5-6) kırık sayısı en fazla olup, ERD (3-4) ve CAPE (1-2) ile hasarın tedavi edildiği gruplarda ise kırıkların olduğu ancak sadece hasar oluşturulan gruba göre kırıkların azaldığı tesbit edilmiştir (Şekil 17). Elde edilen bu veriler tedavi gruplarında kullanılan ERD ve CAPE'nin UVA hasarında antigenotoksik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Ulaştığımız literatüre göre UVA'nın oluşturduğu deri hasarında CAPE ve ERD'nin antiapoptotik etkisi ilk defa çalışmamızda tesbit edilmiştir.

Çalışmamızda sıçanların kandokusunda comet assay yöntemi ile CAPE ve ERD'nin antigenotoksik etkileri incelenmiştir. 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. Kanser oluşumu ile ilişkili olan DNA'daki 8-oxo-dG'nin, UVA'ya maruz kaldıktan sonra meydana geldiği ve ayrıca insan derisindeki sitotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Tyrell ve Pidoux, 1987; Lee ve ark., 1989). Comet assay değerleri kıyaslandığında bütün gruplarda, K grubuna göre anlamlı bir artış, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise UVA grubuna göre anlamlı düşüşler görülmektedir (Şekil 16). Elde edilen bu sonuçlar UVA maruziyetinin DNA'da hasar oluşturduğu bilgisini desteklemiştir. CAPE ve ERD'nin çalışmamızda antigenotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Ulaştığımız literatüre göre UVA'nın

oluşturduğu deri hasarında CAPE ve ERD'nin antigenotoksik etkisi ilk defa çalışmamızda tesbit edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz stereoloji (hacim fraksiyonu) sonuçları değerlendirildiğinde UVA grubunda, K grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülmektedir (şekil 18). Kontrol grubunda normal yapı belirlendi. UVA grubunda sirkülasyon ve dilatasyonun metabolizma artışına yönelik damar hacim yoğunluğu artışı söz konusudur. UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise diğer moleküler ve biyokimyasal bulgularla uyuşan tedavinin olumlu yönde ilerlediğine dair değeriklikler gözlemlendi. Daha önce yapılan bir çalışmada da ultraviyole ve sıcaklık maruziyetinin deride vasküler dilatasyona sebep olduğu bildirilmiştir (Ozkol ve ark. 2015).

UVA'ya maruz kalma sonucu, derinin kollajenin yapısında denatürasyon gibi değeriklikler olur. Sonuçta; çok sayıda iyi ya da kötü huylu tümörler gelişebilir (Robert, 1997). Gerek lkemizde gerek dünya genelinde tedavisi en masraflı olan hastalıklar kanser türleridir. Çalışmamızda kullandığımız CAPE ve ERD'nin UVA ile oluşturulan deri hasarınada koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Kanser türlerinden biri olan deri kanserini önlemede bu maddelerin kullanımının etkili olacağını düşünmekteyiz. Böylelikle etken maddesi CAPE veya ERD olan güneş kremleri UVA 'dan korunmak için kullanılabilir.

UVA'nın deride oluşturduğu oksidatif, apoptotik ve genotoksik etkilere karşın, CAPE ve ERD'nin koruyucu etkisinin literatüre göre ilk kez belirlenmiş olması bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilerin daha ileri alışmlarla desteklenmesi gereklidir.

ÖZET

Zeren E. Albino Sıçanlarda Ultraviyole A ile İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Kafeik Asit Fenetil Ester ve Erdosteinin Antiapoptotik, Antigenotoksik ve Antioksidan Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2016. Yapılan önceki bazı çalışmalarda ultraviyole A (UVA) radyasyonunun oksidatif stres ve DNA hasarına yol açtığı rapor edilirken, kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve erdostein (ERD)'nin antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan UVA hasarına karşı CAPE ve ERD'nin tedavi etkinliği 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 toplam 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar kontrol (K), UVA, UVA+ERD ve UVA+CAPE olarak adlandırıldı. UVA, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarındaki hayvanlar 30 gün boyunca günde 2 saat süreyle UVA ışınına maruz bırakıldı. UVA+ERD grubundaki hayvanlara her UVA uygulamasından 30 dk önce 10 mg/kg ERD oral yolla verildi. UVA+CAPE grubundaki hayvanlara ise her UVA uygulamasından 30 dk önce 10 µmol/kg CAPE intraperitonol (*i.p.*) yolla uygulandı. Bütün hayvanlar otuzuncu günde sakrifiye edildi. Analizler için kan ve deri dokuları alındı. UVA grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.01$) yüksekti. TAS UVA grubunda K grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.01$) düşerken, UVA+CAPE grubunda ise tekrardan anlamlı bir şekilde ($p<0.01$) artmıştır. OSI değerine gelince, UVA grubunda K grubuna göre anlamlı ($p<0.01$) bir artış, UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarında ise UVA grubuna göre anlamlı düşüşler ($p<0.01$) görülmüştür. Çalışmamızın apoptoz görüntüsü analiz edildiğinde K grubunda DNA kırığının az olduğu UVA hasarı oluşturulan gruplarda ise DNA kırıklarının arttığı görülmüştür. ERD ve CAPE verilen gruplarda ise kırıkların olduğu ancak sadece hasar oluşturulan gruba göre azaldığı tespit edilmiştir. UVA grubuna ait comet assay analiz sonucu, K grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) ancak UVA+ERD ve UVA+CAPE gruplarına göre ise anlamlı düzeyde düşük ($p<0.001$) görülmüştür. Stereoloji (hacim fraksiyonu) sonuçları değerlendirildiğinde UVA grubunda, K grubuna göre dramatik ($p<0.01$) bir artış olduğu görülmüştür. Bu çalışma, ERD ve CAPE'nin UVA hasarının tedavisinde faydalı olabildiğini ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Erdostein, Genotoksisite, Kafeik asit fenetil ester, Oksidatif stres, Sıçan, Stereoloji, UVA

SUMMARY

Zeren E. Investigation on the Antiapoptotic, Antigenotoxic and Antioxidant Effects of Erdosteine and Caffeic Acid Phenethyl Ester by Molecular, Biochemical and Stereological Methods in Ultraviolet A-Induced Skin Damage Model of Albino Rats. Yuzuncu Yil University Institute of Health Sciences, Department of Anatomy Master's Thesis, Van, 2016. In some earlier studies, while ultraviolet A (UVA) radiation was reported to cause oxidative stress and DNA damage, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and erdosteine (ERD) were informed to exhibit antioxidant feature. In this study, for the first in the literature, treatment effectiveness of CAPE and ERD 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. Four equal groups were constituted each including 6 Wistar albino rats. These groups were named as control (C), UVA, UVA+ERD and UVA+CAPE. The animals of UVA, UVA+ERD and UVA+CAPE groups were exposed to UVA radiation for 2 hours once a day during 30 days. ERD was orally given to animals of UVA+ERD group at a dose of 10 mg/kg 30 min before each UVA application. CAPE was intraperitoneally (*i.p.*) given to animals of UVA+CAPE group at a dose of 10 μ mol/kg 30 min before each UVA application. All animals were sacrificed on the 30th day. Blood and skin samples were taken for analysis. TOS level of UVA group was significantly ($p<0.01$) higher compared to that of all other groups. While TAS dramatically ($p<0.01$) decreased in UVA group compared to C, its level significantly ($p<0.01$) increased again in UVA+CAPE group. With regard to OSI value, its significant ($p<0.001$) increase was seen in UVA group compared to C and its marked ($p<0.001$) decrease was seen in UVA+ERD and UVA+CAPE groups compared to UVA group. When apoptotic image of our study is analyzed, less DNA fracture was seen in C group whereas increased DNA fracture was seen in groups where UVA damage was formed. Decrement of DNA fracture was determined in ERD and CAPE treated groups compared to UVA group. Comet assay analyze result of UVA group was significantly ($p<0.001$) higher than those of C but this result was markedly ($p<0.001$) lower in UVA+ERD and UVA+CAPE groups compared to UVA group. When groups were compared with each other in terms of stereological values (volume fraction), increment was seen in UVA group compared to C and decrement was seen in this group compared to RJ treated groups. This study revealed that ERD and CAPE could be beneficial in the treatment of UVA damage. Further studies are needed to verify results of this study.

Keywords: Apoptosis, Caffeic acid phenethyl ester, Erdosteine, Genotoxicity, Oxidative stress, Rat, Stereology UVA

KAYNAKLAR

- Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z (1995). UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways, *J Biol Chem*, 270, 44, 26071-26077.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*, 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, MIMOZA Yayınları, 1.Baskı, Konya, 1-132.
- Akyol S, Armutçu F, Yiğitoğlu MR (2011). The Medical Usage of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), an Active Compound of Propolis, in Neurological Disorders and Emergencies, *Spatula DD*, 1, 1, 37-42.
- Albukhari AA, Gashlan HM, El Beshbishy HA, Nagy AA and Abdel Naim AB (2009). Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1689-1695.
- Anonim (2014). Ultraviyole Işınları (Mor ÖtesiIşınlr), <http://gizliilimler.tr.gg/> Ultraviyole. Erişim tarihi; 13.06.2014.
- Arıncı K,Elhan A (1997). Anatomi 2.cilt, Güneş Kitabevi, 2. Baskı, Ankara, 497-508.
- Aruoma OI (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *American Oil Chemists Society*, 75,199-212.
- Atik E, Görür S and Kiper AN (2006). The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury, *Pharmacological Research*, 54, 293-297.
- Ayçiçek A, Erel Ö, Kocyigit A (2005). Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking, *Eur J Pediatr*, 164, 775-778.
- Banks PA, Freeman ML (2006). Practice Parameters Committee of the American College of Gastroentrlogy, Practice guidelines in acute pancreatitis, *Am J Gastroenterol*, 101, 2379-2400.
- Barbor DA, Harris SR (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: A review, *Am Pharmacy*, 34, 9, 26-35.
- Barr PJ, Tomei LD (1994). Apoptosis and its role in human disease, *Bio/Technol*, 12, 487-493.
- Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis, *Semin Cancer Biol*, 6, 3-16.

Berglund CM, Radesater AC, Persson MA, Budd Haeberlein SL (2004). UVinduced apoptosis in SH-SY5Y cells: contribution to apoptosis by JNK signaling and cytochrome, *J Neurosci Res*, 78, 4, 580-589.

Berkow R, Beers MD (1997). M. The Merck Manual of Medical Information, US, 985-988.

Beutler E (1984). Red Blood cell metabolism: A manual of biochemical methods, In Beutler E, Ed. 2 nd Ed. New York: Grune&Stratton Inc, 74-76.

Biagi G, Fregnan G, Gazzani G, Vandoni G (1989). Erdosteine protection from cigarette smoke-induced loss of alpha 1-antitrypsin activity in rat lungs, *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 27, 5, 235-237.

Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Sahin F ve Topçuoğlu N (2006). Propolis ve etken maddeler olan Kafeik Asit Fenetyl Ester (CAPE) ve Sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi, *Ege Tıp Dergisi*, 45, 2, 83-92.

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 virüs infection, *BMC Infect Dis*, 31, 5, 95.

Braga PC, Dal Sasso M, Zuccotti T (2000). Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts, *Arzneimittelforschung*, Aug; 50, 8, 739-746.

Breuckmann F, Gambichler T, Altmeyer P, Kreuter A (2004). UVA/UVA1 phototherapy and PUVA photochemotherapy in connective tissue diseases and related disorders: a research based review, *BMC Dermatol*, 4, 1, 11-24.

Briviba K, Bub A, Möseneder J, Schwerdtle T, Hartwig A, Kulling S, et al (2008). No differences in DNA damage and antioxidant capacity between intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr Cancer*, 60, 2, 164-170.

Bruls WA, Slaper H, Van der Leun JC, Berrens L (1984). Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths, *Photochem Photobiol*, Oct;40, 4, 485-494.

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

Castaldo S and Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia*, 73, 1, 1-6.

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, *Br Med Bull*, 49, 3, 479-480.

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

Coohill TP, Peak MJ, Peak JG (1987). The Effects of the Ultraviolet Wavelengths of Radiation Present in Sunlight on Human, *Photochem. Photobiol*, 46, 6, 1043-1050.

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

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI (1997). Apoptosis, *Am J Surg Pathol*, 21, 1, 88-101.

Dechant KL, Noble S (1996). Erdosteine, *Drugs*, Dec; 52, 6, 875-881.

Di Giacomo C, Acquaviva R, Sorrenti V, Vanella A, Grasso S, Barcellona ML, et al (2009). Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants, *J Med Food*, 12, 1, 145-150.

Eckerson HW, Wyte MC, La Du BN (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism, *Am J Hum Genet*, 35, 1126-1138.

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, *Int J Med Sci*, 8, 2, 139-147.

Erarslan E, Ekiz F, Uz B, Koca C, Turkcu UO, Bayrak R, Delibasi T (2011). Effects of erdosteine on cyclosporine-A-induced hepatotoxicity in rats, *Drug Chem Toxicol*, Jan; 34, 1, 32-37.

Erden Inal M, Kahraman A, Köken T (2001). Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*, 26, 6, 536-539.

Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine, *Urol Res*, 34, 1, 41-46.

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

Erdoğan S, Ateş B, Durmaz G, Yılmaz I and Seçkin T (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from anatolia propolis and their radical scavenging capacities, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1592-1597.

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

- Erel Ö (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, 38, 1103-1111.
- 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.
- Fadillioğlu E, Yılmaz H, Erdogan H, Sogut S (2003). The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: Protective effect of erdosteine, *Toxicology*, 191, 2, 153-158.
- Fadillioğlu E, Erdoğan H, Söğüt S, Kuku I (2003). Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats, *J Appl Toxicol*, 23, 1, 71-74.
- Firidin Ş (2004). SÜMAE YUNUS Araştırma Bülteni, 4-1 Mart 2004, http://www.sumae.gov.tr/yunus/uploads/Makale_040106.pdf. Erişim tarihi; 10.06.2014.
- Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M, (1997). Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis, *J Surg Res*, 71, 127-136.
- Giblin F, Leverenz V, Padgaonkar V ve ark. (2002). UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects, *Exp Eye Res*, 75, 445-8.
- Gill RF, Coohill TP (1987). A Comparison of Mammalian Cell Sensitivity to either 254 nm or Artificial "Solar" Simulated Radiation, *Photochem. Photobiol*, Feb;45, 2, 264-271.
- Girrotti AW (2000). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J Lipid Res*, 39, 1529-1542.
- Goldsmith LA, Epstein EH (1993). Structure and development of the skin. *Dermatology in General Medicine*. Fitzpatrick TB, Eizen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF, Newyork McGraw-Hill, 87-157.
- Gough DB, Boyle B, Joyce WP, Delaney CP, McGeeney KF, Gorey TF ve ark., (1990). Free radical inhibition and serial chemiluminescence in evolving experimental pancreatitis, *Br J Surg*, 77, 1256-1259.
- Gökmen Gövsa F (2003). Sistemik Anatomi, İzmir Güven Kitabevi, İzmir, 910-913.
- 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, *Chem Biol Inter*, 91, 133-140.

Gülçin İ, Bursal E, Şehitoğlu MH, Bilsel M and Goren AC (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 227-238.

Güney M, Oral B, Karahan N and Mungan T (2007). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on fluoride-induced oxidative stress and apoptosis in rat endometrium, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24, 86-91.

Haagen L, Brock A (1992). A new automated method for phenotyping arylesterase (E.C.3.1.1.2.) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 30, 391-395.

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

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

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

Hepşen İF, Tilgen F, Er H (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3, 386-391.

Hikim APS, Wang C, Leung A R, 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.

Hiramoto K, Yamate Y (2015). Gp91phox-derived Reactive Oxygen Species/urocortin 2/corticotropin-releasing Hormone Receptor Type 2 Play an Important Role in Long-term Ultraviolet A Eye Irradiation-induced Photoaging, *Photochem Photobiol*, Dec 9.

Hockenbery D (1995). Defining apoptosis, *Am J Pathol*, 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.

http://guzelliksirlariuzmani.blogspot.com.tr/2013/05/uva-uvb-nedir-nasl_korunmalyz.html. Erişim tarihi; 20.06.2015.

<http://www.anagen.net/rali.htm>. Erişim tarihi; 16.07.2015.

<http://www.dicle.edu.tr/Contents/c6a20279-52b8-4c4f-bfa2-ba9fe2a400aa.pdf>. Erişim tarihi; 15.07.2015.

- <http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx?s=uv>. Erişim tarihi; 20.12.2014.
- <http://www.stereoloji.org/kategoriler/21/stereoloji-nedir>. Erişim tarihi; 13.07.2015.
- http://www.ybu.edu.tr/sinancanan/contents/files/322009_Duyu.pdf. Erişim tarihi; 10.10.2015.
- <http://yesilanneyim.blogspot.com.tr/2014/05/gunesten-korunma-uygun-gunes-kremleri.html>. Erişim tarihi; 12.06.2015.
- Ibrahim AT (2015). Negative impacts of ultraviolet-A radiation on antioxidant and oxidative stress biomarkers of African catfish *Clarias gariepinus*, *Photochem Photobiol Sci*, 14, 7, 1337-1345.
- Inglesi M, Nicola M, Fregnan G, Bradamante S, Pagani G (1994). Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine, *Farmaco*, 40, 11,703-708.
- Ji HY, Kyung HK, Dong GK, Hyeyoung K (2007). Diphenyleneiodonium suppresses apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 2063-2075.
- Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML (1995). Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis, *Am J Physiol*, 269, 1295-1304.
- Kamb A (1994). Sun protection factor p53, *Nature*, 372, 730-731.
- Kane AB (1995). Redefining cell death, *Am J Pathol*, 146, 1, 1-2.
- Karaduman A (1999). Gneş Radyasyon ve Deri zerine Etkileri, www.saglik.tr.net. Erişim tarihi; 12.09.2014.
- Karaduman A (1999). Solar radyasyon ve deri üzerine etkileri, *Sürekli Tıp Eēitimi Dergisi*, 8, 7.
- Karamangil F, (2015). Güneş Zararlı Etkileri Nelerdir? <http://www.ilacpedia.com/makale/gunes-zararli-etkileri-nelerdir>. Erişim tarihi; 20.09.2015.
- 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 ř (2002). Uygulamalı Stereoloji Kursu Dökümanları ve Uygulama Rehberi, 1-14
- Kösecik M, Erel , Sevinç E, Selek S (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking, *Int J Cardio*, 100, 61-64.
- Kulms D, Schwarz T (2002).Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis, *Biochem Pharmacol*, 64, 5, 837-841.

Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA (1994). The role of p53 in the apoptotic response, *Phil Trans R Soc Lond B*, 345, 277-280.

Lee JA, Frederick JE, Haywood EK and Stevens RG (1989). Skin cancers and ultraviolet radiation, [Letter] *Med. J. Ausf.*, 150, 540.

Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz Baniak J and Czekonska K (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chemistry*, 100: 237-240.

Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramaraò P, Saluja M, Steer ML (1992). Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells, *Gastroenterology*, 103, 205-213.

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

Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL (2000). Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB, *Circulation*, Oct;17, 102, 16,1970-1976.

Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis, *Eur J Cancer*, 30A, 14, 2068-2073.

Liu C, Chen Y, Kochevar IE, Jurkunas UV (2014). Decreased DJ-1 leads to impaired Nrf2-regulated antioxidant defense and increased UV A-induced apoptosis in corneal endothelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 9,5551-5560.

Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis, An overview of cell death, *Am J Pathol*, 146, 1,3-15.

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

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

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

Marghitas LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O, Bogdanov S and Campos MG (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania, *Food Chemistry*, 115, 878-883.

Marklund SL, Karlsson K (1990). Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic applications, *Adv Exp Med Biol*, 264, 1-4.

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

- Mason RP (1999). Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential, *Cancer*, 85, 10, 2093-2102.
- Matés JM, Pérez Gómez C, Núñez de Castro I (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry*, 32, 8, 595-603.
- McCord J (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance, *Clin Biochem*, 26, 351-357.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein, *J Biol Chem*, 244, 6049-6055.
- 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.
- Missou NL, Brooks Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ (2005). Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma, *Eur Respir J*, 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 ve Şen O (2003). Ultraviyole radyasyonun insan sağlığı üzerine etkileri. III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu, 19-21 Mart, İTÜ, İstanbul. http://web.itu.edu.tr/~toros/yayinlar/ultraviyole_radyasyonun_insan_sagligi_uzerine_etkileri. Erişim tarihi; 12.09.2014.
- Mutlu, B., Toros, H., ve 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.
- Olson RL, Everett MA (1975). Epidermal apoptosis: cell deletion by phagocytosis, *J Cutan Pathol*, 2, 53-57.
- Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994). Checkpoints on dueling dimers foil death wishes, *Cell*, 79, 189-192.

- 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, *J Lab Clin Med*, 118, 5, 477-483.
- Ozan H (2004). Ozan Anatomi, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 479-481.
- Ozkol HU, Calka O, Akdeniz N, Baskan E, Ozkol H (2015). Rosacea and exposure to tandoor heat: Is there an association? *Int J Dermatol*, Jul 14.
- Ozyurt H, Yildirim Z, Kotuk M, Yilmaz HR, Yağmurca M, Iraz M, Söğüt S, Gergerlioglu S (2004). Cisplatin-induced acute renal failure is ameliorated by erdosteine in a dose-dependent manner, *J Appl Toxicol*, 24, 4, 269-275.
- Özen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Özügürlü F, Özyurt H, Odaci E, Yildirim Z (2004). Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Journal of Applied Toxicology*, 24, 27-35.
- 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, *Dug Chem Toxicol*, 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, *J Membr Biol*, 246, 1, 47-55.
- Özyurt H, Irmak MK, Akyol O and Söğüt S (2001). Caffeic acid phenethyl ester changes the incidences of oxidative stress in serum of rats with renal ischemia–reperfusion injury, *Cell Biochemistry and Function*, 19, 259-263.
- Paramas AMG, Barez JAG, Marcos CC, Garcia Villanova R, Sanchez JS (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen), *Food Chemistry*, 95, 148-156.
- Rehber Ansiklopedisi, "Ultraviyole Işıklar" madesi, cilt: 19, sayfa 327-328.
- 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.
- Romanhole RC, Ataide JA, Moriel P, Mazzola PG (2015). Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin, *Int J Cosmet Sci*, 37, 4, 366-370.
- 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, *Braz J Med Biol Res*, 29, 175-183.

Sevin A ve ark. (2007). "Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: an experimental study on rats.", *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21, 5, 650-656.

Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1-14.

Sforcin JM and Bankova V (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260.

Silva JC, Rodrigues S, Feas X and Estevinho LM (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1790-1795.

Silva JP, Gomes AC, Proença F, Coutinho OP (2009). Novel nitrogen compounds enhance protection and repair of oxidative DNA damage in a neuronal cell model: comparison with quercetin, *Chem Biol Interact*, 181, 3, 328-337.

Sinclair AJ, Barnet AH, Lunec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease, *Br J Hosp Med*, 43, 334-344.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175, 184-191.

Son S, Lobkowsky EB and Lewis BA (2001). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): synthesis and X-ray crystallographic analysis, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 236-238.

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

Strickland PT (1986). Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in Sencar Mice, *J. Invest. Dermatol*, 87, 272-275.

Sütlaş M (2005). Deri Bilgisi, <http://www.itf.istanbul.edu.tr/dermatoloji/derbilgi.htm>. Erişim tarihi; 20.02.2014.

Svobodová A, Psotová J, Walterová D (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage, A review, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, Dec; 147, 2, 137-145.

Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, et al (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo, *Cell*, 78, 703-11.

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.

Tyrell RM and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.

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 Peroksidleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar, *Klinik Gelişim*, 2, 336-341.

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

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

Widjaja A, Yeh TH and Ju YH (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39, 413-418.

Wintrobe M and Thorn G (1976). Harrison's Principles of Internal Medicine, Menteş Kitapevi, 385.

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

Xia JB (1994). Scattering rates of Wannier states in superlattices in an electric field, *Phys Rev B Condens Matter*, 50, 20, 15067-15072.

Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK (2003). Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Pharmacol Res*, 48, 4, 377-382.

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

Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O (2003). Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats, *Pharmacol Res*, 47, 2, 149-156.

Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, et al (2004a). The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Pharmacol Res*, 50, 287-290.

Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N (2004b). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver, *J Biochem Mol Toxicol*, 18, 234-238.

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*, et al (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer, *Nature*, 372, 773-776.



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Malatya 'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Malatya 'da tamamladı. 2010 yılında Dicle Üniversitesi Siirt Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinde hemşire olarak çalıştı.



EKLER



**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 A ile İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Kafeik Asit Fenetil Ester ve Erdosteinin Koruyucu Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması.														
Title of the Research	Investigation on the Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Erdostein by Molecular, Biochemical and Stereological Methods in Ultraviolet A Induced Skin Damage Model of Albino Rats.														
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator : Doç.Dr.Halil ÖZKOL / Assoc.Prof.Dr.Halil ÖZKOL Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Prof. Dr. M. Çetin RAĞBETLİ, Doç. Dr. Yasin TULÜCE, Doç. Dr. Hatice Uce ÖZKOL, Esma ZEREN														
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-YL163														
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	<table style="width: 100%;"> <tr> <td>Prof. Dr. Duran BOLAT</td> <td>Prof. Dr. Siddık KESKİN</td> </tr> <tr> <td>Prof. Dr. Fazıl ŞEN</td> <td>Doç. Dr. Atilla DURMUŞ</td> </tr> <tr> <td>Doç. Dr. Şenol GÜZEL</td> <td>Doç. Dr. Nalan ÖZDAL</td> </tr> <tr> <td>Doç. Dr. M. Fatih GARÇA</td> <td>Doç. Dr. Abdülbaki AKSAKAL</td> </tr> <tr> <td>Yrd. Doç. Dr. Fatih KAZANCI</td> <td>Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ</td> </tr> <tr> <td>Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN</td> <td>Vet. Hekim İsmail Hakkı BEHÇET</td> </tr> <tr> <td>Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU</td> <td></td> </tr> </table>	Prof. Dr. Duran BOLAT	Prof. Dr. Siddık 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	
Prof. Dr. Duran BOLAT	Prof. Dr. Siddık 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															

Ek 1: Etik kurul sonuç raporu