

**XANTHORIA PARIETINA (L.) TH. FR. LİKEN
EKSTRAKTININ FARE DERİ FİBROBLAST HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE UV IŞINLARINA KARŞI ÖNLEYİCİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

GİZEM ÇIRACI



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**XANTHORIA PARIETINA (L.) TH. FR. LİKEN EKSTRAKTININ FARE DERİ
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE UV IŞINLARINA KARŞI
ÖNLEYİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gizem ÇIRACI

Prof. Dr. NİLÜFER ÇİNKILIÇ
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BURSA – 2019
Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Gizem ÇIRACI tarafından hazırlanan 'Xanthoria parietina (L.)Th. Fr. Liken ekstraktının fare deri fibroblast hücre kültürlerinde UV ışınlarına karşı önleyici etkilerinin araştırılması' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Başkan : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
0000-0002-3595-6286

İmza

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Dilek Pirim
0000-0002-0522-9432

İmza

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Gökçe Taner
0000-0002-0290-1166

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Hüseyin Aksoy EREN
Enstitü Müdürü

.../.../2020

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20.09.2019

Gizem ÇIRACI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

XANTHORİA PARIETİNA (L.)TH. FR. LİKEN EKSTRAKTININ FARE DERİ FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE UV IŞINLARINA KARŞI ÖNLEYİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem ÇIRACI

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Parietin, *Xanthoria parietina* (L.)Th. Fr. Likeninde fotoprotektif metabolizmasının ikincil ürünü olan bir pigmenttir. Bu pigmentin likende UV koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Fare deri fibroblast hücrelerinde(L929) *Xanthoria parietina* etanolik ekstraktı (XpE) tarafından oluşturabileceği hasarlar XTT hücre canlılık testi, Komet testi ve hücre içi reaktif oksijen türevleri testi (ROS) (DFCH-DA testi) ile belirlenmeye çalışılmıştır. *Xanthoria parietina* (L.) bitki ekstratından elde edilen ‘parietin’in L929 hücre hattındaki XTT sonuçlarına bakıldığında IC50 değeri: 768,01 mg/ml olarak belirlenmiştir. Komet testi sonuçlarına bakıldığında ve kontrol grubuyla kıyaslandığında; 50, 100, 200, 400, 500 mg/ml dozlarında genotoksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan ROS deneyi sonucunda parietinin antioksidan etki gösterdiği anlaşılmıştır. Yapılan deneyler ve elde edilen sonuçlar ışığında *Xanthoria parietina* likeninden izole edilen ekstraktın belirli dozlarda sitotoksik olmadığı, genotoksik etki göstermediği ve beklendiği gibi antioksidan etki gösterdiği anlaşılmış olup birçok çalışmaya ışık tutacağı öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, Komet, L929 fare deri fibroblast hücreleri, ROS, Sitotoksisite, UV, *Xanthoria parietina*.

2019, x + 86 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PREVENTIVE EFFECTS OF XANTHORIA PARIETINA (L.) TH. FR LICHEN EXTRATE AGAINST UV RAYS IN MICE SKIN FIBROBLAST CELL CULTURES

Gizem Çıracı

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Parietin, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Lichen is a pigment that is the secondary product of photoprotective metabolism. This pigment is known to have UV protective effects in lichen. The damage that may be caused by *Xanthoria parietina* ethanolic extract (XpE) in mouse skin fibroblast cells (L929) will be determined by XTT cell viability test, comet test and intracellular reactive oxygen derivatives test (DFCH-DA). When XTT results of iet 'parietin obtained from *Xanthoria parietina* (L.) plant exrate in L929 cell line were examined, IC50 value was determined as 768.01 mg / ml. Comet test results were compared and compared to the control group; No genotoxic effect was observed at doses of 50, 100, 200, 400, 500 mg / ml. As a result of the ROS experiment, parietin was found to have antioxidant effect. In the light of the experiments and the results obtained, it was understood that the extract isolated from *Xantoria parietina* lichen was not cytotoxic, did not show genotoxic effect and showed antioxidant effect as expected and would enlighten many studies.

Key Words: Cytotoxicity, Genotoxicity, Komet, L929 mouse skin fibroblast cells, ROS, UV, *Xanthoria parietina*.

2019, x + 86 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden ve hayat tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, tez çalışmam süresince göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve rehberliğinden dolayı, bu yolculuğa çıkma sebebim olan çok kıymetli hocam, **Sayın Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ'a**,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, desteğini esirgemeyen, Doç. Dr. Özgür VATAN'a,

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, değerli emeklerinden ve bütün deneylerimde ki özverili desteğinden dolayı Huzeyfe Hürriyet'e,

Yüksek lisans çalışmaları boyunca yanımda olan beni dinleyen ve motive eden Neylan Oral a ve diğer bütün arkadaşlarıma,

Eğitimim boyunca her türlü desteği veren, nadide bir parçası olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum aileme

Gönülden Teşekkürler...

Gizem ÇIRACI

20/12/2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Radyasyon Nedir?	3
2.1.1. Doğal radyasyon	3
2.1.2. Yapay radyasyon	3
2.1.2.1. İyonlaştırıcı radyasyon	4
2.1.2.2. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon türleri	5
2.1.2.2.1. Ultraviyole radyasyon	6
2.1.2.2.2. UV radyasyonu etkileri	9
2.1.2.2.3. UV radyasyonunun organizma düzeyinde etkileri	9
2.1.2.2.4. Bitkilere etkileri	10
2.1.2.2.5. Mikroorganizmalar etkileri	10
2.1.2.2.6. Hayvanlara etkileri	10
2.2. UV'nin insan sağlığına etkileri	11
2.2.1. UV'nin cilde etkileri	13
2.2.2. UV'nin erken dönem etkileri	14
2.2.3. UV'nin geç dönem etkileri	14
2.3. UV Kaynaklı DNA Hasarı	16
2.3.1. UV kaynaklı DNA hasarında p53 geni etkisi	17
2.4. DNA Onarım Mekanizmaları	18
2.4.1. Doğrudan onarım	18
2.4.2. Doğrudan olmayan onarım	19
2.5. Reaktif Oksijen Türleri	23
2.6. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar	26
2.6.1. Otoksidasyon	26
2.6.2. Geçiş metal iyonlarının etkisi	27
2.6.3. Fotooksidasyon	29
2.6.4. Enzimatik oksidasyonlar	30
2.7. Antioksidan	32
2.7.1. Doğal antioksidan kaynakları	34
2.8. Antosiyaninler	34
2.9. Bitkisel Ekstratlar	38
2.10. Güneş Kremi Olarak Bitkisel Yağlar	40
2.11. Likenler	42
2.12. Toksikite Testleri	43
2.12.1. Sitotoksikite testi	43
2.12.2. Genotoksikite testi	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM	48

1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	50
3.1.1. Soxhlet ekstraksiyon cihazı.....	51
3.2. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	51
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	54
3.3.1. Besiyeri hazırlanması	54
3.3.2. Hidrojenperoksit (H ₂ O ₂) hazırlanması	54
3.4. XTT Testi	54
3.5. Komet Testi	55
3.6. ROS Ölçümü.....	57
3.7. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi.....	58
3.8 UV değerlerinin belirlenmesi.....	60
3.9. Çalışma Planı	60
3.9.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı ve Pasajlanması	60
4. BULGULAR	61
4.1. XTT Test Bulguları.....	61
4.2. Komet Testi Bulguları.....	62
4.2.1. Kuyruk uzunluğu bulguları.....	62
4.2.2. Kuyruk %DNA bulguları.....	65
4.2.3. OKM bulguları	69
4.3. ROS Testi Bulguları.....	73
4.4. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi Bulguları.....	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

ml	Mililitre
mg	Miligram
kg	Kilogram
mM	Milimolar
nm	Nanometre
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
M	Molar
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
H ₂ O	Su
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidrojen Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
EtBr	Etidyum Bromür
Na ₂ EDTA	Etilendiamintetraasetik asit Disodyum

Kısaltmalar

Açıklama

DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IC ₅₀	%50 'lik inhibitör konsantrasyonu
LMA	Düşük yoğunluklu agaroz
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROT	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi (Komet)
XTT (2,3 Bis-[2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H- 5-Carboxanilide)	Tetrazolium-
UV	Ultraviyole ışık
LH	Langerhans hücre
CPDs	Siklobütan pirimidin dimerleri
FAD	Flavin adenine dinucleotide
BER	Baz Eksizyon Tamiri
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
AP Liyaz	DNA- (apürinik ve apirimidik bölge) liyaz
BMDM	Butil Metoksi Dibenzoil Metan (Avobenzon, Parsol® 1789)
OCT	Oktokriken (2-etilheksil-2-siyano-3, 3diphenylacrylate)

Kısaltmalar	Açıklama
TCR	Transkripsiyona Bağlı Onarım
GGR	Global Genomik Onarım
RFC	DNA Replikasyon Faktörü C
PCNA	Prolifere Edici Hücre Nükleer Antijeni
XP	Xeroderma pigmentosum
CS	Cockayne syndrome
TTD	Trichothiodystrophy
N	Azot
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
LA	Linoleik Asit
SIRC	Fare Korneal Hücrelerinde
HaCaT	İnsan Keratinosit Hücrelerini
Mexoryl SX	Terephtalylidene Dikamfor Sülfonik Asit (Ekamsul)
TiO ₂	Titanyum Dioksit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
ZnO	Çinko oksit
EMC	2-etil p-metoksisinamat
DTS	Drometrisol Trisiloksan
DPDT	Disodyum Fenil Dibenzimidazol Tetra Sülfanat
DHNB	Dietilamino Hidroksi Benzoil Hegzil Benzoat
MBBT	Metilen Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenol
BEMT	Bis-Etilheksiloksifenol Metoksifenil Triazin
SPF	Güneş Koruma Faktörü
BSA	Sığır Serum Albümini
MED	Minimal Eritem Dozu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doğal ve Yapay Radyasyon Oranı	3
Şekil 2.2. Radyasyonun Çeşitleri.....	4
Şekil 2.3. İyonlaştırıcı Radyasyon Türleri	5
Şekil 2.4. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon Türleri	5
Şekil 2.5. Elektromanyetik Spektrumda UV Radyasyon Bölgesi ve Bu Bölgenin Dalga Boylarına Göre Sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.6. Kuzey Yarımküre' de, 45. Enlem Üzerinde Bulunan Bir İstasyona Ait Günlük Net Radyasyon Değişimi.....	9
Şekil 2.7. UV İndisi Genel Olarak Sınıflandırılması	11
Şekil 2.8. İnsan Derisinin Yapısı.....	13
Şekil:2.9. Normal ve Kanserli Ben Görünümü	15
Şekil 2.10. UV Işını Etkisi Sonucu Timin Dimerlerinin Oluşumu.....	16
Şekil 2.11. Pürin/Pirimidin Bazının Kaybı Sonucu AP (Apürinik/Apirimidinik) Bölgelerin Oluşumu.....	16
Şekil 2.12. Spontan Deaminasyon Hatalı Baz Eşleşmesine.....	20
Şekil 2.13. DNA N-glikozilazlar Ayrıca AP İyaz Aktivitesine.....	21
Şekil 2.14. Nükleotid Eksizyon Genel Genom Tamir Mekanizması.....	22
Şekil 2.15. UVR ile İndüklenen DNA'nın ESC'lerde Hasara Yol Açtığı Cilt Yaşlanması.....	25
Şekil 2.16. Xtt Testindeki Renk Değişimi	43
Şekil 2.17. Xtt Testi Aşamaları	43
Şekil 2.18. Komet Testi Aşamaları.....	44
Şekil 3.1. <i>Xhantoria Parietina</i> Liken Örneği.....	48
Şekil 3.2. <i>Xhantoria Parietina</i> Liken Örneği.....	48
Şekil 3.3. <i>Xhantoria Parietina</i> Liken Örneği.....	49
Şekil 3.4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı.	58
Şekil 3.5. DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu	58
Şekil 3.6. BHA (Bütillendirilmiş hidroksi anisol) molekül yapısı	59
Şekil 4.1. <i>Xanthoria parietina</i> XTT Test Sonucu Belirlenen % Canlılık Grafiği	61
Şekil 4.2. Sadece UV ile Muamele Edilen Komet Testi Kuyruk Uzunluğu (µm) Değerleri.....	62
Şekil 4.3. Sadece <i>Xanthoria Parietina</i> Ekstratıyla Muamele Edilen Komet Testi Kuyruk Uzunluğu (µm) Değerleri.....	63
Şekil 4.4. UV ve <i>Xanthoria parietina</i> ekstratıyla kombine muamele edilen komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.....	64
Şekil 4.5. Sadece UV'yle Muamele Edilen Komet Testi Kuyruk %DNA Değerleri	66
Şekil 4.6. Sadece <i>Xanthoria Parietina</i> Ekstratıyla Muamele Edilen Komet Testi Kuyruk %DNA Değerleri.....	67
Şekil 4.7. UV ve <i>Xanthoria Parietina</i> Ekstratıyla Birlikte Muamele Edilen Komet Testi Kuyruk %DNA Değerleri.....	68
Şekil 4.8. UV ile Muamele Edilen Komet Testi OKM Değerleri	69
Şekil 4.9. Ekstratla Muamele Edilen Komet Testi OKM Değerleri	70

Sayfa

Şekil 4.10. Ekstrat ve UV ile Muamele edilen komet testi OKM değerleri.....	71
Şekil 4.11. 1929 hücre hattının H ₂ O ₂ ve <i>Xhantoria parietina</i> ekstratı ile muamele edilerek 4. saatte ki hücre içi ROS seviyeleri değerleri....	74
Şekil 4.12. 1929 hücre hattının UV ve ekstrat ile muamele edilmesi sonucu 4.saatte ROS değerleri.....	75
Şekil 4.13. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite yöntemi sonuç grafiği.	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1.Cilt tiplerine göre güneş tepkimeleri.....	12
Çizelge 2.1. Oksidan Kaynakları ve Antioksidan Savunma Sistemleri	31
Çizelge 2.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	33
Çizelge 3.1. Kullanılan Ekipmanlar.....	52
Çizelge 3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	53
Çizelge 4.1. UV için komet testi ortalama değerleri.....	72
Çizelge 4.2. <i>Xhantoria parietina</i> ekstratı ve UV kombin dozları için komet testi ortalama değerleri.....	72
Çizelge 4.3. <i>Xhantoria parietina</i> ekstratı ve UV kombin dozları için komet testi ortalama değerleri.....	73

1.GİRİŞ

Güneş yeryüzündeki yaşam için temel enerji kaynağıdır. Ancak güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyonunun doğal yaşama büyük oranda zararlı etkileri vardır (Gruijl 1999). Güneş ışığının doğal bir bileşeni olan ve insan gözüyle görünmeyen ultraviyole radyasyonu, dalga boyuna bağlı olarak: Uzun dalga UV-A (315–400 nm), orta dalga UV-B (280–315nm) ve kısa dalga UV-C (100-280 nm) şeklinde 3 kategoriye ayrılır. UV-A ve UV-B radyasyonu dünya yüzeyine ulaşabilirken UV-C, ozon tabakası tarafından filtrelenir (Uraivan Panich 2016). Fakat 1970 ve 1987 yılları arasında ozon tabakasında oluşan büyük hasar sebebiyle dünya yüzeyine daha fazla ultraviyole radyasyonu ulaşmaya başlamıştır (Svobodová 2003).

En büyük organımız olan deri, vücudun ana koruyucusu olarak işlev görür. Bu korumanın zarar görmesi cildin yaşlanmasına, yara onarımının bozulmasına ve cilt kanseri riskinin artmasına neden olabilir (Uraivan Panich 2016). Cildimizin özellikle bazı bölgeleri, cilt hücresi DNA'sına doğrudan ve dolaylı olarak zarar verebilecek çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır. Şüphesiz ki bu streslerin en başında DNA hasarının ana nedenlerinden biri olan ultraviyole radyasyonu (UVR) gelmektedir. Kök hücrelerin (ESC'ler ve mezenkimal kök hücreler) tükenmesine ve kök hücre nişinin zarar görmesine sebep olabilen UV radyasyonu, cilt yaşlanmasını ve kanser oluşumunu teşvik eden mutasyonlara veya kromozomal düzenlemelere neden olabilir (Panich 2016). DNA içindeki aromatik heterosiklik bazlar, UVB'yi kuvvetli bir şekilde emer ve bu da C → T ve CC → TT mutasyonlarına neden olan siklobütan pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olur. Bazı çalışmalarda UVA aralığındaki radyasyonun, aynı zamanda siklobütan pirimidin dimer oluşumu yoluyla DNA hasarını tetikleyebileceği görülmektedir (Schulman ve Fisher 2009).

DNA foto-kopması, tümör baskılayıcı p53 geni içeren mekanizmalar ile onarılabılır ancak p53 geni de deride diprimidin mutajenezine uğrayabilir. UV radyasyonunun insan ve fare deri kanserlerinde p53 geninde mutasyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, UV aracılı DNA hasarı hem genomdaki mutasyonları başlatarak hem de p53 fonksiyon kaybına katkıda bulunarak kanserojen potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Schulman ve Fisher 2009).

Sağlığımız için önemli bir tehdit oluşturan deri kanseri riskine karşı ulusal ve uluslararası sağlık otoriteleri UV radyasyonunun zararlı etkilerinden korunmak için önlemler almaya başlamıştır. Bu UV radyasyonunun yoğun olduğu saatlerde güneşten kaçınma, koruyucu giysi kullanma, şapka ve güneş kremlerini kullanma şeklinde olabilir (Nohynek ve Schaefer 2001).

Günümüzde rahatlıkla kullanabileceğimiz yağ, çubuk, Jel, krem, losyon gibi birçok farklı güneş koruyucu ürün bulunmaktadır. Bu ürünleri kullanılırken UV ışınlarına karşı yeterli koruma sağladıklarından emin olunmalıdır. Kimyasal ve fiziksel olmak üzere İki tür güneş kremi vardır. Kimyasal bir güneş kremi UV ışınlarını emerken, fiziksel bir güneş kremi ise zararlı ışınları deriden bir zırh gibi yansıtır (Korać ve Khambholja 2011).

UV radyasyonundan korunmak için otlar ve bitkisel preparatlar, öncelikle antioksidan aktiviteleri nedeniyle yüksek bir koruma potansiyeline sahiptir. C ve E vitaminleri, fenolik asitler ve flavonoidler, çok sayıda negatif cilt değişiminin ana nedeni olan serbest radikal türlere karşı mücadelede oldukça etkilidir. Her ne kadar izole edilmiş bitki bileşikleri, cildin korunmasında yüksek bir potansiyele sahip olsa da "bütün bitki özleri" kompleks kompozisyonları nedeniyle daha iyi bir potansiyel göstermiştir. Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada *Xanthoria parietina* bitki ekstratının sağlıklı fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik etkilerine bakılarak UV ye karşı koruma düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır (Korać ve Khambholja 2011).

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Radyasyon Nedir?

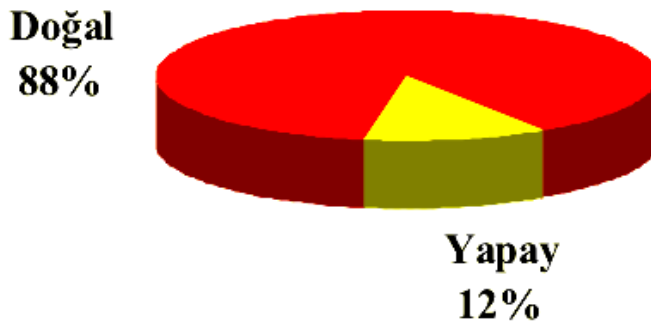
Radyasyon, hareket eden enerji olarak tanımlanır. Doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjilere radyasyon denir (Yaren ve Karayılanoğlu 2005). Havada, tükettiğimiz gıdalarda ve içeceklerde radyoaktivite vardır. Hayatı boyunca çoğu insan doğal ve yapay radyasyon kaynaklarından etkilenmektedir (Hacıosmanoğlu 2017).

2.1.1. Doğal Radyasyon

Günlük hayatımızda etkilendiğimiz radyasyonun büyük bir kısmı (%88'i) doğal kaynaklardan oluşur ve güneş en çok bilinen doğal radyasyon kaynaklarından biridir (Hızarcı 2017).

2.1.2. Yapay Radyasyon

Toplumsal ve teknolojik gelişmeler nedeniyle insan, bazı radyasyon kaynaklarını yapay yollarla üretmiştir. Maruz kaldığımız radyasyonun %12'si yapay kaynaklardan meydana gelmektedir. Özellikle gelişmiş ve gelişmeye devam eden ülkelerde yapay radyasyon kaynaklarından meydana gelen radyasyonun %50'si, medikal görüntüleme gerçekleştirilmektedir (Hacıosmanoğlu 2017).



Şekil.2.1. Doğal ve Yapay Radyasyon oranı

Radyasyonu tanımlamak için 3 parametreden yararlanılır (Şekil 2.2).

- Radyasyonun Enerjisi

- Radyasyonun Türü (Elektromanyetik radyasyon ve parçacık radyasyonu)
- Radyasyonun Kaynağı (Yapay ve doğal radyasyon kaynakları)

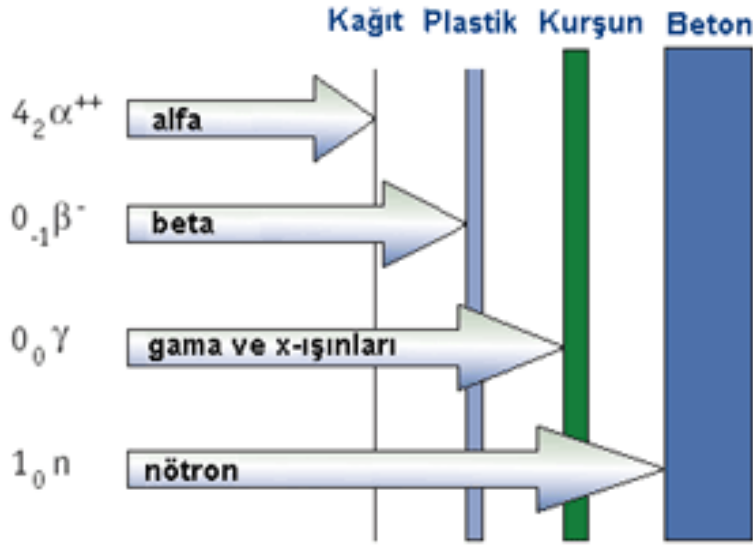
İyonize radyasyonu yüksek enerjili radyasyon olarak da tanımlayabiliriz. İyonize radyasyon atomdan elektron koparabilen dolayısıyla atomu iyonize edebilen radyasyon türüdür. İyonize olmayan radyasyon ise içindeki atomları enerji eksikliğinden dolayı iyonize edemeyen radyasyon türüdür (Seyrek 2007).



Şekil 2.2. Radyasyonun Çeşitleri (Hızarcı 2004).

2.1.2.1. İyonlaştırıcı Radyasyon Türleri:

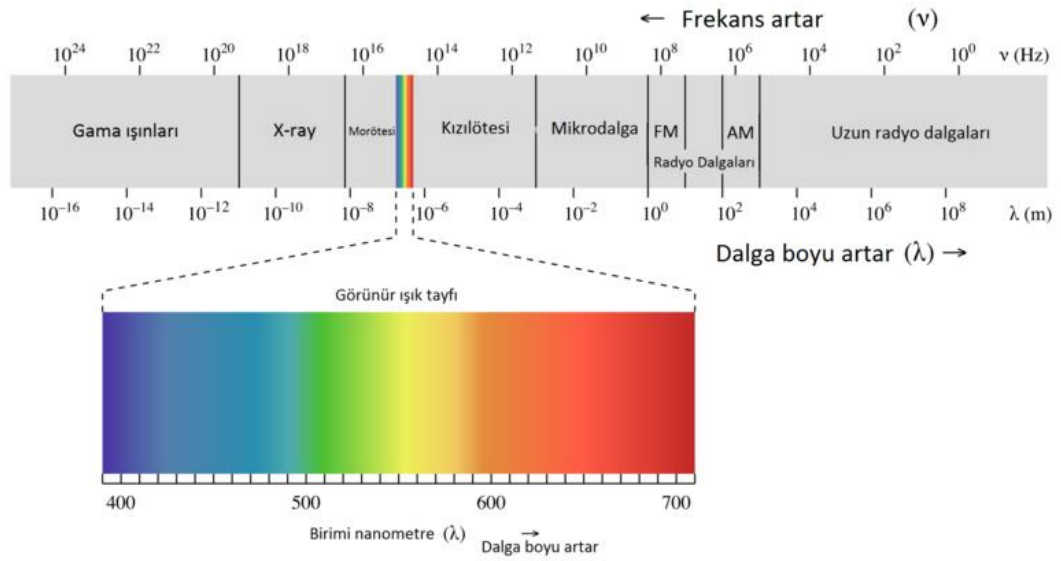
- *Alfa parçacıkları,
- *Beta parçacıkları,
- *X-ışınları,
- *Gama ışınları ve
- *Nötronlardır.



Şekil 2.3. İyonlaştırıcı Radyasyon Türleri.

2.1.2.2. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon Türleri:

- Ultraviyole(UV)
- Mikrodalgalar
- Kızılötesi
- Radyo dalgalarıdır (Büyükuslu 2007).



Şekil 2.4. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon türleri (Büyükuslu 2007).

2.1.2.2.1. UV Radyasyon

Elektromanyetik radyasyon kızılötesi radyasyona (IR), görünür ışığa (VIS) ve UV radyasyonuna bölünür (Kullavanijaya ve ark. 2005). Yeryüzüne ulaşan güneş ışınlarının bir kısmı UV radyasyondur. UV radyasyonu güneş yanığı, bronzlaşma, erken deri yaşlanması ve kanser gelişiminin meydana gelmesi olarak birçok biyolojik etkiye sebep olabilmektedir. En başta vitamin D sentezi olmak üzere, az da olsa yararlı etkileri de vardır (Mutlu ve ark. 2003).

UV radyasyonu, ışık iyonlaştırıcı radyasyondan, sahip olduğu düşük enerjiye ve dalga boyuna bağlı olarak, soğurma özelliği nedeni ile ayrılır. UV'nin etkileri şöyle sıralanabilir (Güler ve Çobanoğlu 1994).

- UV ışık, güneş yanığı meydana getirerek deriyi etkiler.
- UV ışık, tüm hücreler üzerinde mutasyon yaratır ve bunlara bakteri ve virüsler de dahildir. Mutasyonun, DNA'nın üzerinde küçükte olsa kimyasal değişiklikler yarattığı düşünülmektedir.
- UV'nin, iyonlaştırıcı radyasyona göre az da olsa kromozomları parçaladığı bilinmektedir.
- UV'nin hücre bölünmesini engellediği ve hücrelerin aşırı büyüme gösterdiği belirlenmiştir.
- UV'nin iyonlaştırıcı radyasyona göre DNA sentezi üzerinde, daha fazla etkisi olduğu belirlenmiştir (Güler ve Çobanoğlu 1994).

UV radyasyonu, dalga boyunu ve artan enerjiyi azaltmak için üç ayrı gruba ayrılır: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) ve UVC (200-290 nm). Farklı dalga boyları ve UV alt bölünmesiyle ilişkili enerji canlı dokularda belirgin bir şekilde farklı etkilere sebep olur (Kullavanijaya ve ark. 2005).

***Ultraviyole C Radyasyonu**

UVC, en yüksek enerjiye ve biyolojik hasar için en büyük potansiyele sahip UV radyasyonudur. Ozon tabakası tarafından etkili bir şekilde filtrelenir ve bu nedenle fazla maruz kalmayız (Tuchinda 2006).

***Ultraviyole B Radyasyonu**

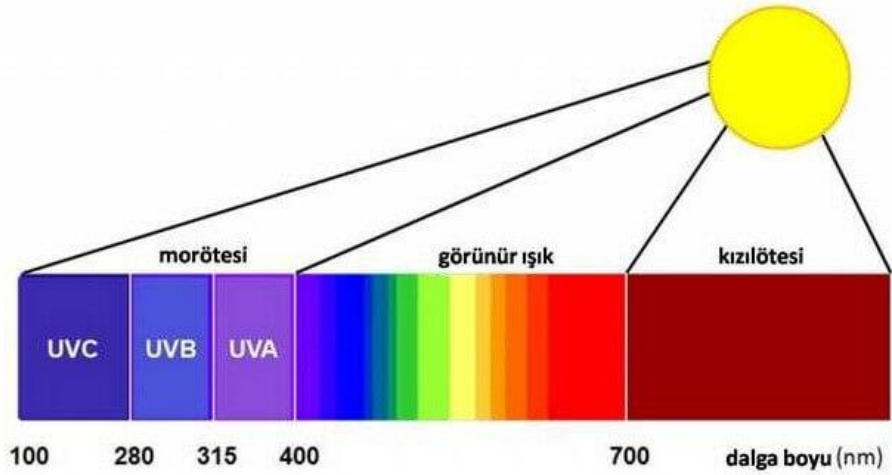
Dünya yüzeyine ulaşan UVB miktarı, UVA' nın 20 de 1' i kadardır (Kullavanijaya ve ark. 2005). Bir yaz günü, dünya yüzeyine ulaşan UV spektrumunun %3,5'i UVB ve %96,5'i UVA dan oluşur. UVB öncelikle eritem ve güneş yanığı ile ilişkilidir. İmmünsüpresyon ve fotokarsinogeneze neden olabilir (Tuchinda 2006). UVB ışınları vitamin D aktivitesi bakımından yararlıdır. Üretimi 7-dihidrokoolesterol irradyasyonu yoluyla gerçekleşir (Azevedo ve ark.1999).

***Ultraviyole A Radyasyonu**

UVA, stratosfer tabakasını geçip yere kadar ulaşarak dünyaya büyük miktarlarda erişir (Berkow 1997).

UVA en uzun dalga boyuna sahip UV radyasyonu şeklidir. Bu nedenle irtifa veya atmosferik koşullardan daha az etkilenir. UVA, UVB ile karşılaştırıldığında deriden daha derinlere nüfuz edebilir ve camdan süzülmez (Kullavanijaya ve ark. 2005). UVA'ya maruz kalmanın yaklaşık %50'sinin gölgede olduğu tahmin edilmektedir (Schaefer ve ark. 1998).

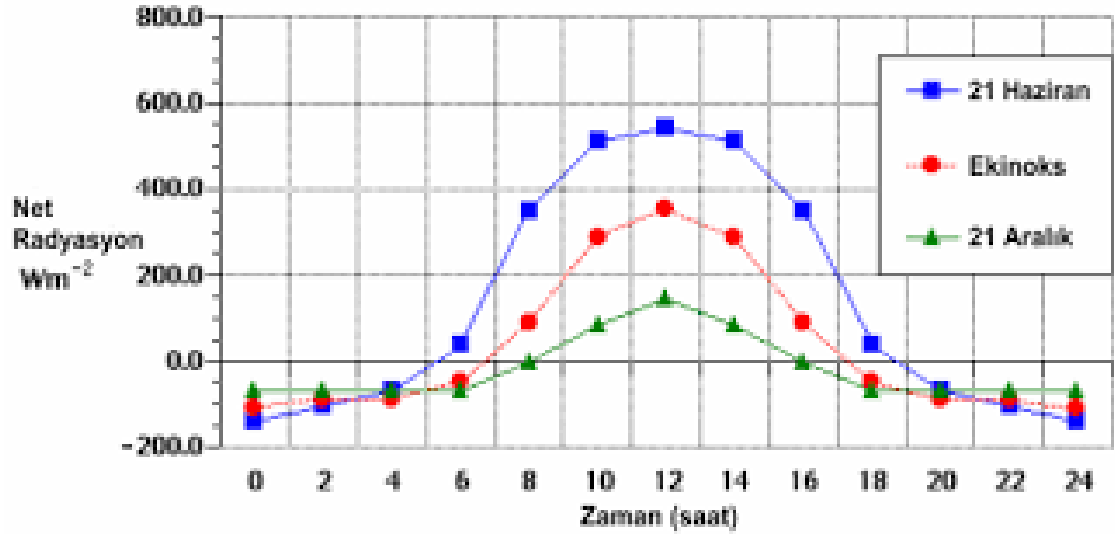
UVA, hızlı ve geciktirilmiş pigment koyulaşmasına ve geciktirilmiş bronzlaşmaya neden olarak eritem üretmekte etkilidir. UVA immünsüpresyon, fotoyaşlanma, oküler hasar ve cilt kanseri gibi önemli olumsuz etkilere sahiptir (Korać ve ark. 2011).



Şekil 2.5. Elektromanyetik spektrumda UV radyasyon bölgesi ve bu bölgenin dalga boylarına göre sınıflandırılması.

Dünya yüzeyine ulaşan UV miktarı enlem, irtifa, mevsim, günün saati, bulutluluk ve ozon tabakasından etkilenir. En yüksek ışınlanma ekvatorunda ve daha yüksek kotlardadır (Tuchinda, 2006) UV ışınımı sabah 10 ile 4 arasında en kuvvetlidir. (Kullavanijaya ve ark. 2005). Hava kirliliği ve yağış koşulları da UV'nin etkisini taşıyım miktarını azaltır. Aynı zaman da UV-B'nin yer yüzeyine ulaşmasını bulutlar, havada asılı kalan partiküller, aerosoller ve stratosferik ozon değiştirmektedir. UV-B radyasyonu stratosferik ozonun konsantrasyonuna göre yer yüzeyine ulaşmaktadır (Lubin 1995).

Güneş ışınları yer yüzüne özellikle, ışınların atmosferde daha kısa yol alır bu nedenle de UV radyasyonu en yüksek değerine ulaşır. Dünyanın güneş etrafındaki yıllık hareketine ve enlemlere göre güneş ışınlarının yeryüzüne geliş açısı değişmektedir. Ekvator bölgeleri, yılda iki kez güneşi dik açıyla alır. Bu nedenle kutup bölgelerine göre güneş radyasyonundan daha fazla etkilenir (Cockell ve ark. 2001).



Şekil 2.6. Kuzey Yarımküre’ de, bir istasyona ait günlük net radyasyon değişimi (45. enlem üzerinde) (Cockell ve ark. 2001).

UV radyasyonu (UV) “tam kanserojen” olarak sınıflandırılır. Çünkü hem bir mutajen hem de spesifik olmayan bir zarar verici ajandır. Tümör başlatıcısı ve bir tümör promotörü özelliklerine sahiptir. UV, cilt kanseri ve diğer pek çok çevresel faktörlerden etkilenen cilt hastalıkları için en önemli değiştirilebilir risk faktörüdür. Bununla birlikte UV, D vitamini ve derideki endorfinlerin doğal sentezine sağlayarak insan sağlığına fayda da sağlar. Bu nedenle UV'nin insan sağlığı üzerinde birçok etkisi vardır. UV'ye aşırı maruz kalma, atrofi, pigment değişiklikleri, kırışıklık ve malignite dahil olmak üzere derin sağlık riskleri taşır (D'Orazio ve ark. 2013).

2.1.2.2.2. UV Radyasyonu Etkileri

Artan UV radyasyonu, mikroorganizmaların, bazı hayvanların ve bitkilerin faaliyetleriyle karasal ekosistemler de birçok etki meydana getirmektedir. Bunu sebebi ise stratosferik ozon azalmasıdır. Etkiler, bitki formlarında ve abiyotik çevredeki değişimlerle görülmektedir (Kenar ve Ketenoğlu 2009).

2.1.2.2.3. UV Radyasyonunun Organizma Düzeyinde Etkileri

UV radyasyonunun organizmalara pek çok etkisi vardır. Organizmalar bu etkilerden korunmak için birçok mekanizma geliştirmiştir. Buna rağmen UV radyasyonu organizmaların yapısında birçok değişime sebep olmaktadır. Çünkü ozon tabakasında giderek azalma meydana gelmektedir. Böylelikle UV ışınları daha yoğun hissedilmekte

ve organizmalar bu durumdan giderek daha fazla etkilenmektedir (Caldwell ve ark. 1998).

2.1.2.2.4. Bitkilere Etkileri

UV radyasyonu, flavonoidlerde artışa, anatomik ve morfolojik değişimlere, bitkilerin genel olarak büyümesine ve polen tüpü büyümesinin inhibisyonuna yol açabilmektedir (Caldwell ve Flint 1994).

Bitkiler, UVA ve UVB radyasyonuna karşı çok sayıda savunma ve onarım mekanizmaları geliştirmiştir. Bitkilerin savunma mekanizmalarına örnek vermek gerekirse, mumsu ve reçineli yüzey yapılarından, tüylerden, özellikle fenolik asitleri ve flavonoidleri içeren ikincil metabolitlerden, reaktif oksijen türlerinin hasarından koruyan antioksidanlardan bahsedebiliriz. Farklı koruyucu bileşiklerin tetiklenmesi ve biyomoleküllerin onarım reaksiyonları da tamir mekanizmaları arasında sayılabilir (Tiitto ve ark. 2005).

2.1.2.2.5. Mikroorganizmalara Etkileri

Birçok mikroorganizma UV radyasyonundan doğrudan etkilenmemesine rağmen, hayatlarının bir bölümünde mutlaka bu etkiye maruz kalırlar. Karasal ekosistemlerde, yaprak yüzeyinde yaşayan mikroorganizmalar buna örnek verilebilir. Seleksiyonu etkileyen UV radyasyonu yaprak yüzey florasının tür ve genotipinde ölçülebilir değişimlere sebep olmaktadır (Kenar ve Ketenoğlu 2009). UV-B radyasyonuna maruz kalmış bitkilerin kökleriyle etkileşimde olan mikroorganizmaların radyasyondan etkilenmektedir (Caldwell ve ark. 1998).

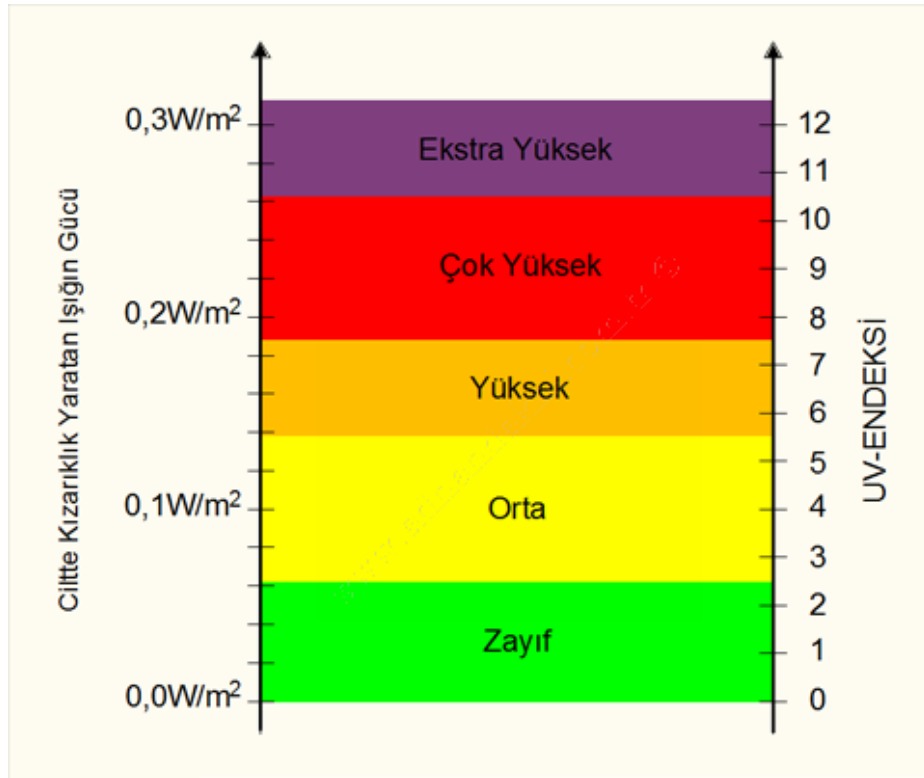
2.1.2.2.6. Hayvanlara Etkileri

Kutup bölgelerinde ki türlerin, beyaz renkli kış tüyleri ve kürkleriyle UV-B radyasyonunundan korunduğu bilinmektedir. Ayrıca bu türlerin kutup ikliminde hayatta kalmaları için gözlerinin UV-B radyasyonuna adapte olması gerekmektedir. Karasal hayvanlar UV radyasyonunun zararlarından dış iskeletleri, postları ve tüylerinin yanısıra UV hasarını onarıcı mekanizmaları yardımıyla korunmaktadırlar (Leinaas 2002).

2.2. UV' nin İnsan Sağlığına Etkileri

Ultraviyole, görünür ve kızılötesi aralıklardaki elektromanyetik radyasyon insanlarda biyolojik etkiler yaratır. Bu etkilerin çoğu zararlıdır (Parrado ve ark. 2018). Güneş radyasyonu insan ve hayvan derisinde akut ve kronik reaksiyonlara neden olur. Kronik tekrarlanan riskler, malign melanom dahil, iyi huylu ve kötü huylu cilt tümörlerinin birincil nedenidir (Ichihashi ve ark. 2003).

UV radyasyonunun insanı etkileyebilmesi için; radyasyonun deri yüzeyine ulaşması, deriden içeri girmesi ve bazı deri elemanları tarafından emilmesi, emilen radyasyonun foton enerjisi fotoşimik reaksiyonları başlatacak kadar büyük olması gibi kriterler gerekmektedir (Wintrobe, 1976). Güneş en tepedeyken yer yüzeyine ulaşması beklenen ve cilt zararlarına neden olabilecek UV radyasyon miktarının sınıflandırılmasına UV-İndisi denir.



Şekil 2.7.: UV İndisi sınıflandırılmıştır (DMİ 2000).

UV'nin etkisinin ve etki düzeylerinin bilinmesi insan sağlığı için önemlidir. Bu indis uyarıları güneş yanıklarını önlemeye yöneliktir. Uzun zamana bağlı sağlık etkilerini ortaya çıkaran riskler cilt tipine göre değişmez (Tevini 1993).

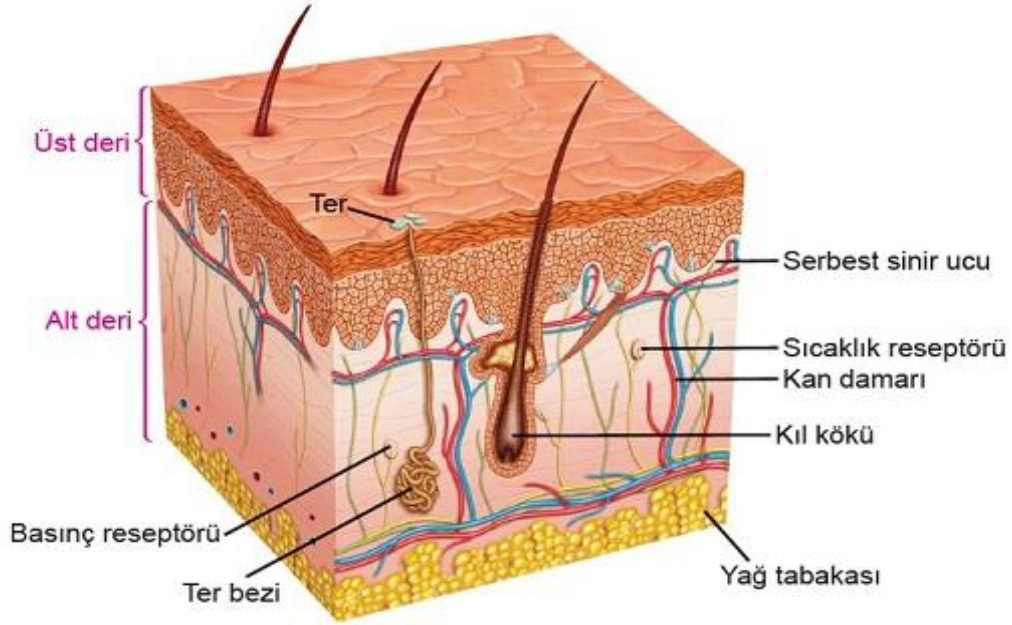
Çizelge 2.1.Cilt tiplerine göre güneş tepkimeleri (Mutlu ve ark. 2003).

CİLT FENOTİPLERİ	ÖZELLİĞİ	CİLT RENGİ	CİLDİN GÜNEŞ REAKSİYONU
Hiç bronzlaşmamış	Her zaman yanar	Soluk veya süt beyazı	Gelişen kırmızı güneş yanıkları, acı veren şişikler ve cilt soyulması
Bazen bronzlaşan	Sık yanar	Çok açık kahverengi (Bazen küçük benler oluşur)	Sıklıkla yanar. Pembe veya kırmızı renk olumları sergiler. Tedrici olarak açık kahverengi bronzlaşma görülür
Sıklıkla bronzlaşan	Bazen yanar	Açık yanık, kahverengi veya zeytin; Farklı renklenmeler	Nadiren yanar, orta dereceli hızlı bronzlaşma tepkileri verir
Daima bronzlaşan	Nadiren yanar	Kahverengi, koyu kahverengi veya siyah	Nadiren yanar, çok hızlı bronzlaşma tepkileri verir

UV radyasyonu, elektronların uyarılması yoluyla fotokimyasal reaksiyonların çok güçlü bir başlatıcısıdır ve bu, açığa çıkan molekülün enerji transferine veya kimyasal modifikasyonuna neden olabilir. UV ışığını emdikten sonra, molekül zarar görebilir ve diğer molekülleri, örn. Reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek. Biyolojik sistemlerde, emilen ışık, endojen ışığa duyarlı moleküller ile ve / veya ilaçlardan veya kozmetik bileşenlerden kaynaklanan ekzojen fotoenzimatörlerle etkileşime girebilir. Sonuç olarak, bu etkileşimler doğrudan veya dolaylı olarak zararlı, sitotoksik ve genotoksik etkiler üretebilir (Svobodová ve ark. 2003).

2.2.1. UV' nin Cilde Etkileri

Son yıllarda ultraviyole radyasyon ile ilgili çeşitli hastalık ve rahatsızlıkların görülme sıklığı tehlikeli bir şekilde artmıştır ve artmaya devam etmektedir. Memeli cildinin UV radyasyonuna kronik olarak maruz kalması; eritem, ödem, güneş yanığı hücresi oluşumu, hiperplazi, bağışıklık baskılanması, DNA hasarı, fotosentez ve melanogenez oluşumu da dahil olmak üzere bir takım biyolojik tepkilere neden olur. Bu değişiklikler cilt kanserinin gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak yer alır (Svobodová ve ark. 2003).



Şekil 2.8. İnsan derisinin yapısı (Anonim 1997).

Pirimidin foto-ürünlerinin oluşumu, trans-doğal fenoliklerin UV ile indüklenen cilt hasarının önlenmesinde izlenmesi gibi doğrudan ve dolaylı olumsuz biyolojik etkileri içerir. cis-ürokanik asit, ornitin dekarboksilaz aktivitesinin indüklenmesi, DNA sentezinin uyarılması, deride serbest radikal üretimi, hücre döngüsü büyümesi, fotosentez ve fotokarsinogenez antioksidanları önemli ölçüde azaltır.

Cildin güneş ışığına maruz kalması, serbest radikallere karşı cildin kendini koruma mekanizmasını bozar. DNA hasarı nedeniyle cilt kanseri (skuamöz ve bazal hücreli karsinom) indüklenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca cildin bağışıklık savunma sistemini düşürdüğünden şüphelenilmektedir. Cilt epidermal hücrelerinin zarar görmesi UV ışınımından 2 saat sonra ortaya çıkar. Hasarın ilk göstergesi, keratinosomlarda azalmadır, bu da diskartototik hücrelerin oluşumuyla sonuçlanır.

Hücre içi ödem, maruziyetten 16–18 saat sonra görülebilir. Hasarlı keratinositler etrafında gelişen hücreler arası ödem ile 30-48 saatte izlenir. Güneş yanığı hücreleri, en erken apoptoz örneklerinden biri olarak önerilmiştir. UV ile uyarılan apoptotik hücreler, çevreleyen keratinositler tarafından hızla fagosite edilir. Makrofajların, apoptotik hücreleri bağlayıp fagositize ettiği ve derideki sayılarının UVB tedavisi sonrası arttığı bilinmektedir (Svobodová ve ark. 2003).

2.2.2. UV Erken Dönem Etkileri

a. Güneş yanıkları özellikle açık tenli insanlarda meydana gelir. 12-48 saat içinde ortaya çıkar. Deride kızarıklık, derinin su toplaması, ağrı sızı ile kendini belli eder ve geçicidir (Evcı ve ark. 2003).

b. UV radyasyonuna bağlı olarak insanda alerjiler meydana gelir. Güneş ışınlarına maruz kaldıktan sonra bazı kişilerin derilerinde, 5-10 dakika içinde ya da birkaç gün sonra kızarıklık, kabartı, kaşıntı ve lekeler oluşabilir (Beyazıt 2011).

2.2.3. Geç Dönem Etkileri

Sıcaklığın giderek artması sebebiyle sıcak dalgalarının neden olduğu hastalık ve ölümler mevsimsel olarak görülmektedir. Özellikle yaşlılar ve kronik hastalığı olanlar çok etkilenmektedir (Güler ve Akın 2006).

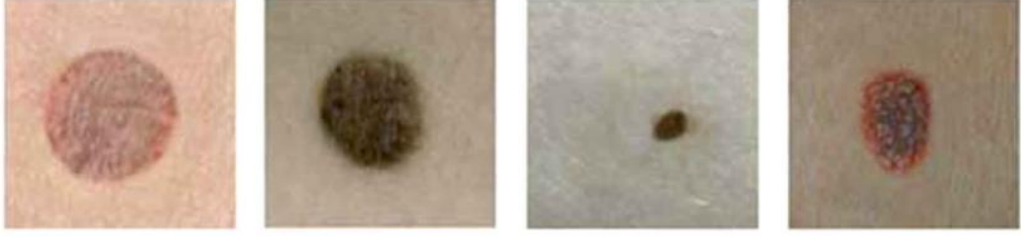
UV radyasyonunun geç dönemde ki etkilerinin tıp otoritelerince toplum sağlığı açısından daha önemli bir problemi oluşturduğu söylenmektedir (Güler ve Akın 2006).

Güneş ışınlarının geç dönem etkilerini cildin erken yaşlanması ve deri kanserleri olarak ikiye ayırabiliriz :

a. Cildin erken yaşlanması; Güneş lekeleri başta olmak üzere kırışıklıklar ile cilt kuru, kaba ve sert bir görünüm alır. Deri de sert ince kabuklu deri lekelerinin oluşmaya başlaması, cildin erken yaşlandığının belirtisidir (Evcı ve ark. 2003).

b. Deri kanserleri; Vücudun UV radyasyonunun etkisinde kalan kısımlarında deri kanseri oluşma oranı çok daha fazladır. Güneş açık tenli, açık renkli gözlü, sarışın / kıvılcak saçlı kişilerde deri kanseri riskini özellikle arttırmaktadır. Deri kanserlerinin %90'ından fazlası ultraviyolede etkilenen bölgelerde görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserlerin yaklaşık %40'ı ultraviyoleye bağlıdır (Güler ve Akın 2006).

NORMAL BEN GÖRÜNÜMÜ



CİLT KANSERİ (MELANOM) BEN GÖRÜNÜMÜ



Şekil 2.9. Normal ve kanserli ben görünümü.

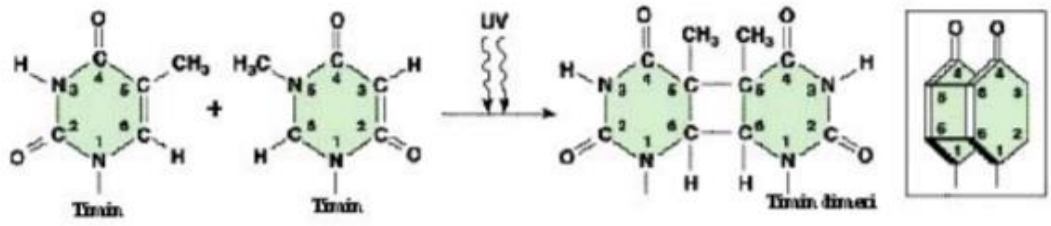
Deney hayvanlarında 280-320nm olan UV-B dalga boylu güneş ışınının kanser oluşturduğu belirtilmiştir. UVB ışınımına, uzun dalga boylu UV-A (320-400nm) ışınları eklendiğinde karsinogenez oluşumu artış gösterir. UVR ışınımına maruz kalma nükleer DNA'da ardışık değişikliklerle sonuçlanır. UVB ve UVC'nin hücre ölümü, mutasyon ve transformasyon gibi etkileri için ana hedef DNA'dır. Bununla beraber UV etkisi ile P53 geni mutasyonu da olmaktadır. Ayrıca UV ışınları, Langerhans hücre işlevlerini bozarak immün sistemi baskılar. Mutasyona neden olma ve bu etkiler, hücre bölünmesini bozarak tümör oluşumuna neden olur (Yassi 2001).

Biyolojik etkilerini uygulamak için, UV önce enerjiyi biyokimyasal bir sinyale dönüştüren hücrel kromofor tarafından absorbe edilmelidir. Ardından gelen fotobiyokimyasal reaksiyonlar, hücre ve doku biyolojisindeki değişikliklere neden olur; bu da artan fotograsyonu ve cilt kanseri oluşumuna neden olur (Svobodová 2003).

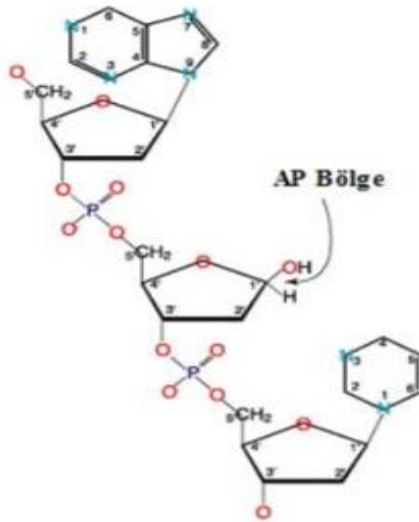
2.3. UV Kaynaklı DNA Hasarı

DNA, bakterilerden insanlara kadar çeşitli organizmalarda UV kaynaklı hasarın ana hedeflerinden biridir (Sinha ve Hader 2002). Nükleik asitler ve proteinler, UVB dalga boyu aralığında radyasyonu emen başlıca hücresel kromoforlardır. DNA, spektrumun UVB bölgesi içindeki enerjiyi emerse, bu DNA lezyonlarına neden olabilir. UVB tarafından indüklenen ana lezyonlar, siklobutan-pirimidin dimerleri ve pirimidin-pirimidon fotoürünlerdir (Svobodova 2003).

UV-C (~260nm.) ve UV-B ışınları DNA tarafından kuvvetlice absorblanarak, diğer biyolojik moleküller ve DNA'yla reaksiyona girerler. Bu reaksiyon replikasyonu ve transkripsiyonu engelleyen pirimidin dimerlerini (T-T, T-C) oluşturur (Debeleş-Bütüner ve Kantarcı 2006).



Şekil 2.10. UV 'nin etkisiyle timin dimeri oluşumu.



Şekil 2.11. Pürin/Pirimidin bazının kaybı sonucu Apürinik/Apirimidinik Bölgelerin Oluşumu (Debeleş- Bütüner ve Kantarcı 2006).

DNA photoproduct formasyonu sonucu oluşan RNA transkripsiyonunun bloke edilmesi, ışınlanmış keratinositlerin apoptozunu indükleyen p53 proteininin aktivasyonuna yol açar. Fotolesyonların onarımı, hayatta kalan hücrelerde DNA foto-majörüne birincil yanıttır. Ancak, hasar hücre döngüsünün S fazında devam ederse, diğer onarım mekanizmaları, esas olarak karakteristik sitozinin timin ikamesi ile sonuçlanan mutageneze yol açabilir. Böyle mutasyonlar p53 geninde meydana geldiğinde, keratinositler yüksek dozda UV maruziyetini takiben apoptotik sürece uğrama becerilerini kaybederler. Triptofan ve tirozin, UVB' yi emen ana amino asitlerdir (Svobodova 2003).

Hücreler UV veya diğer stresörlerin neden olduğu DNA hasarını önlemek için bir dizi onarım veya tolerans mekanizması geliştirmiştir. Fotolyaz enzimi yardımıyla foto-aktifleştirme, çeşitli organizmalarda en önemli ve sık görülen onarım mekanizmalarından biridir. Eksizyon onarımı, baz eksizyon onarımı (BER) ve nükleotit eksizyon onarımı (NER) olarak ayırt edilebilen, aynı zamanda birkaç organizmada, birkaç glikosilaz ve polimeraz yardımı ile DNA onarımında önemli bir rol oynar. Ek olarak, mutajenik onarım veya dimer bypass, rekombinasyonel onarım, hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptoz ve bazı alternatif onarım yolları gibi mekanizmalar da çeşitli organizmalarda çalışmaktadır (Sinha ve Hader 2002).

2.3.1. UV Kaynaklı DNA Hasarında P53 Geni Etkisi

P53 geni, öncelikle DNA mutasyonları için kapı bekçisi olarak işlev gören bir transkripsiyon faktörüdür (Lakin ve Jackson 1999). Yabani tip *p53'ün* zamanında ekspresyonu, düzensiz veya gerilmiş hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesini önlemede çok önemlidir. *P53* geni bunu, hücre döngüsünü durdurarak, DNA onarımını, yaşlanmayı veya apoptozu başlatan gen kümelerini harekete geçirerek yapar (Kulaksız ve ark. 2005).

UV kaynaklı DNA hasarı sırasında p53 fosforilasyonunun inhibisyonu, UV kaynaklı cilt tümörü gelişimine duyarlılığı artırır. DNA hasarından sonra p53, kanser oluşumunu önlemek için, hasarlı DNA içeren hücrelerin genişlemesini etkin bir şekilde durdurur (Bruins ve ark. 2004).

UV hasarlı DNA bağlayıcı proteinler 1 (DDB1) ve 2 (DDB2), DNA hasar yanıtında *p53* ile işbirliği yapar. *P53* tarafından düzenlenen başka bir gen olan *DDB2'nin* silinmesi UV kaynaklı cilt kanseri ile sonuçlanmıştır (Yoon ve ark. 2005).

2.4. DNA Onarım Mekanizmaları

DNA onarımının önemi, onarım hatalarının, genomik kararsızlıkla karakterize sendromlara ve kanser insidensinde artışa neden olmasıyla anlaşılmaktadır (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006).

2.4.1. Doğrudan Onarım

a) Fotoreaktivasyon ile Onarım

Siklobütan pirimidin dimerleri ve (6-4) fotoürünlerin uzaklaştırılması fotoliyaz enzimleri tarafından yapılmaktadır. Fotoreaktivasyon onarım sistemi insan dahil pek çok ökaryotik türde olmaması sebebiyle evrensel bir onarım sistemi değildir (Sancar ve ark. 2004).

b) O-6-metilguanin Onarımı

O-6-metilguanin, yüksek oranda mutajeniktir. Ayrıca alkilleyici ajanlar varlığında meydana gelirler. O-6- metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Bu işlem sonucunda enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanır ve işlev dışı kalır. Enziimin özgünlüğü kadar sayısı da önemlidir (Onur ve ark. 2009).

c) Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

Bazı ajanlar DNA zincirinde kırıklara neden olmaktadır. Bunlar X-ray ya da peroksidler gibi ajanlardır. Zincirde oluşan kırıklar DNA ligaz enzimi ile onarılmaktadır. DNA ligaz enzimi enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturarak onarımı gerçekleştirir (Cooper ve Hausman 2006).

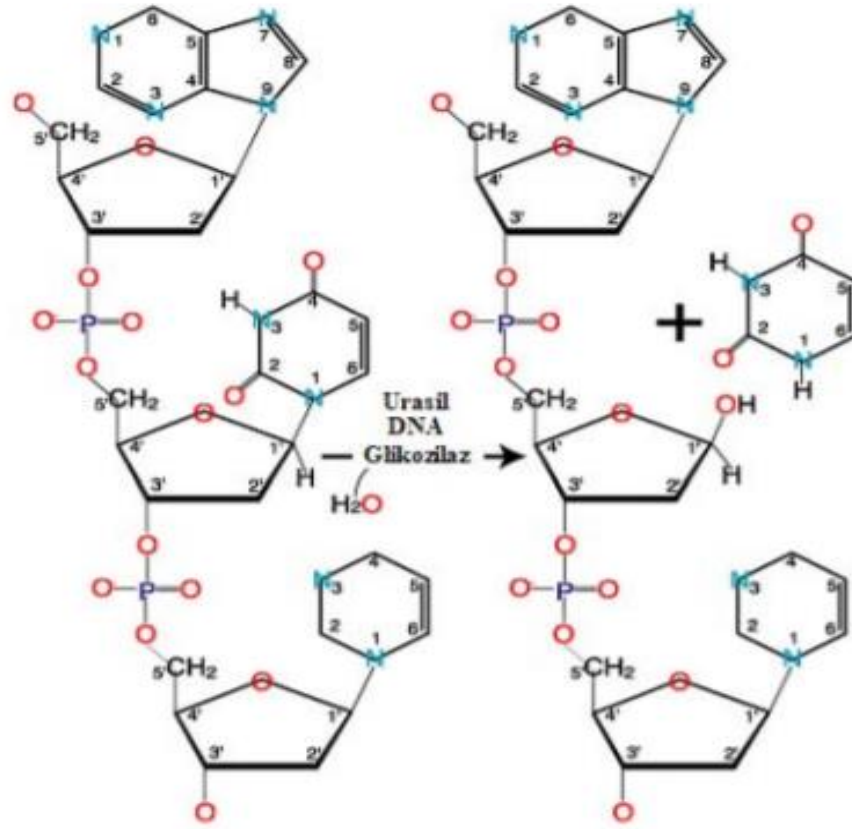
2.4.2. Doğrudan Olmayan Onarım

a) Baz Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair/BER)

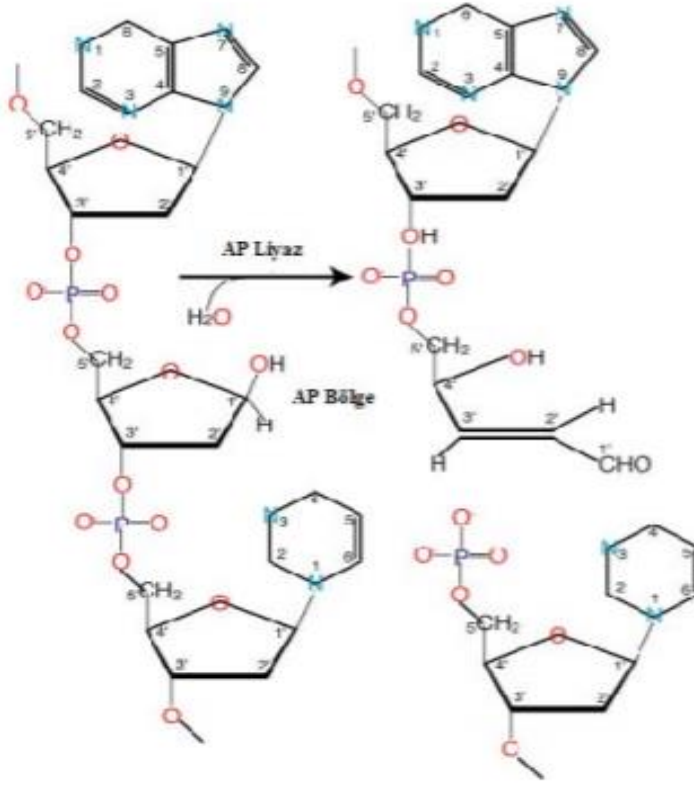
Bazlardaki kimyasal değişiklikler kendine özgü bir onarım mekanizması gerektirir. DNA hasarının geri döndürülmesi için bu gereklidir. Hücreler birçok kimyasal hasar tipini düzeltebilecek genel bir onarım mekanizması olan eksizyon onarımına ihtiyaç duyarlar. Bu mekanizma yerleştirilmesi yanlış yapılmış ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Onur ve ark. 2009).

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir AP (Apürinik / Apirimidinik) bölge oluşması. Bir memeli hücresi günde 10000 pürin ve 500 pirimidin kaybeder.
2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılır. AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulur.
3. Bu aşamada AP bölgesinin kesilip çıkarılarak uzaklaştırılır ve DNA polimeraz ile 3'-OH ucu uzaklaştırılır.

DNA N- glikozilaz enzimleri prokaryot ve ökaryotlarda benzer yapılara sahiptir. Bu enzimler DNA üzerinde hatalı bölgeyi tanır ve burada deoksiriboz şekeri ve azotlu baz arasındaki N-glikozidik bağını kırarak onarımı (Onur ve ark. 2009).



Şekil 2.12. Spontan deaminasyon sonucu hatalı baz eşleşmesine olur. Böylece DNA replikasyonu esnasında kalıcı mutasyonlara meydana gelir (Debeleş-Bütünler ve Kantarcı).

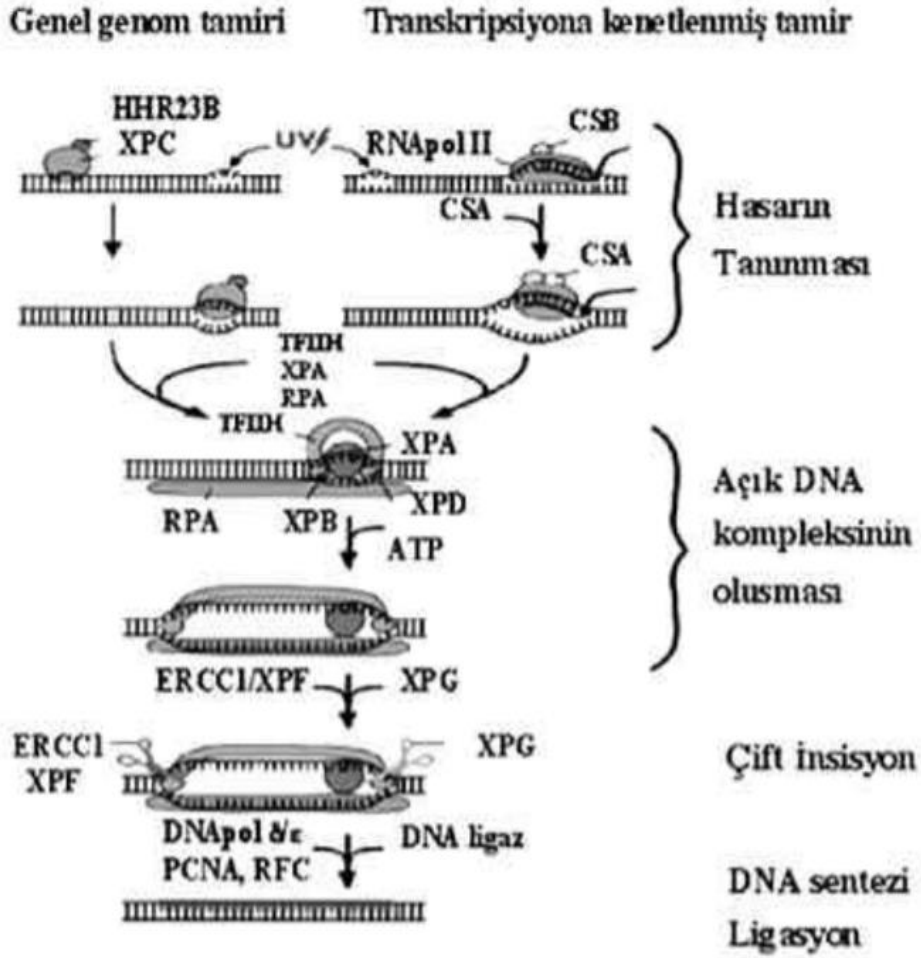


Şekil 2.13. DNA N-gikozilazlar ayrıca AP liyaz aktivitesine sahiptir (Debeleş-Bütüner ve Kantarcı 2006).

b) Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair) (NER)

(Hanawalt 2002). Mikoplazmadan memelilere kadar organizmalar tarafından kullanıldığı bilinen nükleotid eksizyon onarımı birçok DNA hasarının onarımında etkindir. UV ışınlarının karsinojenik etkilerine (dimerler) ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksid gibi etkenlerle reaksiyona girmesi sonucu oluşan büyük hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır.

NER mekanizmasının işleyişinde önce hasar tanınır hemen sonrasında protein kompleksi hasarlı bölgeye bağlanır. Bunu hasarlı zincirin kesilmesi izler ve hasarlı oligonükleotid uzaklaştırılır. DNA sarmalı üzerinde oluşan boşlukta polimerizasyon meydana gelir ve ligasyon oluşur (Onur ve ark. 2009).



Şekil 2.14. Nükleotid eksizyon genel genom tamir mekanizması (Debeleş Bütüner ve Kantarcı 2006).

Bu işlemin iyi bir şekilde oluşması için en az 30 protein gerekmektedir. Nükleotid kesip-çıkarma onarımında lezyonların genel özelliği DNA çift sarmalının helikal distorsiyonu ve DNA kimyasının modifikasyonudur (Zhang ve Rohde 2009). Nükleotid eksizyon onarım mekanizmalarının hayatın devamlılığını sağlayıcı ve genom bütünlüğünü koruyucu işlevleri otozomal resesif geçişli üç sendromla anlatılabilir. Bu sendromlar nükleotid eksizyon onarım proteinlerinden herhangi birini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan, nadir görülen sendromlardır (Kulaksız ve Sancar 2007). Bunlar:

*Xeroderma pigmentosum

*XP, Cockayne syndrome

*CS, Trichothiodystrophy TTD olarak isimlendirilmiştir. DSB (double strand break) tamirinde aktif olarak devreye giren üç NER kompleksi vardır. Bunlara sırasıyla XPC/HR23B, XPA/RPA ve ERCC1/XPF isimleri verilmiştir (Arlett ve ark. 2006).

Böyle kişilerde genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidansında artış gözlenir. Ayrıca güneşe duyarlılık, nörolojik bozukluklar, bazı dokularda erken yaşlanma gibi etkiler de meydana gelir (Onur ve ark.2009).

2.5 Reaktif Oksijen Türleri

İnsan yaşamı için oksijen çok önemlidir. Yaşamaya devam edebilmek için birincil ihtiyacımızdır. Metabolizmanın normal işleyişi sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücudu önemli ölçüde zarara uğratmaktadır (Diplock 1998). Normal oksijen molekülüne kıyasla, büyük bir kısmını serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin kimyasal reaktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Nawar 1996).

Serbest radikaller, yüksek enerjili, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren, stabil olmayan bileşiklerdir. Çiftlenmemiş elektronlar serbest radikalelere büyük bir reaktiflik kazandırarak onların protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerini sağlar. Bu negatif etki kalp-damar hastalıklarına sebep olur ve çeşitli kanser türlerini tetikler. Yaşlanmayı teşvik ettiği gibi katarakt oluşumu, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir (Diplock 1998).

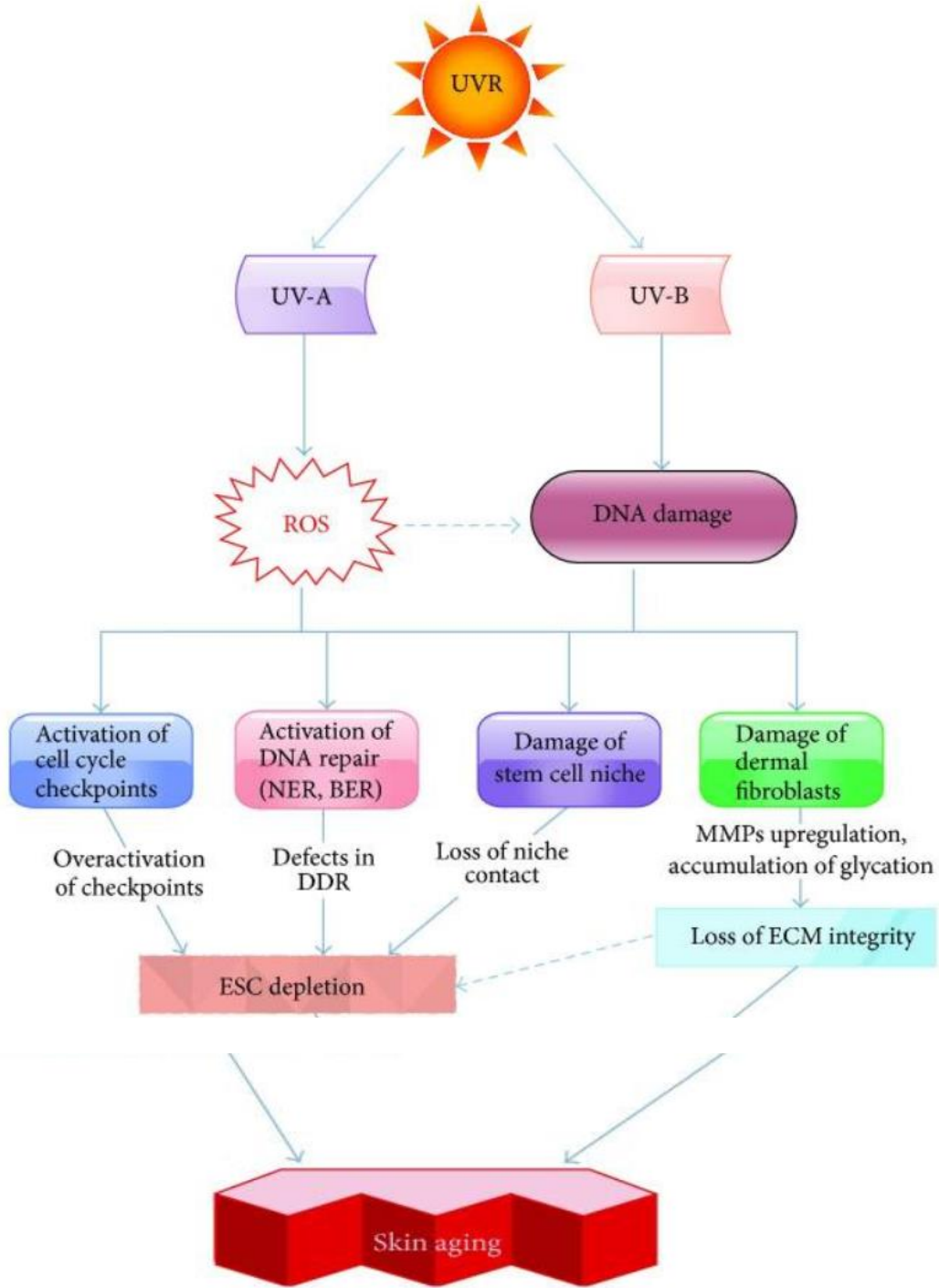
Çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen canlı hücrelerdeki oksijen metabolizmasını etkileyerek serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Tekli oksijen (O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), peroksi ($ROO\cdot$), alkoksi ($RO\cdot$) ve hidroksi ($\cdot OH$) radikalleri bunlardan en çok gözlenenlerdir (Kaur ve Kapoor 2001).

DNA onarım mekanizmalarının ötesinde, cilt hücrelerinin UV kaynaklı DNA hasarına karşı korunması enzimatik antioksidanları içerir. Kök hücre DNA hasarına sıklıkla kök hücre yaşlanması ve yaşlanması için sorumlu bir faktör olan oksidatif stres eşlik ettiği öne sürülmüştür (Moskalev ve ark. 2013). Aşırı ROS, tek telli kırılma ürünlerine neden olabilir. Oksidatif DNA hasarı, yaşayan bir hücrenin ömrü boyunca sürekli olarak

biriktirilir. Fizyolojik yaşlanma sırasında, DNA sürekli metabolik işlemin yan ürünleri olarak hücre içi ROS'a maruz kalır. ROS, günlük olarak insan vücudunda her hücrede yaklaşık 5000 tek iplik kopması oluşmasına neden olan DNA bazı veya şeker hasarı verebilir (Hoeijmakers 2009).

ROS benzer şekilde hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) zarar verir. Son zamanlarda, cildin yaşlanmasının mtDNA hasarı ve mutasyonlarla ilişkili olduğu bildirildi. mtDNA mutasyonlarının insan cildinde UVR'ye maruz kalma ve oksidatif stresin duyarlı bir biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür. ROS'un destekleyici hücre tipleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Cilt mikro ortamının önemli bir hücresel bileşeni olan insan cildindeki fibroblastların *UVR'ye maruz kalmasının* oksidatif strese ve hücre döngüsü inhibitörleri *p16INK4A* ve *p53 / p21WAF1 / CIP1*'in ekspresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir.

UVR'nin neden olduğu doğrudan DNA hasarına ek olarak, UVA maruziyetinin bir yan ürünü olan ROS, aynı zamanda DNA'yı eşit derecede yaygın bir şekilde zedeleyen DNA'ya zarar veren bir ajan olarak da önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, ROS'un geçici doğası nedeniyle, etkisini iyileştirmek ve cildi erken yaşlanmaya karşı korumak mümkündür (Panich ve ark. 2016).



Şekil 2.15. UVR ile indüklenen DNA'nın ESC'lerde hasara yol açtığı cilt yaşlanması.

UVR, ESC DNA'sına (UV-B) zarar verebilen veya DNA toksik ROS'un (UV-A) üretimini teşvik edebilen ana cilt stresleyicisidir. UVR'nin DNA'ya zarar veren etkileri, hücre döngüsü durmasının (kontrol noktası aktivasyonu) ve DNA onarım proteinlerinin, hasarlı kök hücre nişinin ve dermal fibroblastların aktivasyonu ile sonuçlanır. Bunlar,

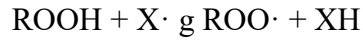
ESC'nin tükenmesini ve hücre dışı matris (ECM) bütünlüğünün kaybını kolaylaştırarak erken cilt yaşlanmasına yol açar (Panich ve ark. 2016).

2.6. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar

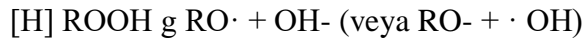
2.6.1. Otooksidasyon

Serbest radikal oluşturan mekanizmalardan ilki otooksidasyondur. Klasik bir serbest radikal zincir reaksiyonu olan otooksidasyon, atmosferik oksijen tarafından katalizlenir (Nawar 1996). Oksijenle reaksiyonu oldukça hızlı olan bu mekanizma da serbest radikal reaksiyonlarının başlaması için yine birçok mekanizma belirtilmiştir. Mesela fosfolipidler ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) otooksidasyona eğilimlidir. Bu reaksiyonda ilk oluşan ana ürünlerin hidroperoksit (ROOH) ürünleri olduğu düşünülmektedir (Porter 1985). Bu ürünlerin zincir reaksiyonunu başlatabilmesi için temel mekanizmalar vardır (Foote 1985).

1. Zincir reaksiyonuna katılabilecek bir peroksi radikalini (ROO·) oluşturmak için hidroperoksit, bazı kaynaklardan gelen başlatıcı bir radikal (X·) ile reaksiyona girebilir.



2. Hidroperoksit, bir metal iyonu veya farklı bir indirgenle indirgenebilir.

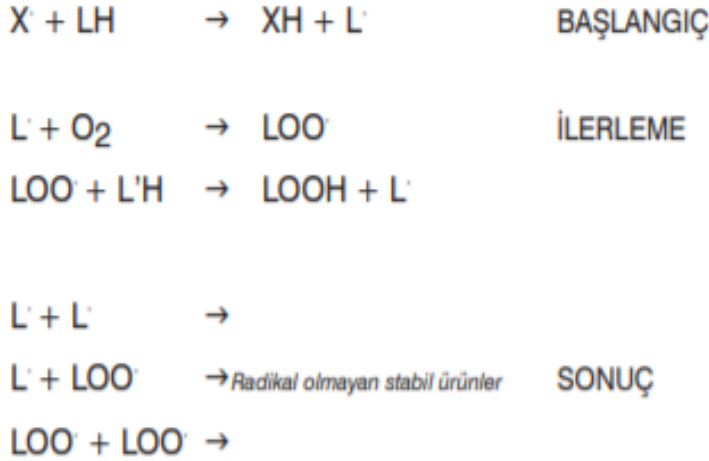


3. Yüksek sıcaklıklardansa genelde oda sıcaklıklarında hidroperoksitteki O-O bağı parçalanarak alkoksi ve hidroksi radikallerine dönüşebilmektedir. Bu diğer mekanizmalara göre pek önemli değildir.



Lipid oksidasyonunun başlama aşamasında, başlatıcı bir radikal (X) ile yağ asidi (LH) substratının reaksiyona girmesiyle H atomunun transferiyle bir lipid radikali(L) oluşmaktadır. İlerleme aşamasında, başlama aşamasının ürününe oksijen eklenmesiyle peroksi radikali (LOO·) oluşmaktadır. Oluşan peroksi radikali başka bir yağ asidinden

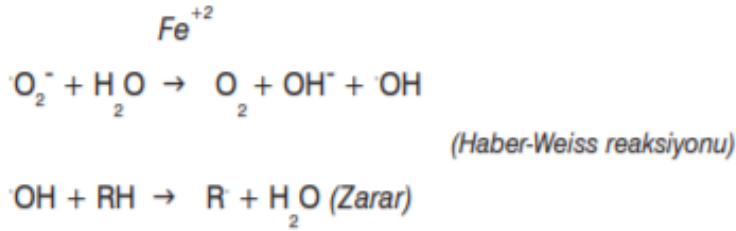
(L'H) ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeni lipid radikallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak, radikaller birbiriyle reaksiyona girerler ve radikal olmayan eter, ester, aldehit, keton ve alkol gibi ürünlere dönüşmektedir (Porter 1985).



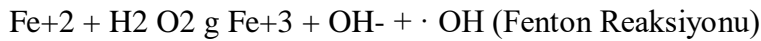
2.6.2. Geçiş Metal İyonlarının Etkisi

Canlı sistemde serbest radikal oluşmasına sebep olan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapan metaller vardır. Bunların başında demir ve bakır gelmektedir. Fe; oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkili bir metaldir. Cu'm ise katalizlediği reaksiyonlar henüz tam bilinmemektedir (Halliwell ve Gutteridge,1990). Demir ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde ve biyolojik sistemde oksijen taşınması gibi önemli rollere sahiptir. Fakat demirin serbest formları canlı hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Oluşan toksisite sonucunda meydana gelmiş olan aktif oksijen türleri lipid oksidasyonunu teşvik edebilmektedir veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir. Normal koşullarda tüm canlı hücrelerin serbest demirin etkisini yok etme mekanizması vardır. Ayrıca demirin fazlasını toksik olmayan formlarda hücre içinde depolayabilirler (Miller 1996). Bu depolamaya örnek olarak ferritin gibi proteinlerde bulunan demir ve bazı enzimlerde bulunan bakır verilebilir (Lindsay 1996). Birçok metal vücutta kelat oluşturmuş şekilde bulunur. Kelat oluşumunun antioksidan savunma sistemine önemli katkısı vardır. Vücutta ki travma, toksinler, hastalık gibi birçok nedenle metal iyon formlarına dönüşümler oluşmaktadır. Katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğu dair güçlü

kanıtlar vardır (Lavelli ve ark. 2000). Fe⁺² katalizörlüğünde H₂O₂, süperoksit anyonu (·O₂⁻) ile reaksiyona girdiğinde “Haber-Weiss reaksiyonu” oluşmaktadır. Bu reaksiyon zararlı hidroksi (·OH) radikallerini oluşturur (Duthie ve ark. 1989).



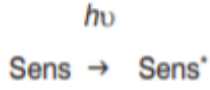
Fe iyonları, “Fenton-tip reaksiyonları” da katalizlemektedir. Burada Fe iyonları hidroperoksitlerin zararlı hidroksi radikaline dönüşmektedir Hidroksi radikali oldukça reaktif bir türdür. Genelde hızlı bir şekilde lipid radikallerini oluşturur ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatır (Miller 1996).



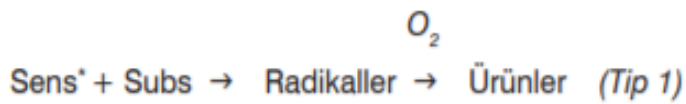
Beyin özellikle az oksijen kullanımına karşı çok hassastır. Bu sebeple oksidatif strese karşı zayıftır. Yüksek düzeylerde Fe ve diğer divalent katyonları içerir ve oluşan Fenton-tip reaksiyonlar reaktif oksijen türleri üreterek nöronlara zarar vermektedir. Beyin antioksidan savunması bakımından zayıftır ve oksidatif zararlara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitlerini de yüksek oranda içermektedir. Beyin oksidatif strese maruz kaldığı zaman dokuda oluşan hasarların beyin iskemisi, Parkinson, hafıza bulanıklığı, Alzheimer, gibi birçok sinirsel bozuklukta rolünün çok önemli olduğu bilinmektedir (Meydani 2001).

2.6.3. Fotooksidasyon

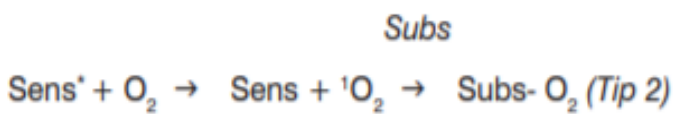
Oksidasyonlarda harekete geçirici etken olarak görev yapan peroksitlerin oluşumu fotokimyasal iz yolları için oldukça önemlidir. Süperoksit anyonu üretebilen elektron transfer proseslerinin nedeni ışığın direk absorpsiyonudur. Fotosensitize proseslerin, direkt fotokimyasal reaksiyonlardan daha önemli olmasının sebebi, bu tip indirekt oksidasyonların sensitizer (Sens) denilen bir molekül ışığı absorbe ederek bazı türlerin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Bu reaksiyonlarda çoğunlukla sensitizerin kendisi tüketilmemektedir. Işığı absorbe eden bu molekül aktif forma (Sens*) dönüşmektedir (Foote 1985).



Tekli oksijen üreten fotosensitizerler vardır. Bunlar; feofitin-a, klorofil-a, hematorporfirin, miyogloblin ve hemogloblin gibi bazı pigmentlerdir. Sentetik bir boya olan eritrosin de bu pigmentler içindedir. Tekli Fotooksidasyon reaksiyonları Tip 1 ve Tip 2 olarak ikiye ayrılır (Nawar 1996). Tip 1 reaksiyonda; aktif hale geçen sensitizer, substratla hidrojen atomu transferi ya da elektron vermek suretiyle reaksiyona girerek radikalleri üretmektedir. Bu radikaller de oksijenle reaksiyona girerek oksijene ürünleri meydana getirmektedir.



Burada aktif sensitizer tekli oksijen üretmen için O₂ ile direkt reaksiyona girer. Böylece tekli oksijen üretilir ve bu oksijen de oksijene ürünleri meydana getirmek üzere substratla reaksiyona girer.



Tip 1 reaksiyonlar için uygun bir sensitizer riboflavin benzeri filavinlerdir. Klorofil gibi porfirinler de Tip 2 prosese uyan ve önemli oranda tekli oksijen üreten sensitizerlerdendir. Histidin, metiyonin, triptofan, tirozin ve sistein içeren proteinler ve guanidin içeren nükleik asitler fotooksidasyondan zarar gören başlıca biyolojik hedeflerdir. Ayrıca, yağ asitleri ve kolesterol gibi doymamış bileşiklerin oksidasyonunun gerçekleştiği lipidler de başlıca zarar görenler arasındadır (Foote 1985).

2.6.4. Enzimatik Oksidasyonlar

Reaktif oksijen türleri, vücutta lipoksigenaz, siklooksigenaz, miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz gibi birçok enzim aktivitesinin bir sonucu olarak da üretilmektedir (Meydani 2001).

a) Ksantin Oksidaz (XOD)

ROS oluşturan enzimatik kaynakların en başında gelen XOD, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside eder. Ve NAD⁺'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimi olmasına karşın, dokuda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside eder. Ve sonucunda proteolizise sebep olan bir oksidaz enzimine dönüşür. XOD'ın faaliyeti sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır ve ksantin oksidazın beyinde iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik, ödem gibi oksidatif hasarlara neden olduğu bilinmektedir (Lavelli 2000).

b)NADPH Oksidaz

Serbest radikal oluşturan bir diğer enzim olan NADPH oksidaz nötrofillerin plazma zarında bulunan NADPHserbest radikal oluşturan bir diğer enzimdir. Mitokondri tarafından alınan oksijenin yaklaşık %1-4'ü süperoksit anyonu üretimi için kullanılır. Sonunda üretilen süperoksit anyonunun yaklaşık %20'si hücrelere aktarılır (Duthie et al. 1989).

c) Nötrofil Miyeloperoksidaz (MPO)

“Nötrofilik miyeloperoksidaz” enzimi canlı sistemde güçlü oksidan kaynaklarından birisi olup hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalizlemektedir. Reaksiyon sonucu meydana gelen toksisite

savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesini sağlar. Ve oluşan hipoklorik asit aynı zamanda α 1-antiproteinaz'ı inaktive ederek sağlıklı insan dokusuna zarar verir. Ayrıca iltihaplanmalara sebep olmaktadır (Lavelli 2000).

d) Halojenlenmiş Hidrokarbonlar

Kontamine içme sularında bulunan toksik etkili halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen azot oksitler, serbest radikal meydana getirdiği bilinen diğer olaylardır. Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan ($CBrCl_3$) gibi hidrokarbonların biyolojik sistemlerdeki oksidatif hasarın başlamasında etkili oldukları bildirilmektedir. Triklorometil, triklorometil peroksil radikalleri gibi türler, sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sisteminin çeşitli aminoasit ve doymamış yağlarla hızlı reaksiyonu sonucu CCl_4 'ün metabolizması sırasında üretilir. Sonucunda protein denatürasyonları ve lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir (Chen and Tappel 1996).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarından korunmak için vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri koruyucu rol oynar. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998).

Çizelge 2.1. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998).

Oksidan	Antioksidan savunma
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutatyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutatyon
Radyasyon	Ubikinon
Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	Selenyum
İskemi	Ürik asit
Karsinojenler	E vitamini
	C vitamini
	β - karoten ve diğer karotenoidler

2.7. Antioksidan

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları engelleyen, onları stabilize etme ve yakalama yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, ikiye ayrılır.

-Birincil antioksidanlar; var olan radikallerle reaksiyona girerek, bu radikallerin daha zararlı formlara dönüşmelerini engelleyen böylelikle yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Süperoksit, dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi birincil antioksidan kategorisinde olan süperoksit enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Enzimlerin bu yeteneği sayesinde serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesi engellenmektedir. Bunu bir hücrel bölgeden diğeri geçişini sınırlandırarak yapmaktadır (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise; radikal zincir reaksiyonlarını kıran ve oksijen radikalini yakalayan polifenoller, ürik asit, bilirubin, C vitamini ve E vitamini, gibi bileşiklerdir (Ou ve ark. 2002).

Antioksidanları, endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayırırız. Endojen ve eksojen antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini sağlayarak vücudu serbest radikallerden korur. Böylelikle antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için kullanılırlar (Aydemir ve Karadağ-Sarı 2009).

Çizelge 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay 2016).

ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kal-siyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

Etkili botanik antioksidan bileşikler, geleneksel tıpta yaygın şekilde kullanılır ve tokoferoller, flavonoidleri, fenolik asitleri, azot içeren bileşikler (indoller, alkaloidler, aminler ve amino asitler) ve monoterpenleri içerir. Antioksidanların topikal takviyesinin ciltteki antioksidan ağı etkilediği gösterilmiştir (Bensouilah VE ark. 2006.) Cildin doğal UV engelleyicileri proteinlerdir (peptid bağları), emici lipidler ve nükleotidlerdir. Bitki peptidlerinin yüksek konsantrasyonu, cilt proteinlerinin peptid bağlarını korur. Bazı ürünlerde yüksek skualen seviyesi (zeytinyağından) cildin hassas lipidlerini korur. Skualen, cildin en önemli koruyucu lipididir. Allantoin vücutta doğal olarak oluşan ve hücrenin kırılabilir DNA'sına zarar veren UV radyasyon spektrumunu emen bir nükleotittir. Allantoin, karakafes bitkisinin bir özüdür ve iyileştirici, yatıştırıcı ve tahriş edici özellikleri için kullanılır (Korać ve ark. 2011).

2.7.1. Doğal Antioksidan Kaynakları

Cildin ana tahribat faktörleri, genellikle “serbest radikaller” olarak adlandırılan oksijenli moleküllerdir. Cildin kendisini doğal olarak onarması ve yapması için teşvik etmek için, güçlü bileşenlerden oluşan bir cephaneye ihtiyacımız var. Bir gıdanın “antioksidan gücü”, hem insan organizmasını serbest radikallerin etkisinden koruyabilme hem de kalıcı oksidatif stresten kaynaklanan dejeneratif hastalıkların önlenilme yeteneğinin bir ifadesidir. [Majo ve ark. 2008] güneşin oksidatif hasarına karşı korunmada ve bu yerleşik koruyucular kendi vücudumuzda hücre koruyucusu olarak işlev görür. Yaban mersini mavi ve ahududu kırmızısı yapan pigmentler bu meyveleri oksidatif hasardan korur (Browden 2009).

2.8. Antosiyaninler

Pek çok ortak gıda da bulunan antosiyanidinler ve bunların türevleri, çeşitli mekanizmalar yoluyla çeşitli oksidanlara karşı koruma sağlar. Çoğu meyve antosiyanin kaynağında bulunan siyanidinlerin, son zamanlarda yapılan Japon hayvan çalışmalarında “*in vivo* olarak güçlü bir antioksidan işlevi” gördüğü tespit edilmiştir (Tsuda 2000). Diğer hayvan çalışmalarında, siyanidinlerin hücre zarı lipitlerini çeşitli zararlı maddeler tarafından oksidasyondan koruduğu tespit edilmiştir. Ek hayvan çalışmaları, siyanidin, E vitaminden 4 kat daha güçlü bir antioksidan olduğunu doğruladı. Antosiyanin pelargonidin, amino asit tirozini yüksek reaktif oksidan peroksinititten korur. Patlıcan, vücutta önemli bir oksidan kaynağı olan tehlikeli hidroksil radikal üreten sisteme müdahale eden, nasunin adı verilen antosiyanidin delphinidin türevini içerir. Bağ dokusunu yok eden enzimleri etkisiz hale getirirler. Antioksidan kapasiteleri oksidanların bağ dokularına zarar vermesini önler. Son olarak, kan damarı duvarlarındaki hasar görmüş proteinleri onarırlar (Korać ve ark. 2011).

***Proanthocyanidin**

Proantosiyanidin (OPC), bir DNA mutasyon inhibitörü olarak çalışır. Ayrıca, cildin elastinin bütünlüğünü koruyan ve hem C hem de E vitamini ile sinerjistik olarak hareket eden OPC bloğunu elastazı bloke eder, korur ve yeniler. Krem şeklindeki OPC araştırılmış ve UV nin tehlikeli etkilerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Güneşe maruz kalmadan önce cilde OPC kremi uygulandığında cildin daha az yanması görülür (Koraćve Kapil ve Khambholja 2011).

Üzüm çekirdeği proantosiyanidinleri (GSP) güçlü antioksidanlar ve serbest radikal temizleyicileridir (Baliga ve Katiyar 2006).

***Resveratrol**

Resveratrol, stilbenler adı verilen bir polifenolik bileşik sınıfına aittir. Resveratrol, bir trans ve bir cis konfigürasyonunda meydana gelen yağda çözünen bir bileşiktir. Doğal olarak oluşan bir polifenolik fitoaleksindir. Yapılan çalışmalar, resveratrol ile yapılan topikal uygulamanın (hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası), UVB'nin neden olduğu tümör insidansının inhibe edilmesine ve cilt tümörleri oluşumunun gecikmesine neden olduğunu göstermiştir (Baumann 2009).

Resveratrol içeren yiyecekler; üzüm, şarap, üzüm suyu, kızılçık, kızılçık suyu, yerfıstığı ve yerfıstığı ürünleri ile sınırlıdır *Polygonum cuspidatum* çok zengin resveratrol kaynaklarından biridir (Counet ve ark. 2006).

***Quercetin**

Diyetteki en yaygın flavonol, kersetindir. Quercetin, anti-enflamatuar ve antioksidan etkilere sahiptir ve immünomodülatör görevi görür. Çeşitli yaygın meyve ve sebzelerde, içeceklerde ve bitkilerde bulunur. En yüksek konsantrasyonlarda soğan bulunur (Erlund 2002).

Quercetin ve rutin, insanlarda potansiyel topikal güneş koruyucu faktörleri olarak test edildi ve UVA ve UVB aralığında koruma sağladığı bulundu (Choquenot ve ark. 2008).

***Apigenin**

Apigenin, bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde ve meşrubatlarda ortaya çıkan yaygın bir bitki flavonoididir. Apigenin, SKH-1 farelerinde UVA / UVB ile indüklenen deri karsinogenezinin önlenmesinde etkili bulunmuştur. Kadife çiçeği (*Calendula officinalis*) ' de, Artemisia (*Artemisia inculta*) ve (*Cuminum cyminum*) kimyon, havuç (*Daucus carota*), agrimony (*Agrimonia eupatoria*), arnica (*Arnica montana*), mor koni çiçeği (*Echinacea purpurea*) ve eyebright (*Euphrasia officinalis*) gibi bitkilerde bulunur. Doğru koşullarda kullanıldığında anti-enflamatuar aktivite göstermiştir (Korać ve ark. 2011).

***Silimarin**

Silimarin, süt devedikeni (*Silybum marianum*) tohumlarında bulunan bir flavonoid bileşimidir (Katiyar ve ark. 1997). Silymarin, sililybin, silidianin ve silisristin fitokimyasal maddelerinden oluşur. Silybin en aktif fitokimyasaldır. Topikal silimarinin belirgin bir antitümör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Silimarin UV kaynaklı güneş yanığı hücre oluşumunu ve apoptozu azaltmıştır. Silimarin tedavisi, UVB'nin neden olduğu immün baskılamayı ve *in vivo* oksidatif stresi önler (Saraf ve Kaur 2010).

***Kürkümün**

Curcumin (diferuloylmehane) zerdeçal köksapından (*Curcuma longa*) izole edilen sarı kokusuz bir pigmenttir. Curcumin, anti-enflamatuar, antitümoral ve antioksidan özelliklere sahiptir. Kurkuminin inhibe edici etkileri, reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme yeteneğine bağlandı (García-Bores ve Avila 2008).

***E Vitamini**

Antioksidan E vitamini (α -tokoferol), hem hayvansal hem de bitki hücre zarlarını ışık kaynaklı hasarlardan koruyabilir.] Bu antioksidanların cilde topikal uygulanmasının akut ve kronik foto-dozu azalttığı gösterilmiştir. Topikal olarak uygulanan, yalnızca doğal E vitamini formları - alfa-tokoferol ve tocotrienol - cilt pürüzlülüğünü, yüz hatlarının uzunluğunu ve kırışıklıkların derinliğini etkili bir şekilde azaltır. Topikal

olarak uygulanan E vitamini, stratum korneum'un hidrasyonunu ve su bağlama kapasitesini artırır . E vitamini serbest radikal temizleyicidir ve yumuşatıcıdır (Dayan 2008).

Triticum vulgare (buğday tohumu) ağı, özellikle E vitamini bakımından zengindir ve topikal antiaging formülasyonlarında mükemmel bir antioksidandır. Ayrıca, besler ve deriden nem kaybını önler (Kapoor ve Saraf 2010).

Cucurbita pepo (kabak) tohumu yağı yüksek seviyelerde linoleik asit (%43- 53) içeren bir lipit profili ile, iki sınıf antioksidan bileşiği içerir. Antioksidan etkilerin %59'unu oluşturan tokoferoller ve fenoliklerdir. Özellikle Doğu ve Orta Avrupa ve Orta Doğu'nun şifalı folklorunda besleyici yararları nedeniyle değerlidir. Güçlü, zengin aroması nedeniyle, sadece topikal formülasyonlarda küçük oranlarda kullanılır (Bensouilah ve ark. 2006).

***Askorbik Asit (C vitamini)**

C vitamini (L-askorbik asit) vücudun en önemli hücre içi ve hücre dışı sulu faz antioksidanıdır. C vitamini cilde birçok fayda sağlar. C vitaminini anti-enflamatuvar özellikleri ile foto koruma da etkilidir. Birkaç ay boyunca yapılan foto koruma, cildin önceki foto verilerini düzeltmesini sağlar. Kollajen sentezi ve MMP-1'in inhibisyonunun kırışıklıkları azalttığı, tirozinaz ve anti-enflamatuvarın inhibisyonu olduğu kanıtlanmıştır.

C vitamini aktif biçimde Kuşburnu çekirdeği ekstresi veya yağında önemli miktarlarda bulunur (Svobodová ve ark. 2003).

***Karotenoidler**

Sağlıklı takviye edilmemiş bir diyetten elde edilen diyet karotenoidleri ciltte birikir ve seviyeleri güneşten korunma ile önemli ölçüde ilişkilidir. Çok miktarda balık yağı yemek, bazı durumlarda 5 SPF'ye kadar bazı durumlarda güneşten koruyucu bir etki sağlıyor gibi görünmektedir ve düşük bir prostaglandin E2 seviyesi (iltihaplanma için arakidonik asit kaskantında bir arabulucu) tarafından UV kaynaklı iltihaplanma tepkisini azaltabilmektedir. İnsan fibroblastlarında, likopen, β -karoten ve lutein, UVB'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde azaltabilmişlerdir. Bir

linik çalışma, likopen, lutein, β -karoten, α -tokoferol ve selenyum ile 12 haftalık oral takviyeden sonra cilt kalınlığı, yoğunluk, pürüzlülük ve ölçekte önemli gelişmeler olduğunu bildirmiştir (Dayan 2008).

2.9. Bitkisel Ekstratlar

Bütün bitki özleri, cilt üzerinde daha iyi etkiler sağlayan çok sayıda bileşikten oluşur. Bir bitki özütü, antioksidan, antiinflamatuvar, yumuşatıcı, melanin inhibe edici, antimutagenik, yaşlanma önleyici özellikler, vb. gösterebilir.

*Yeşil ve Siyah Çay

Çoğu insan mutfağında çay içer. Çay (*Camellia sinensis*) genellikle güneş yanığı için ev ilacı olarak kullanılır. Çinliler, güneş yanığını yatıştırmak için cilde serin siyah çay uygulanmasını tavsiye eder. Biri çaydaki tanik asit ve teobrominin güneş yanıklarından gelen ısıyı gidermeye yardımcı olduğunu söylüyor. Çaydaki kateşinler adı verilen diğer bileşikler cilt hasarını önlemeye ve onarmaya yardımcı olur ve hatta kimyasal ve radyasyona bağlı cilt kanserlerini önlemeye yardımcı olabilir (Korać ve Khambholja 2011).

Çaydaki kompleks polifenolik bileşikler, cilt için iç organlarda olduğu gibi aynı koruyucu etki sağlar. Hücre proliferasyonunda, enflamatuvar yanıtlarda ve tümör promoterlerinin cevaplarında önemli olan biyokimyasal yolları modüle ettikleri gösterilmiştir. Yeşil çayın hem insan hem de hayvan derisinde anti-enflamatuvar ve antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir. Hayvan çalışmaları, oral veya topikal olarak uygulandığında, çay polifenollerinin, cilt hasarı, eritem dahil olmak üzere UV maruziyetinin ardından, olumsuz cilt reaksiyonlarını hafiflettiğine dair kanıtlar sağlar. Lipit peroksidasyonu. İltihaplanma ve oksidatif stres yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynadığı için yeşil çay, iltihabı azaltarak ve serbest radikalleri temizleyerek de antiaging etkilere sahip olabilir. Araştırmacılar yeşil çaydaki ana etken madde olan epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 'nin antiinflamatuvar, antioksidan ve güneş koruyucu olarak iyi çalıştığını buldular. İnsan derisine uygulanan topikal yeşil çay foto-koruyucu bir etki sağlar, güneş yanığı hücrelerinin sayısını azaltır, epidermal Langerhans hücrelerini UV hasarından korur ve UV radyasyonundan sonra oluşan DNA hasarını azaltır. Yeşil çayın, farelerde topikal ve oral uygulama ile melanom hücre oluşumunu

azalttığı bulundu. Çay ekstraktları veya fenoller içeren çoğu kozmetik ürün, kontrollü klinik denemelerde test edilmemiştir (Hirsch ve ark. 2008).

***Aloe Vera**

Aloe vera veya *Aloe barbadensis*'in olumlu etkisi; radyasyon, termal veya güneş gibi her türlü yanma için bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca cilde zarar veren bu olaylardan önce, sırasında ve sonrasında kullanılırsa profilaktik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Açıkça, bitki çoğunlukla yatıştırıcı ve serinletici etkisi için kullanılır. Bununla birlikte,% 50'den daha az kullanılırsa bitki yararsızdır ve herhangi bir faydalı etkinin olduğundan emin olmak için% 100'de kullanılması önerilir. Polisakaritler, mannoz-6-fosfat ve kompleks antrakınonların hepsi, bu maddenin yararlarına sinerjistik olarak katkıda bulunur (Dweck 2002).

Aloe vera'nın doğal kimyasal bileşenleri aşağıdaki ana alanlarda sınıflandırılabilir: Amino asitleri, antrakınonlar, enzimler, lignin, mineraller, mono ve polisakaritler, salisilik asit, saponinler, steroller ve vitaminler. *Aloe vera* sadece fibroblast hücre yapısını iyileştirmekle kalmadı aynı zamanda kollajen üretim sürecini de hızlandırdı. *Aloe vera* cilt için benzersiz bir etkili nemlendirici ve iyileştirici maddedir (Barcroft ve Myskja 2003).

***Ceviz**

Ceviz özü, İngiliz cevizinin taze yeşil kabukları *Juglans regia*'dan yapılmıştır. Sulu ekstrenin, kendiliğinden bronzlaşan güneş koruyucu bir ajan olarak özellikle etkili olduğu gösterilmiştir. En önemli bileşeni, lawsone (2-hidroksi-1,4-naftokinon) ile yakından ilişkili bir naftol olan juglon'dur (5-hidroksi-1,4-naftokinon). Juglon'un, sklerojuglonik bileşikler oluşturmak üzere ciltte bulunan keratin proteinleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Bunlar renklidir ve UV koruma özelliklerine sahiptir (Dweck 2009).

***Krameria Triandra**

Krameria triandra kökü ekstresinin (%15 neoliganlar) antioksidan potansiyeli, kimyasal ve fiziksel (UVB radyasyonu) serbest radikal indükleyicilere maruz kalan farklı hücre

modellerinde, sıçan eritrositlerinde ve insan keratinosit hücre hatlarında değerlendirilmiştir. UVB radyasyonuna maruz kalan kültürlenmiş insan keratinositlerinde, Krameria triandra kökü özü önemli ölçüde ve doza bağlı olarak hücre canlılığı ve hücre içi oksidatif hasardaki kaybı azaltmıştır. Ekstrenin sitoprotektif etkisi, daha ciddi bir hücre hasarı modelinde doğrulandı. Keratinositlerin, % 50 hücre ölümüne neden olan daha yüksek UVB dozlarına maruz bırakılması 10 ug / ml ile takviye edilmiş keratinosit kültürlerinde, hücre canlılığı neredeyse tamamen korunmuş ve (-) -EGCG ve yeşil çaydan daha verimlidir (Carini ve ark. 2002).

2.10. Güneş Kremi Olarak Bitkisel Yağlar

Araştırmacılar, bazı bitkisel yağların doğal güneşten koruyucular içerdiğini bulmuşlardır. Örneğin, susam yağı UV ışınlarının %30'una dayanırken, hindistancevizi, yer fıstığı, zeytin ve pamuk tohumu yağları yaklaşık% 20'sini bloke eder. Mineral yağ UV ışınlarına karşı dayanıklı olmamasına rağmen, yağ bezlerinden salgılanan sebümü çözerek cildin korunmasına yardımcı olarak cildin buharlaşmasına yardımcı olur (Korać ve ark. 2011).

***Hodan Yağı**

Borage (*Borago officinalis*) yağı, cilt hücresi aktivitesini uyarır ve cilt yenilenmesini teşvik eder. Yüksek düzeyde gamma-linoleik asit (GLA) içerir, bu da tüm cilt hastalıklarının, özellikle alerjilerin, dermatit, iltihaplanma ve tahrişin tedavisinde faydalıdır. Borage cilde kolayca nüfuz eder ve her tür cilde, özellikle de kuru, kurutulmuş, olgunlaşmış veya erken yaşlanan cilde yarar sağlar.

***Çuha Çiçeği Yağı**

Akşam çuha çiçeği (*Oenothera biennis*) yağı, sağlıklı cilt ve cilt onarımını teşvik eden yüksek bir GLA içeriğine sahiptir. Genellikle sarı renktedir. Cilt problemlerini ve iltihaplanmayı yatıştırır, egzama, sedef hastalığı veya herhangi bir dermatiti olan insanlar için iyi bir seçimdir. Akşam çuha çiçeği cilt yağı kuru cildi ve cildin erken yaşlanmasını engeller (Wilson 2002).

***Avokado Yağı**

Doğal gıda dükkanlarında yüksek kaliteli, doğal güneş ve güneş sonrası ürünler bol miktarda bulunur. Avokado ((*Persea americana*) yağı, E vitamini, β – karoten, D vitamini, protein, lesitin ve yağ asitleri bakımından zengindir ve preparatlara eklendiğinde önemli faydalar sağlar. Avokado yağından biberiye ve karakafes gibi botaniklere kadar bu bileşenler cildi yatıştırır ve korur (Müftü 2003).

***Çay Ağacı Yağı**

Çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) yağı, eski bir yerli ilaçtır. Etkili bir antiseptik, fungusit ve mikrop öldürücüdür. Kılcal damarlardaki kan akışını artırarak güneş yanığını azaltarak, cildi zedeleyen besinlere yol açan güneşten koruyucu formüllerin popüler bir bileşenidir (Müftü 2003).

***Porphyra**

Doğu Asya'da yaygın olarak tüketilen lezzetli kırmızı algler olan *Porphyra* (*Bangiales*, *Rhodophyta*), yüksek seviyede serbest amino asit içerir; yoğun radyasyona maruz kaldığında, mikosporin benzeri amino asitler gibi UV emici ikincil metabolitleri sentezler. Hindistan'da tespit edilen neredeyse yedi *Porphyra* türü vardır. Bunların arasında, günümüzde *Porphyra vietnamensis* daha fazla dikkat çekiyor. Pazarlanan *Aloe vera* jeli, izole edilmiş bileşik jel ile karşılaştırıldığında geniş UV dalga boyu (250-400 nm) üzerinde düşük emme gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da *Porphyra-334*'ün daha güçlü olduğunu gösteriyor (Bhatia ve ark. 2010).

2.11. Likenler

Latince bir terim olan “lichen” M.Ö. 4. yüzyılda Yunanlı botanikçi Theophrastos tarafından kullanılan bir terimdir ve ilk defa ciğerotları için kullanılmıştır. İsveçli Eric Acharius, likenolojinin babası olarak bilinir. Eric Acharius likenlerin ilk uygun sınıflandırmasını yapmıştır. Çeşitli habitatlarda ve substratlar üzerinde geniş bir yayılışa sahip olan likenler (Karamanoğlu 1971), en az bir alg türüyle ile bir mantar türünün birbirlerinden fayda sağlayacak şekilde birleşmesinden oluşan simbiyotik organizmalardır (Güner, 1986). Bu algler yeşil veya mavi-yeşil alglerdir. Alg ve mantar türünün fizyolojik ve morfolojik birleşmesiyle oluşan likenlerin, yeryüzünde neredeyse 20 bin türü bulunur. Özellikle havası temiz olan habitatlarda, çöllerden kutuplara kadar her yerde yaşamlarını sürdürürler. Bazı türler hava kirliliğinin göstergeleridir. Uzun ömürlü ve yüksek şartlara dayanıklıdırlar fakat çok yavaş büyürler. Türkiye’de literatürde kayıtlı yaklaşık 1600 liken türü bulunmaktadır. Fakat bu sayı için gerekli araştırmalar henüz yapılmamıştır. Yapılma-yanlarla beraber bu sayının 3000’i geçeceği düşünülmektedir (Çobanoğlu 2012).

Ozon tabakasındaki incelmeler nedeniyle özellikle bahar aylarında Antartika’da UV radyasyonunun bitkilerin büyümesini etkilediği ve UV radyasyonun meydana getirdiği hasardan korunmak için bitkilerin çeşitli mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir (Robinson ve Ark.,2003). Likenler UV radyasyonuna karşı 3 mekanizma geliştirmişlerdir. Fotosentetik bileşenleri sayesinde fotobiyont, tallusun içerisinde bir katman oluşturarak UV’ye karşı koruma sağlar (Ott,2004). Bir diğer mekanizmaları da serbest radikallerden ve aktif oksijen türlerinden DNA’da veya hücre membranında meydana gelebilecek hasarları önleyen antioksidanlardır (Paudel ve ark., 2008). En önemli mekanizmaları ise UV ışınlarına karşılık olarak indüklenen ve son derece etkili olan parietin, melanin, usnik asit gibi sekonder metabolitleridir (Solhaug ve ark. 2003).

Birçok liken tallusların kuru ağırlığının %30’u kadar sekonder metabolit üretebilir (Huneck,1973). Sekonder metabolitlerin çeşitli özgül rolleri olduğu tahmin edilmektedir. Sekonder metabolitlerin en önemlileri olan pigmetlerin fotokoruyucu özellikte olduğu bilinmektedir (Gausla ve Solhaug, 1996). Yapılan çalışmalarda Xanthoria parietina’nın talluslarındaki parietin konsantrasyonu habitatlardaki ışık yoğunluğu ve iklim ile ilişkilendirilmiştir (Hill ve Woolhouse 1966).

Likenler ile araştırmalar yapan Kappen (1994) tarafından da parietinin fotokoruyucu etkisi vurgulanmış, parietinin yoğun UV radyasyonuna karşı iki simbiyontu da koruduğunu belirtmiştir.

Bu alışma UV ışınlarını absorbe etme yeteneği olduğu bilinen parietin liken ekstraktının, insan deri fibroblastlarında koruyucu etkisini araştırmak amacıyla dzenlenmiştir. Bu çalışmada yapılması planlanan araştırmalar sonrasında elde edilecek verilerin UV radyasyonun neden olduğu hasarlara karşı liken ekstraktının koruyuculuğunun daha iyi anlaşılması ve geliştirilen gneř kremlerinin içeriğinde yer alan UV filtrelele doğal bir alternatif olabileceği dűřnűlmektedir.

2.12. Toksisite Testi

2.12.1. Sitotoksite testi

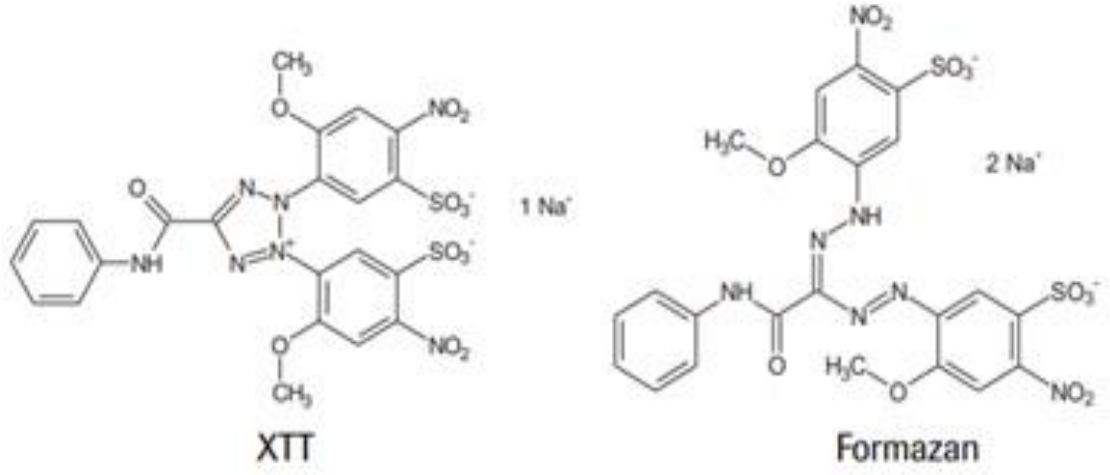
Herhangi bir canlının hűrelerinin suni ortamda yařatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan elde edilen hűrelerin kullanılabilmesi hűre kűltűrű çalıřmalarının tercih sebepleri arasında yer almaktadır. Ayrıca birçok etik kaygıyı gidermesi de bunun en önemli sebeplerinden biridir (Zucco ve ark., 1998). Sitotoksite belirleme metodları genel olarak luminesans, enzimatik ve kolorimetrik yűntemlerdir (Crouch ve ark. 1993; Fan ve Wood 2007; Longo-Sorbello ve ark. 2006).

a)XTT

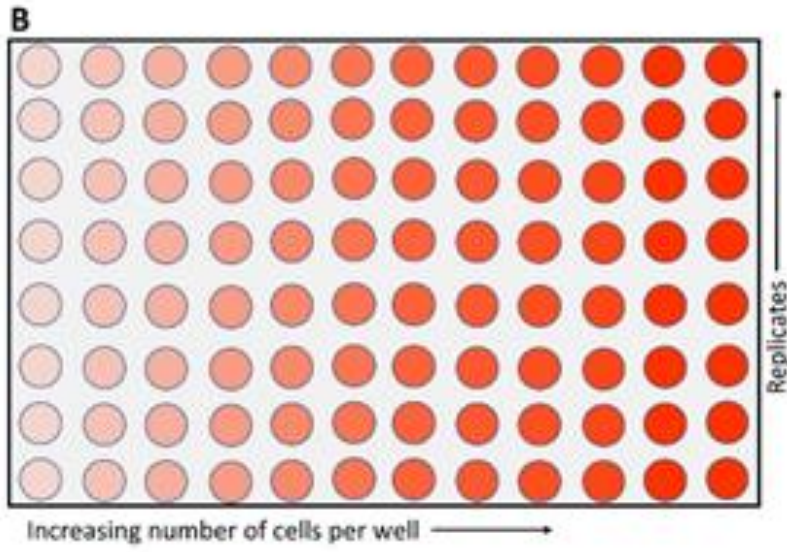
XTT(2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sűlfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid), renk deđiřikliđi ya da kristal viyolet, nűtral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hűrelerin spesifik boyanması esasına dayalı kalorimetrik bir methodtur (Borenfreund ve Puerner 1985; Feoktistovve ark. 2016; O'Connor ve ark. 1998; Riss ve ark. 2006).

Tetrazolium tuzu olan XTT, yaygın olarak, hűre canlılıđı ve proliferasyonu ۆlmek için kullanılan test yűntemidir (Berridge ve ark. 2005; Hasen and Bross 2010; Tsukatani ve ark. 2009; Wang ve ark. 2010). Canlılık ve proliferasyon; canlı hűrelerdeki mitokondrial dehidrogenaz enziminin suda özűnen XTT'yi turuncu formazan űrűnűne indirgenmesine dayanır (Wang ve ark. 2011) (řekil 2.20). Formazan űrűn miktarı gűreceli hűre canlılıđı tahmin etmek için bir spektrofotometre kullanılarak ۆlűlűr.

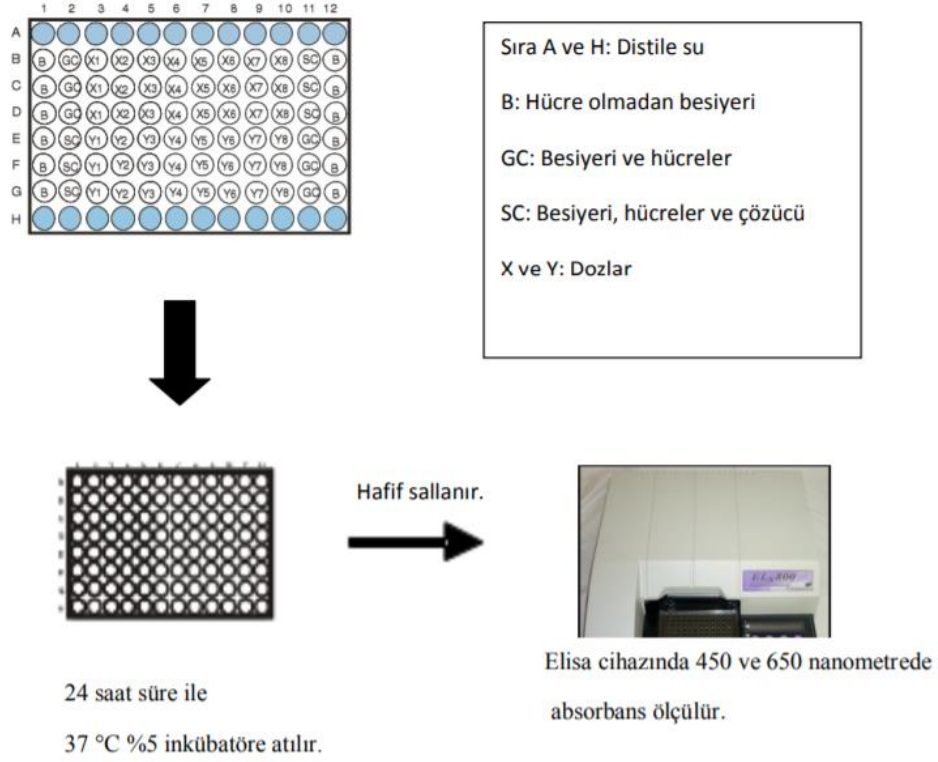
Yaygın olarak, bu dönüşüm sadece canlı hücrelerinde meydana gelmektedir (Zhu ve ark. 2004).



XTT nin formazom kristaline dönüşü



Şekil 2.16. Xtt testindeki renk değişimi.



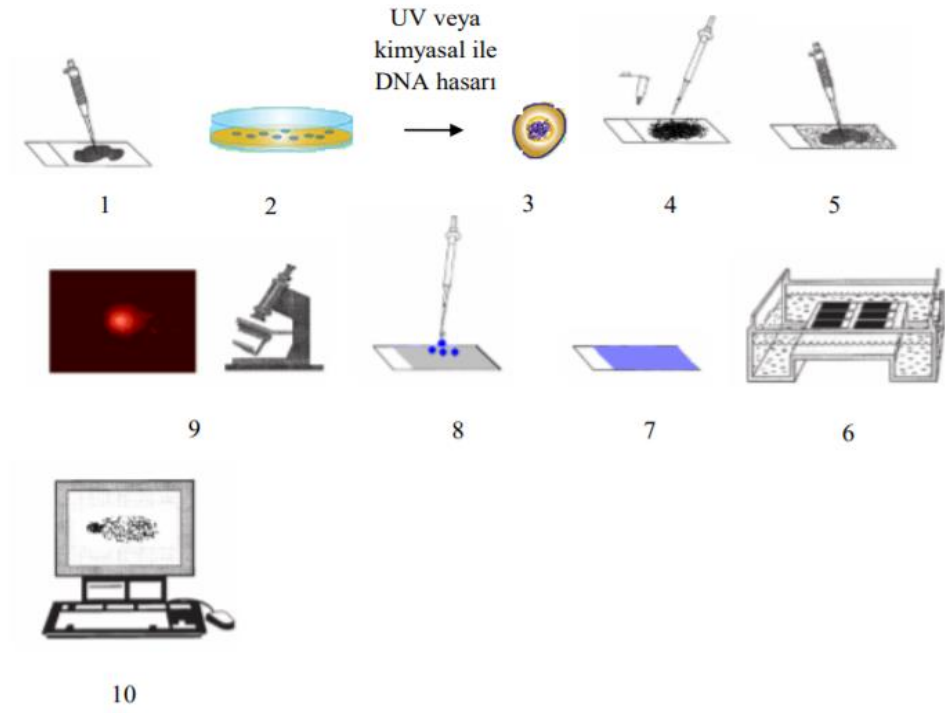
Şekil 2.17. XTT testi aşamaları.

2.12.2. Genotoksisite Testi

a) Komet Testi

Komet Yöntemi ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını hücre bazında saptar. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Durmaz ve ark. 2010). Hücre bazındaki DNA hasarını ilk Rydberg ve Johanson' adlı araştırmacılar saptamıştır. Bu araştırmacılar, hücreleri parçalayıp agaroz içerisine gömdükten sonra agarozu lam üzerine aktararak alkali koşullarda DNA'nın açılmasını sağlamışlardır. Diğer bir araştırmacılar Ostling ve Johanson 1984 yılında yöntemin duyarlılığını arttırmak için mikrojel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir. Araştırmacılar agaroz jel içerisine yerleştirdikleri hücreleri lam üzerine aktarmışlardır. Devamında yüksek tuz konsantrasyonları ve deterjanlar kullanarak parçalamışlardır. Böylelikle açığa çıkan DNA'ya, nötral şartlarda elektroforez uygulayarak elektroforez sonunda DNA'yı floresans bir boya (etidyum bromür) ile boyamışlardır. Jelde baş ve kuyuktan oluşan, kuyuklu yıldız benzeyen

görüntülerin oluştuğunu keşfetmişlerdir. Bundan dolayı da bu tekniğe “COMET ASSAY” adını vermişlerdir (Şekil 2.18) (Rojas ve ark. 1999).



Şekil 2.18. Komet testi aşamaları (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

1. Lam üzerine agaroz hazırlanması
2. Hücre kültürü ortamında hücrelere kimyasal güneş koruyucu verilmesi
3. Hücrelerin falkon tüpüne toplanması
- 4-5. LMA ve hücre süspansiyonunun agaroz kaplı lam üzerine tatbiki
6. Elektrik akımı altında elektroforez uygulanması
7. Nötralizasyon sıvısı konularak bekletilmesi
8. Soğuk distile su ile yıkanıp havada kurutulması, kuruma sonrası lamlar soğuk etanolde fikse edilmesi ve etidium bromür ile boyanması
9. Komet şekillerinin floresan mikroskopunda incelenmesi
10. DNA hasarının bilgisayar yardımıyla analiz edilmesi gösterilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada *Xhantoria Parietina* likeni ekstratının 1929 fare sağlıklı deri fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmış, hücre içi Ros seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla sitotoksisite testi olarak XTT, genotoksisite testi olarak da tek hücre jel elektroforez (komet) testi kullanılmıştır. Hücre içi ROS seviyesi ise ROS testi ile değerlendirilmiştir.

Yukarıda belirtilen testleri gerçekleştirmek için *Xhantoria Parietina* liken ekstratı, Bursa Uludağ Üniversitesi kampüsünden toplanan örneklerle hazırlanmıştır. Aşağıda ki fotoğraflarda *Xhantoria Parietina* likeninin görselleri yer almaktadır.



Şekil 3.1. *Xhantoria Parietina* Liken Örneği



Şekil 3.2. *Xhantoria Parietina* Liken Örneği (Nisan 2017).



Şekil 3.3. *Xanthoria Parietina* liken örneği (Uludağ Üniversitesi Kampüsü)

3.1. Katı-Sıvı Ekstrasyonu

Ekstraksiyon endüstride; altın, ilaç, petrol, kozmetik, gıda gibi birçok alanda kullanılan verimli bir ayırma işlemidir. Özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonu distilasyonun kullanılmadığı birçok durumda alternatif yöntem oluşturmuştur. Karışım halindeki homojen uçucu sıvı bileşenlerin kaynama noktalarının birbirine çok yakın olması, bileşenlerin kaynama noktalarının elde mevcut olan ısıtma ortamına göre çok yüksek olması veya bir kısım bileşenin diğerlerinin kaynama noktasında bozunması gibi sakıncalar sebebi ile distilasyon işleminin uygulanması imkansız hale gelebilir. Sabit sıcaklık ve basınçta bir maddenin iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanarak yapılan ayırma işlemine ekstraksiyon adı verilir. Fazlardan biri katı biri sıvı olabildiği gibi her ikisi de sıvı olabilir. Buna göre, sırayla katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlarından söz edilir. Katı-sıvı ekstraksiyonu ile katı içinde bulunan bir madde bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir sıvı yardımıyla alınır. Fazlar ayrıldıktan sonra sıvının herhangi bir yoldan uzaklaştırılması ile katı içindeki madde ele geçer. Ayçiçeği ve pamuk çekirdeklerindeki yağın hekzanla ekstrakte edilerek çekilmesi tipik bir örnektir. Katı faza ekstrakte edilen, saf sıvıya ekstrakte eden, elde edilen sıvı karışıma ise ekstrakt adı verilir. Örneğin; katı çay yaprakları ekstrakte edilen, su ekstrakte eden ve çay ekstrakt olur. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ilk sıvı faz içindeki bir madde bu maddeyi daha çok çözen ve ilk sıvı ile hiç karışmayan bir ikinci sıvı kullanılarak çekilir. Örneğin, suda çözülmüş olan bir organik madde daha çok çözünebileceği ve su ile hiç karışmayan eter ya da kloroform gibi organik sıvılarla ekstrakte edilir (Perry ve Green 1985). Katı-sıvı ekstraksiyon başlıca doğal ve biyolojik örneklerle ilgili uygulamalarda kullanılır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda katının içerdiği maddelerden biri veya bir bölümü uygun bir çözgen ile ekstrakte edilir. Katıların ekstraksiyonu genellikle uzun zaman aldığı için sürekli ekstraksiyon yöntemleri tercih edilir. Maddenin katı içinden difüzenmesi yavaş bir işlem olduğu için katı örnek ince toz haline dönüştürüldükten sonra ekstrakte edilmelidir. Böylece maddenin çözgenle daha fazla teması sağlanır (Geankoplis 1983).

3.1.1. Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı

Soxhlet ekstraksiyon yöntemi narin bitkilerden yüksek miktarda fakat en basit ve en ucuz yolla esansiyel yağ elde etmek için kullanılır. Bunun için aşağıda görülen soxhlet ekstraksiyon cihazı kullanılır.

Soxhlet ekstraksiyon yöntemini uygulayabilmek için katı materyal kurutulur, küçük parçalara ayrılır ve bu katı parçacıklar selülozdan yapılmış olan ekstraksiyon kartuşuna doldurulur. Bu kartuşda ekstraksiyon kolunun içine yerleştirilir. Cam balona solvent olarak kullanılacak kimyasal madde konulur ve ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanır. Buharlaşan çözügen ekstraksiyon kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucuda yoğunlaşan çözügen tekrar ekstraksiyon koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan maddeyi çözer ve cam balona geri döner. İşte bu işlem sürekli tekrarlanarak ekstraksiyon tamamlanmış olur (Geankoplis 1983).

Xhanthoria parietana liken ekstraksiyonu yapılırken 10.0 g liken tartılarak soxhlet kartuşuna koyuldu. 150 ml metanol balon jøjeye koyuldu. Soxhlet kartuşu ve balon jöje ekstraksiyon cihazına yerleştirildi ve 24 saat ekstraksiyon yapıldı.

3.2. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1’de Kullanılan ekipmanlar, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan ekipmanlar.

Ekipman	Marka/Model
Etüv	BINDER – CB 150
Soğutmalı santrifluj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektro.mag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLIPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS

Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeler.

Sarf Malzeme	Firma/ Katalog No
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ Dragon MED Levo plus
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPML-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirtüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA (ROS Kit)	Cell Biolabs'OxiSelect™ / 59342021
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576
Cosmasie Brilliant blue G-250	7815 SIGMA Brilliant Blue G 250

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Besiyeri Hazırlanması

500 ml'lik EMEM medyumuna içine ; 6 ml penisilin-streptomisin, 6ml sodyum pirüvat, 60 ml fetal bovine serum, 3ml L- glutamin veya 6 ml NEAA (non esansiyel amino asit) eklenerek hazırlanmıştır.

3.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Hazırlanması

%35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl distile su eklenerek 5 ml'ye tamamlanmış ve böylece yeni bir stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4. XTT Testi

XTT çözeltisinin hazırlanması -20 °C'deki XTTI ve XTTII çözeltileri karanlık ortamda olmak üzere 37 °C su banyosunda ısıtılmış ve laminar akımda 1:50 oranında karıştırılmıştır.

XTT Testi Protokolü

Hücrelerin 75 cm²'lik flasklarda 1 hafta boyunca büyümesi beklenmiştir. Büyüyen hücreler 96 kuyucuklu plakelere ekilmiştir. L929 hücre hattı için her bir kuyucuğa 5×10³ hücre, ve yine her bir kuyucuğa 200'er µl besi yeri konulmuştur. 37 °C ve %5 CO₂ ortamlı inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra besi yeri değiştirilmiştir ve *Xanthoria parietina* ekstratının 0,1 ile 25,6 µM arasında değişen farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 24 saatlik muameleden sonra kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa aktive olmuş XTT solüsyonu eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropilaka okuyucu ile 450nm'de absorbans ölçülmüştür ve poliferasyon eğrisi çizilmiştir. Blankler çıkarıldıktan sonra IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozları (1- A muamele grubu / A kontrol) x100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Y eksenine doz, X eksenine canlılık olan dağılım eğrisi çizilmiştir. Daha sonra grafik üzerinde doğrusal 3 nokta seçilerek eğilim çizgisi eklenmiştir. Eğilim çizgisinin formülünde y yerine 12,5, 25, 50 ve 75 yazılarak sırası ile IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozları hesaplanmıştır.

Kimyasalların Hazırlanması: 1. Kullanılacak olan kimyasallar deneyden önce 37 °C'de ısıtılarak eritilmiştir. 2. XTT kimyasalına 1:50 hacim oranında elektron bağlama

solüsyonu eklenerek ölçüm solüsyonu hazırlanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 23 paket program kullanılarak Mann-Withney U testi ile yapılmıştır.

3.5. Komet Testi

Komet bir genotoksisite testidir. Genotoksisite, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anomalileri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir.

Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitelerinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Komet, DNA parçalarının elektrik akımı doğrultusunda hücreden çıkarak ilerlemesi (kuyruk oluşturmaları) ilkesine dayanır. Komet testine Kansere duyarlılığın belirlenmesinde ve kanserden korunmanın takibinde biyoizlem testi olarak başvurulmaktadır.

Komet Testi Protokolü

Hücreler 25 cm²'lik flasklara bölünmüş ve çoğalması için inkübatörde bekletilmiştir. Çoğalan hücreler *Xanthoria parietina* ekstratının IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 dozlarında 24 saat muamele edilmiştir. Dozlanan hücreler 24 saat sonra tripsinlenerek kaldırılmıştır ve santrifüj edilmiştir.

- 1) Bu aşamada kullanılan bütün solüsyonlar soğuktur. Bu prosedür karanlıkta gerçekleştirilmelidir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra kalan hücreler 1 ml PBS ile seyreltilmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- 2) Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktalı agaroz (LMA) kullanılmıştır. 0,065 gr LMA tartılmış ve 10 ml PBS içinde ısıtılarak jel haline getirilmiştir.
- 3) Eppendorf tüplere 250'şer µL LMA aktarılmıştır. Bu eppendorf tüpler 37 °C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir.
- 4) Hücre pelletlerinden 100 µl çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Jel ve hücre süspansiyonu pipetaj yoluyla karıştırılmıştır.
- 5) Bu karışımdan 80 µl çekilmiş ve lam üzerine yayılmıştır. Her çalışma grubu kendi lamının üzerine yayılmıştır.

- 6) Üzerine karışım koyulan lamalar hemen lamelle kapatılmış ve buz üzerine kaldırılmıştır.
- 7) Yayma işlemi bittikten sonra lamalar 15 dakika +4 °C de bekletilmiştir.
- 8) 2 dakika sonra lamalar üzerindeki lameller çıkarılmıştır.
- 9) Lamelleri çıkmış olan lamalar şalelere dizilmiş ve şaleler lizis solüsyonu ile doldurulmuştur. Lamalar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4 °C de bekletilmiştir.
- 10) Ertesi gün lamalar lizis solüsyonundan çıkarılmış ve elektroforez tankına dizilmiştir.
- 11) Tanklar elektroforez tamponu ile doldurulmuş ve 30 dk elektroforez tamponu içinde akım verilmeden bekletilmiştir.
- 12) Yürütme işlemi 500 mA, 25V'da, yarım saatte gerçekleştirilmiştir.
- 13) Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanktan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna daldırılmıştır ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde karanlıkta bekletilmiştir.
- 14) Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp soğuk distile suya daldırılıp yıkanmış ve kuruması beklenmiştir.
- 15) Kuruduktan sonra lamalar absöü etanol içinde 5 dakika fikse edilmiştir.

Boyama İşlemi

20 µg/ml konsantrasyonlu EtBr boya solüsyonundan enjektör ile 0,2 ml çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

Lamların mikroskopta incelenmesi

Sayım ve değerlendirme aşamalarında floresan mikroskop kullanılmıştır. Boyanılan lamlara mikroskopta bakılmış ve her lamdan 100 tane hücre sayılmıştır. Değerlendirme kameram 21 komet sayım programı ile yapılmıştır. DNA hasarı; kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Olive kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiştir. Test iki bağımsız tekrar halinde yapılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 23 paket program kullanılarak One-Way Anova ve Tamhane testi ile gerçekleştirilmiştir.

3.6. ROS Ölçümü

Xhantoria parietina ekstratının hücre içi ROS oluşumuna etkisi DCF-DA (2',7'dichlorofluorescein diacetate) maddesinin RPMI mediumda çözülmesi ile değerlendirilmiştir. DCF-DA boyası kendisi floresan özellik göstermemektedir. Hücre içine difüzyonla girmektedir. Hücresel esterazlar tarafından DCFH şekline hidrolize olmaktadır. DCFH ise ROS varlığında hızlı şekilde oksidize olmakta ve yüksek seviyede floresan etkisi olan 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCF) haline gelmektedir.

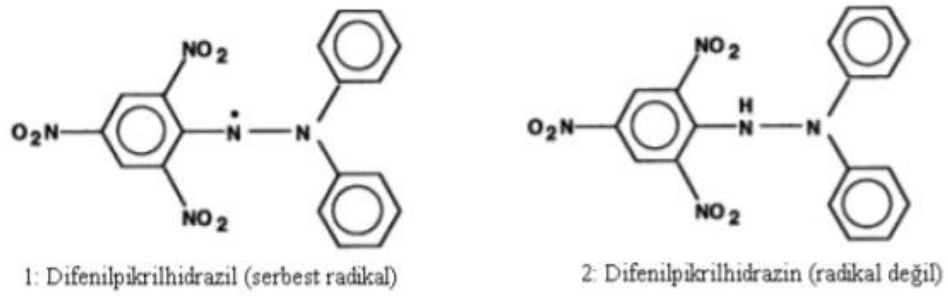
ROS Testi Protokolü

ROS testi için hücreler 75 cm²'lik flasklarda üretilmiştir. Büyüyen hücreler 96 kuyucuklu siyah platelere iki tekrarlı şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Kültür sonunda besi yeri değiştirildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelere 1X DCFH-DA/besiyeri çözeltisinden 100'er µl eklenmiş ve 37 °C'de 120 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücrelere 2 saat *Xanthoria parietina* ekstratının IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 dozları ile muamele edilmiştir. H₂O₂'nin IC50 konsantrasyonu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Konsantrasyonu 0 µM – 10 µM arasında değişen DCF standartlarının 1:10 seyreltme serisi DCF stok solüsyonunun besi yeri ile seyreltilmesi ile hazırlanır (tüp dilüsyon yöntemi). DCF stoğundan 10 µl alınıp 990 µl RPMI medium bulunan 1 numaralı standarta eklenir ve sonra standart 1'den diğer standartlara zincirleme şekilde 100'er µl alınıp seyreltme işlemi yapılır. Absorbansı 480 nm/530 nm'de florometrik plaka okuyucuda platerler 24 saat belirli aralıklarla okunmuştur. ROS değerleri çizilen dağılım grafiğinin eğim formülü ile hesaplanmıştır. Deney iki tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 23 paket program kullanılarak Mann-Withney U testi ile yapılmıştır.

3.7. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi

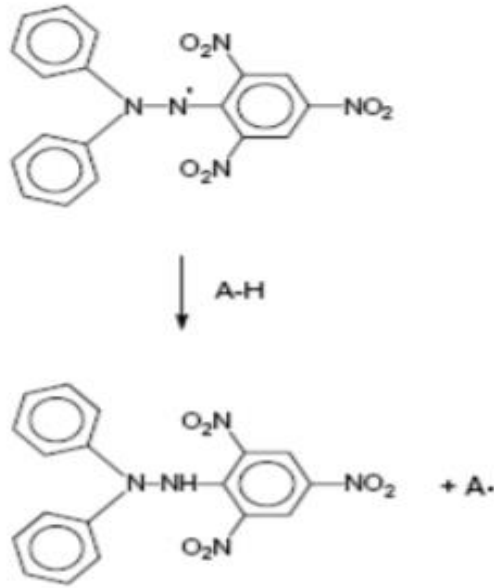
Bu yöntem bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstreler ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Teknik olarak hızlı ve basittir.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbanza sahiptir (Şekil 3.4) (Huang, D. ve ark. 2005).



Şekil 3.4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı. (Molyneux 2004).

Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbanın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorban sabitlenene kadar takip edilir (Şekil 3.4.) (MacDonald-Wicks ve ark. 2006).



Şekil 3.5. DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu (Scalzo, R.L. 2008).

DPPH-H indirgenmiş formudur. A. ise ilk adımda oluşturulan serbest radikaldır. Daha sonra bu radikal başka reaksiyonlara girecektir (Molyneux 2004).

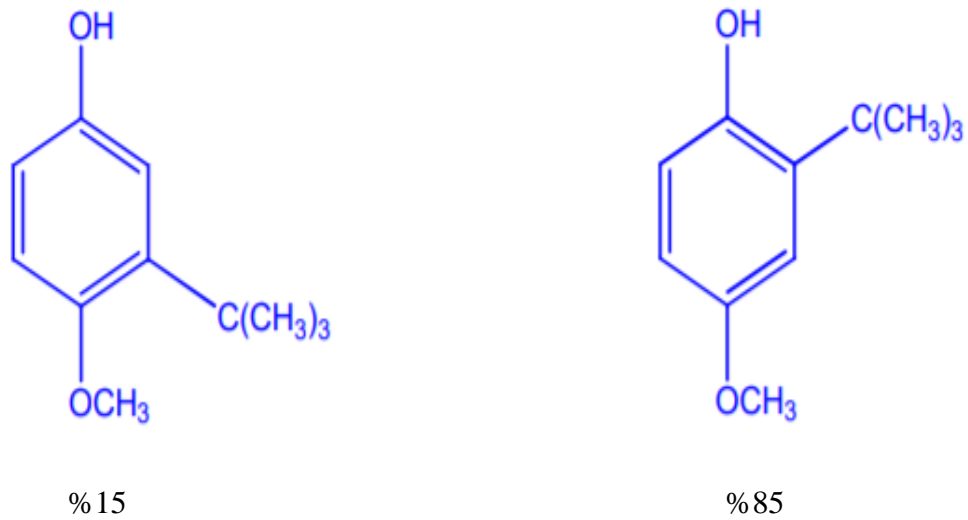
*Deneyin Yapılışı

0,1 mmol DPPH hazırlayarak deneyde *Xhantoria parietine* ekstraktının 12, 24, 48, 96, 192, 384 µg/ml konsantrasyonlarını kullandık. 2ml protein çözeltisi+ 2ml DPPH çözeltisini oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk. beklettik. Bu çözeltileri karıştırarak 517 nanometre de absorbanslarını ölçtük. Absorbans değerlerinden aşağıdaki formül kullanılarak % radikal süpürücü etki (%inhibisyon) hesaplandı. Bu değerlerden elde edilen eğrinin denkleminde DPPH radikalinin %50 sini süpüren *Xhantoria parietine* ekstrakt konsantrasyonu hesaplandı (IC50Süpürücü).

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Absorbans kontrol} - \text{Absorbans örnek} / \text{Absorbans kontrol}) \times 100$$

Pozitif kontrol olarak BHA(Butillenmiş hidroksi anisol) ve kateşin kullanıldı.

BHA: Bu antioksidan, ticari olarak 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halindedir. Beyaz mumsu katı bir yapıya sahip olup, bitkisel ve hayvansal yağlarda kullanılmaktadır. Bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi, hayvansal yağlardaki etkisine göre daha azdır.



Şekil 3.6. BHA (Bütillendirilmiş hidroksi anisol) molekül yapısı (Ekici ve ark. 2014).

3.8. UV değerlerinin belirlenmesi

Uv değerleri TirOS Ramses (Trositrof, Germany) marka ışık ölçer cihazı ile $W/m^2/s$ cinsinden belirlenmiştir.

UV değerlerinden 3cm 40 dk lık uygulamamız en yüksek genotoksik hasar oluşturan deney grubu olduğu için deneylerde UV uygulama grubu olarak bu grup seçilmiştir. 3cm 40 dakikalık uygulamanın ışık ölçer cihazı ile belirlenen ışık şiddeti değerleri aşağıda belirtilmiştir.

UVB; 17,04 $W/m^2/s$ UVA; 2,33 $W/m^2/s$ PAR; 3,66 $W/m^2/s$

3.9. Çalışma Planı

Xhantoria parietina ekstratıyla muamele edilen fare deri fibroblast hücrelerinde XTT, Komet ve ROS testleri gerçekleştirilmiştir.

3.9.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı ve Pasajlanması

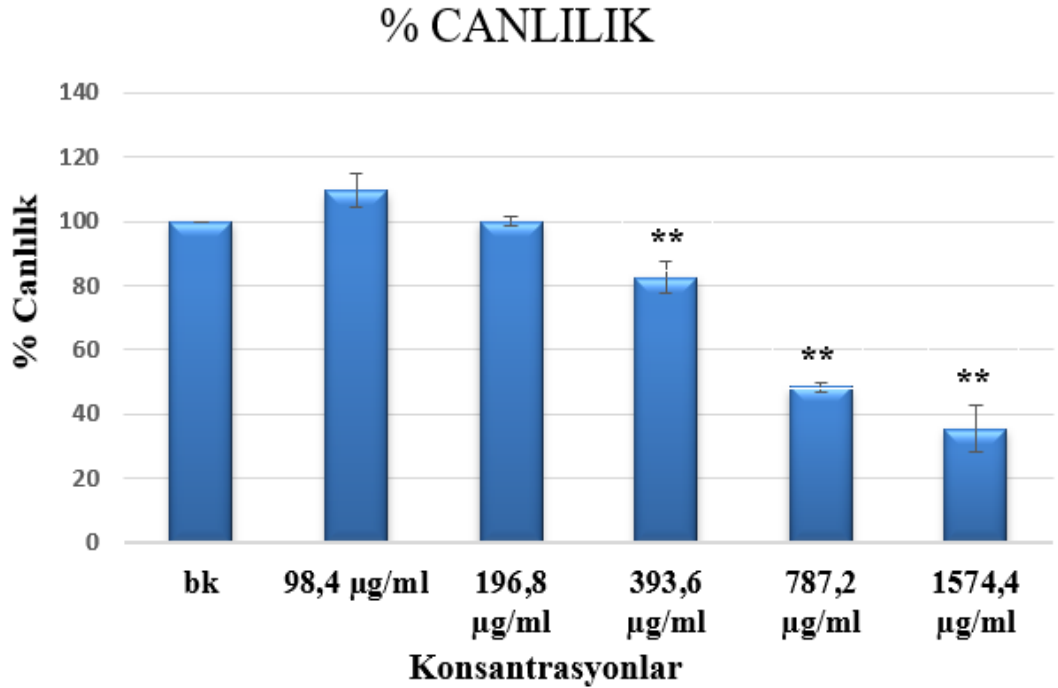
Çalışmada 1929 fare sağlıklı deri fibroblast hücreleri kullanılmıştır.

1. T-75 flaskta bulunan kültürün besiyeri aspirasyon yöntemi ile uzaklaştırılmıştır.
2. Flaskın tabanı 5-6 ml PBS ile yıkanmış ve PBS aspire edilmiştir.
3. 4-5 ml tripsin (%0,25'lik) ile 2 dk 'yı geçmeyecek şekilde beklenmiştir.
4. İvert mikroskopta hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir.
5. Hücrelerin tabandan ayrılması ile flaska eklenen tripsin miktarı kadar besiyeri eklenip tripsin aktivitesi durdurulmuştur.
6. Hücre süspansiyonu serolojik pipetle uygun bir falkon tüpüne toplanarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Hücrelerin üzerindeki süpernatant aspire edilmiş kalan kısım süspansiyon edilmiştir.
8. Toplam hücre sayısı, hücre sayım cihazı ile belirlenip belli miktardaki kısmı içinde 10ml besiyeri bulunan bir T-75'lik flaska aktarılmıştır.
9. Hazırlanan flask CO2 inkübatörüne kaldırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. XTT Test Bulguları

Çalışmada kullanılan *Xantoria parietina* ekstratının IC50 doz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla fare deri fibroblast hücrelerine XTT testi uygulanmıştır. XTT test sonuçlarına göre; *Xantoria parietina* ekstratı IC50 değeri 768,01 μ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. *Xanthoria parietina* ekstratı XTT test sonucu belirlenen % canlılık grafiği (IC50= 768.01 μ M) ve standart hata miktarı ******($p \leq 0,001$).

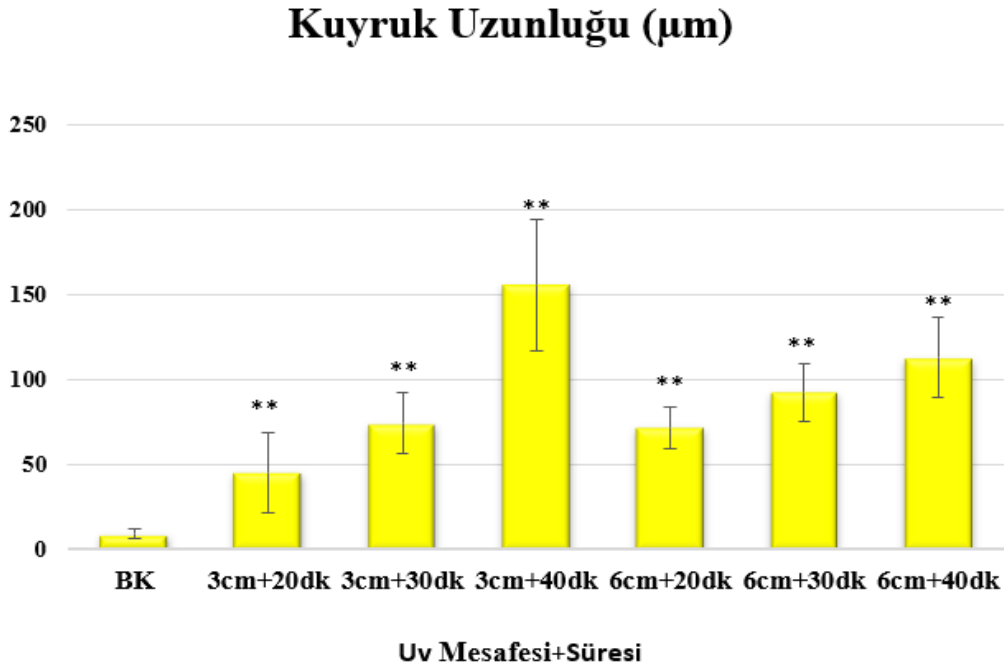
Şekil 4.1'de *Xanthoria parietina* ekstratının L929 fare deri fibroblast hücreleri üzerindeki XTT testi ile belirlenen canlılık oranları gösterilmektedir. Verilen % canlılık grafiğine göre 98,4 μ M doz canlılığı % 118'e, 196,8 μ M doz canlılığı % 101'e, 393,6 μ M doz canlılığı % 87'ye, 787,2 μ M doz canlılığı % 50'ye, 1574,4 μ M doz canlılığı % 30'a kadar düşürmüştür. Testte %50 inhibisyona neden olan IC50 dozu 768.01 μ M bulunmuştur.

4.2. Komet Testi Bulguları

L929 hücre hattında uygulanan komet testi bulguları içinden Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti (OKM) verileri değerlendirmeye alınmıştır.

4.2.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları

Belirtilen parametreler içerisinde UV'ye ait kuyruk uzunluğu değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.2'de, ekstrata ait kuyruk uzunluğu değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.5'de ve hem UV hem de ekstratla kombin dozlara ait kuyruk uzunluğu değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.6'da gösterilmiştir. Kuyruk Uzunluğu bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.

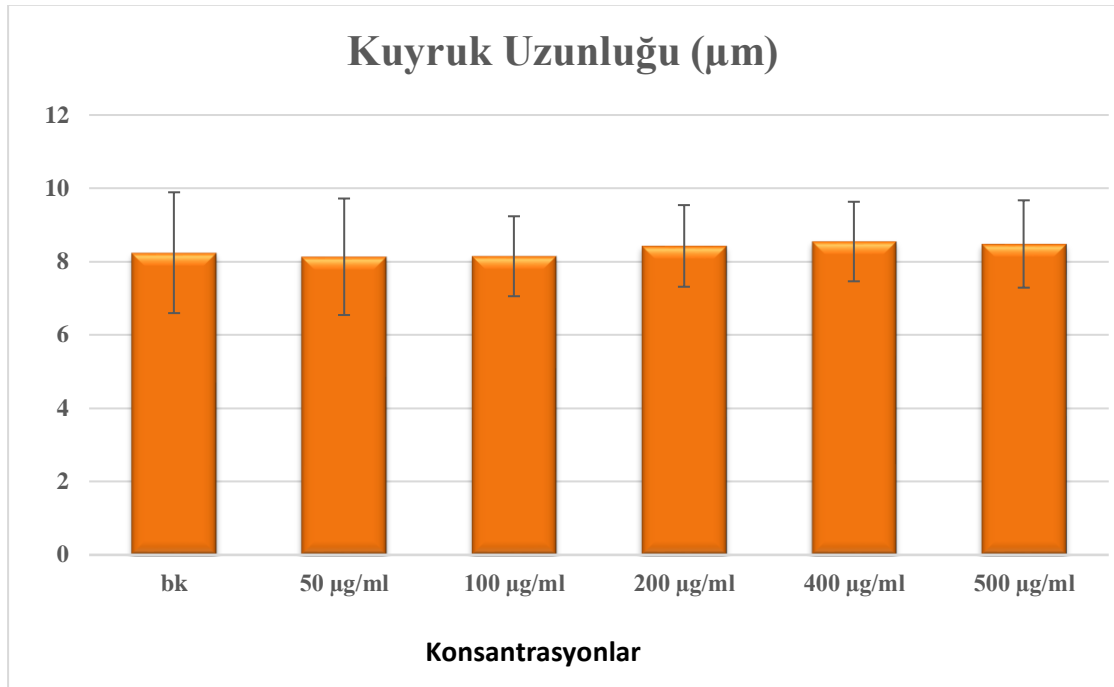


Şekil 4.2. UV'yle muamele edilen komet testi kuyruk uzunluğu (μm) değerleri. (Büyüme kontrole göre fark, *($P \leq 0,05$), **($P < 0,001$)).

Uv büyüme kontrolü grubunda Kuyruk Uzunluğu değeri $9,251786 \pm 2,567455$ olarak belirlenmiştir. UV 3cm+20dk, 3cm+30dk, 3cm+40dk, 6cm+20dk, 6cm+30dk, 6cm+40dk dozlarında ise sırasıyla $45,56435 \pm 23,62328$; $74,35717 \pm 18,21746$; $155,825 \pm 38,67087$; $71,92037 \pm 12,15319$; $92,61019 \pm 17,16799$; $113,0118 \pm 23,37844$ olarak belirlenmiştir.

UV 3cm+20dk dozunda $45,56435 \pm 23,62328$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı

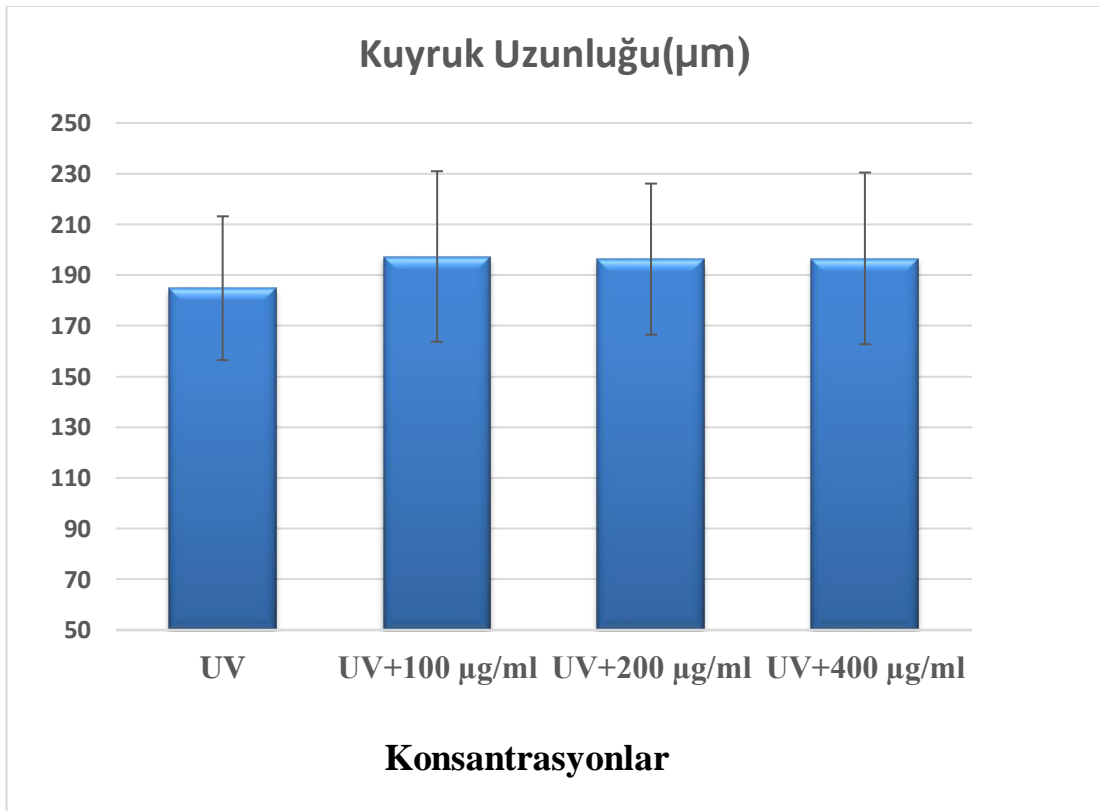
olarak bulunmuştur ($p<0,001$). UV 3cm+30dk dozunda $74,35717 \pm 18,21746$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). UV 3cm+40dk dozunda $155,825 \pm 38,67087$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,001$). UV 6cm+20dk dozunda $71,92037 \pm 12,15319$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,001$). UV 6cm+30dk dozunda $92,61019 \pm 17,16799$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,001$). UV 6cm+40dk dozunda $113,0118 \pm 23,37844$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 4.3. *Xanthoria Parietina* ekstratıyla muamele edilen komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.

Xhantoria parietina ekstratı büyüme kontrol grubunda Kuyruk Uzunluğu değeri $8,24382 \pm 1,647832$ olarak belirlenmiştir. *Xhantoria parietina* eksratı 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml dozlarında ise sırasıyla $8,13261 \pm 1,5896$; $8,146675 \pm 1,090396$; $8,42836 \pm 1,113766$; $8,54829 \pm 1,085186$; $8,48109 \pm 1,191166$ olarak belirlenmiştir.

Xhantoria parietina ekstratı 50 µg/ml dozunda $8,13261 \pm 1,5896$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). *Xhantoria parietina* ekstratı 100 µg/ml dozunda $8,146675 \pm 1,090396$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır. ($P>0,05$). *Xhantoria parietina* ekstratı 200 µg/ml dozunda $8,42836 \pm 1,113766$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır. *Xhantoria parietina* ekstratı 400 µg/ml dozunda $8,54829 \pm 1,085186$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır ($P<0,05$). *Xhantoria parietina* ekstratı 500 µg/ml dozunda $8,48109 \pm 1,191166$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.4. UV ve *Xanthoria parietina* ekstratıyla kombine muamele edilen komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.

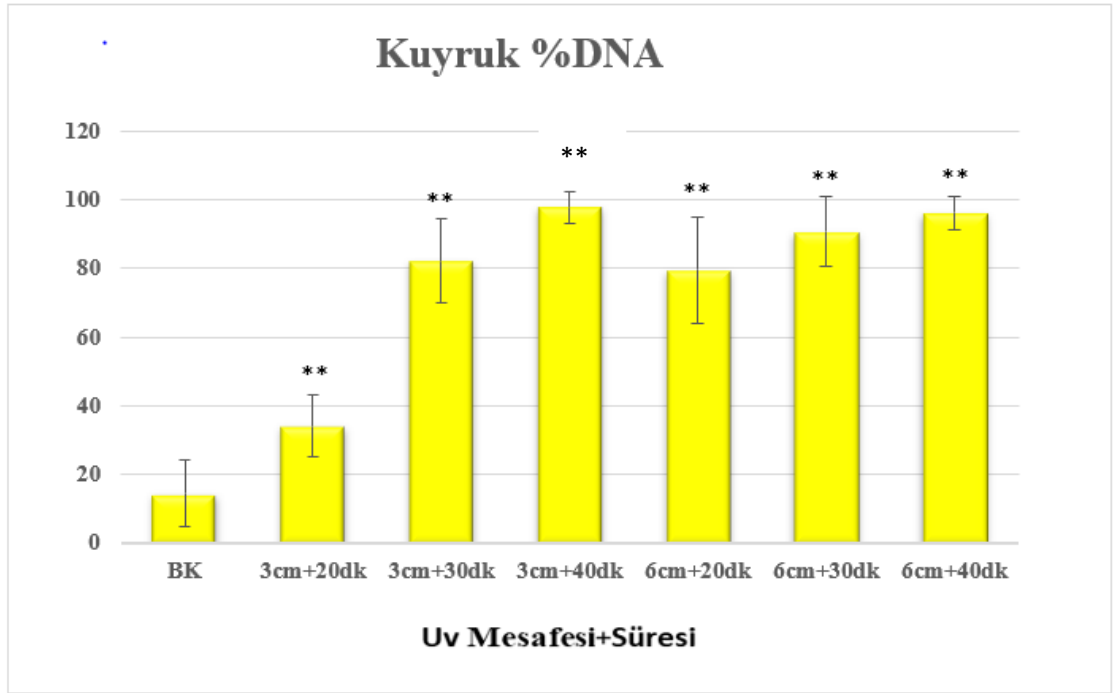
Xhantoria parietina ekstratı büyüme kontrol grubunda Kuyruk Uzunluğu değeri $15,15839 \pm 3,896467$ olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel olarak karşılaştırmak için UV Kuyruk Uzunluğu değeri $155,825 \pm 38,67087$ olarak belirlenmiştir. Belirlenen UV dozu önceki şekilde gösterilen (Şekil: 4.2) $3\text{cm}+40\text{dk}$ UV dozudur. Bu mesafe ve dakikanın seçilme sebebi hücre DNA'sında en çok hasarı meydana getiren doz olmasıdır. *Xhantoria parietina* ekstratı $100 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$, $200 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$, $400 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$, dozlarında ise sırasıyla $197,319 \pm 33,6144$; $196,2718 \pm 29,7929$; $196,545 \pm 33,8742$ olarak belirlenmiştir.

Xhantoria parietina ekstratı $100 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$ dozunda $197,319 \pm 33,6144$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri, seçilen UV dozu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır. *Xhantoria parietina* ekstratı $200 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$ dozunda $196,2718 \pm 29,7929$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri seçilen UV dozu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır. *Xhantoria parietina* ekstratı $400 \mu\text{g/ml}+\text{UV}$ dozunda $196,545 \pm 33,8742$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri seçilen UV dozu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.

4.2.2 Kuyruk %DNA Bulguları

Belirtilen parametreler içerisinde UV'ye ait kuyruk %DNA değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.7'de, ekstrata ait kuyruk %DNA değerinden elde edilen grafik şekil 4.8'de ve hem UV hem de ekstratla kombin dozlara ait kuyruk %DNA değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.9'da gösterilmiştir. Kuyruk %DNA değerleri bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.

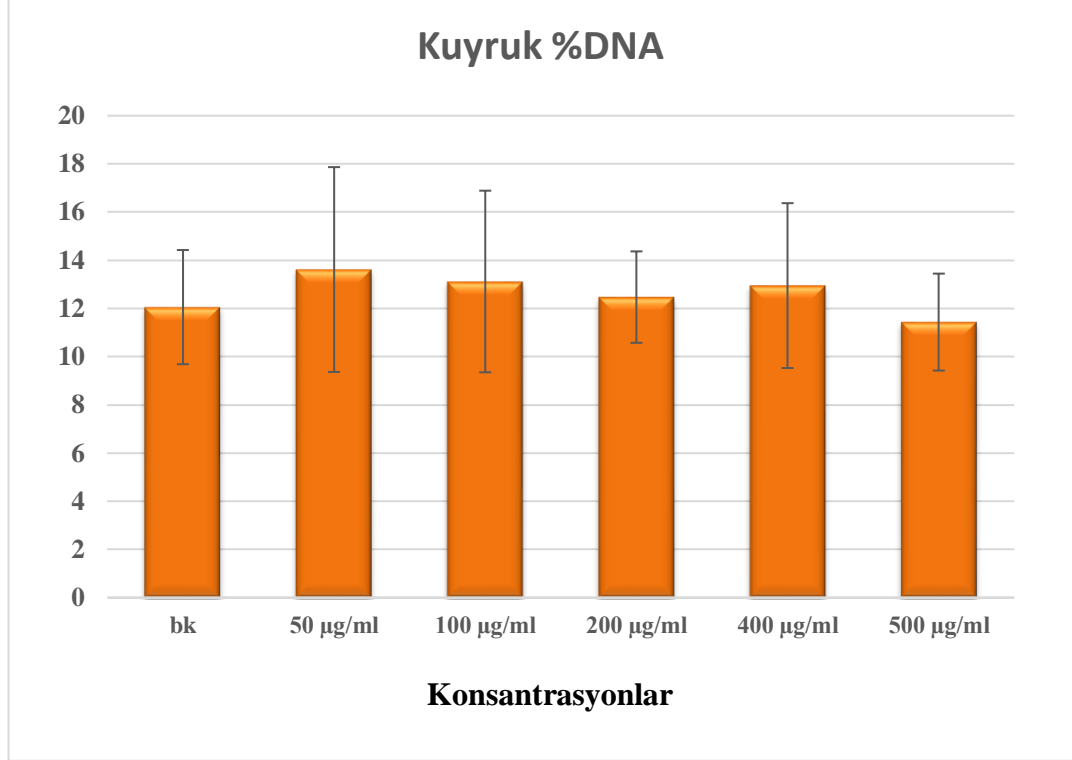


Şekil 4.5. UV'yle muamele edilen komet testi kuyruk %DNA değerleri. (Büyüme kontrole göre fark **P≤0,001)

Uv büyüme kontrolü grubunda Kuyruk %DNA değeri 14,45033 ± 9,77965 olarak belirlenmiştir. UV 3cm+20dk, 3cm+30dk, 3cm+40dk, 6cm+20dk, 6cm+30dk, 6cm+40dk dozlarında ise sırasıyla 34,02058 ± 9,017047; 82,27343 ± 12,46286; 97,87785 ± 4,681175; 79,55061 ± 15,30275; 90,79082 ± 10,21094; 96,31242 ± 4,872966 olarak belirlenmiştir.

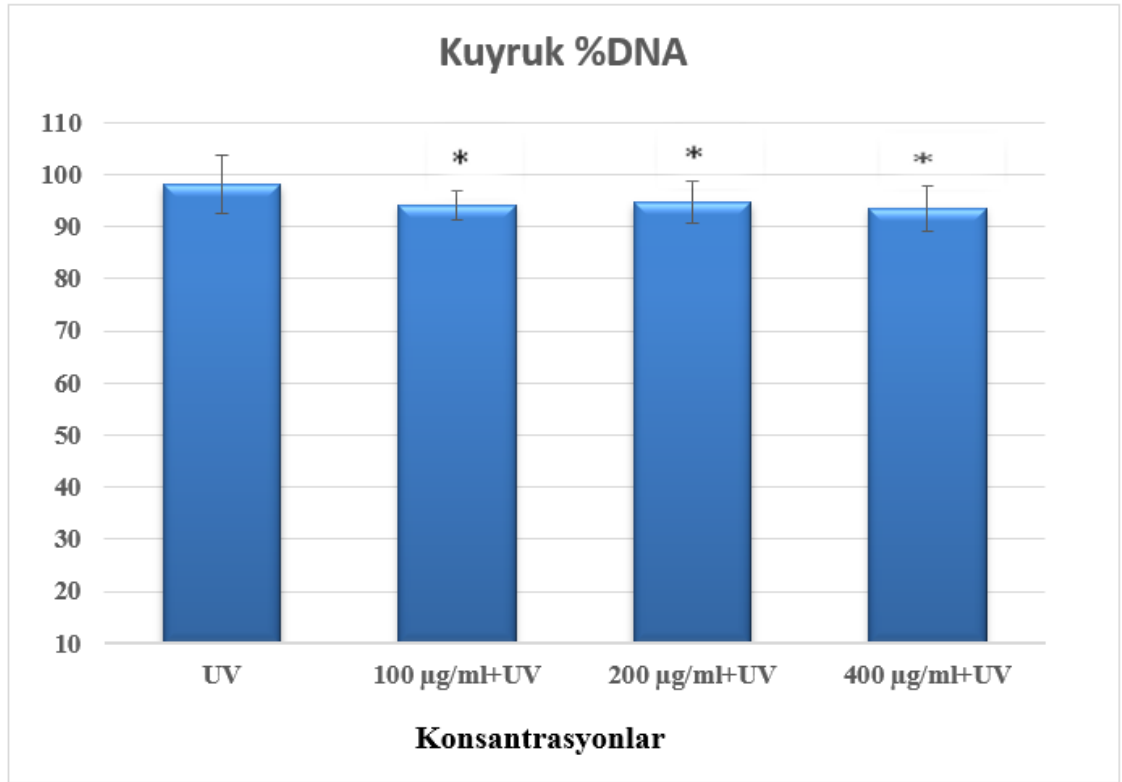
UV 3cm+20dk dozunda 34,02058 ± 9,017047 olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur (P≤0,001). UV 3cm+30dk dozunda 82,27343 ± 12,46286 olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur (P≤0,001). UV 3cm+40dk dozunda 97,87785 ± 4,681175 olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur (P≤0,001). UV 6cm+20dk dozunda 79,55061 ± 15,30275 olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur (P≤0,001). UV 6cm+30dk dozunda 90,79082 ± 10,21094 olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). UV 6cm+40dk dozunda $96,31242 \pm 4,872966$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).



Şekil 4.6. *Xanthoria parietina* ekstratıyla muamele edilen komet testi kuyruk %DNA değerleri.

Xhantoria parietina ekstratı büyüme kontrol grubunda Kuyruk %DNA değeri $12,05571 \pm 2,3690$ olarak belirlenmiştir. *Xhantoria parietina* ekstratı 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml dozlarında ise sırasıyla $13,61607 \pm 4,2497$; $13,12007 \pm 3,7686$; $12,47231 \pm 1,8966$; $12,9496 \pm 3,4206$; $11,43516 \pm 2,0114$ olarak belirlenmiştir. *Xhantoria parietina* ekstratı 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml dozlarında belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.



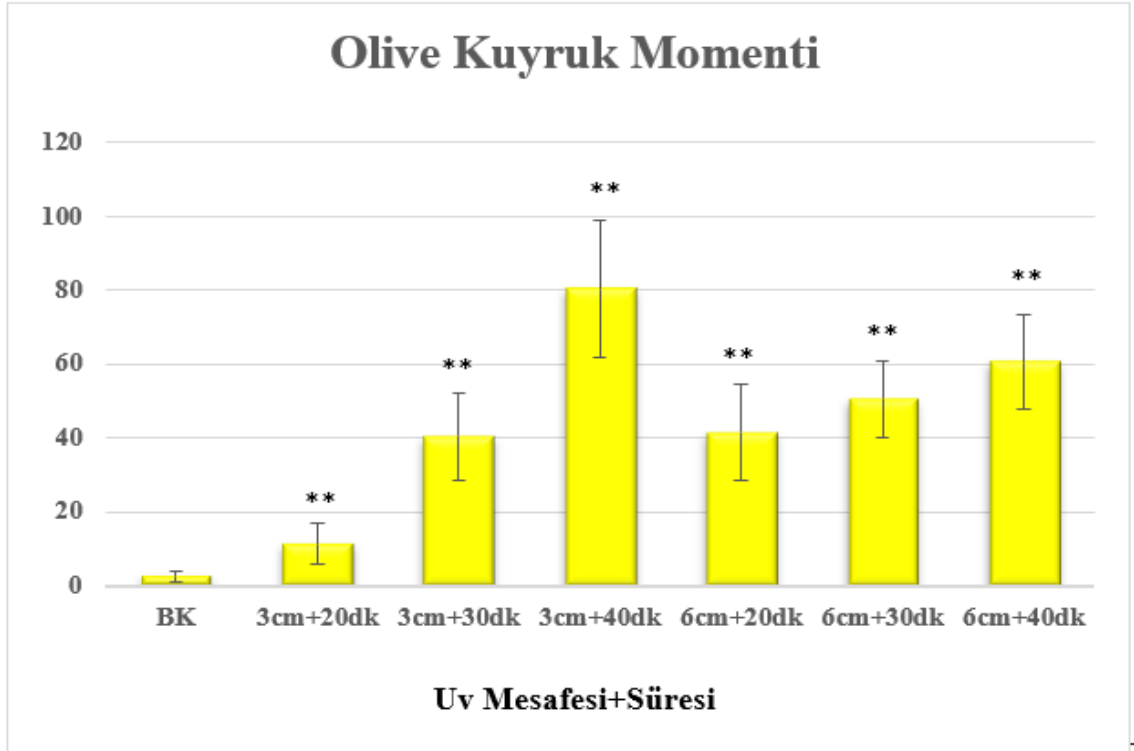
Şekil 4.7. UV ve *Xanthoria Parietina* ekstratıyla birlikte muamele edilen komet testi kuyruk %DNA değerleri. (UV'ye göre fark * $P \leq 0,001$)

İstatistiksel olarak karşılaştırmak için UV Kuyruk %DNA değeri $98,1042 \pm 5,6654$ olarak belirlenmiştir. *Xanthoria parietina* ekstratı 100 µg/ml+UV, 200 µg/ml+UV, 400 µg/ml+UV dozlarında ise sırasıyla $94,2518 \pm 2,7865$; $94,6948 \pm 3,9406$; $93,6244 \pm 4,3495$ olarak belirlenmiştir.

Xanthoria parietina ekstratı 100 µg/ml+UV dozunda $94,2518 \pm 2,7865$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri UV ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). *Xanthoria parietina* ekstratı 200 µg/ml+UV dozunda $94,6948 \pm 3,9406$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri UV ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). *Xanthoria parietina* ekstratı 400 µg/ml+UV dozunda $93,6244 \pm 4,3495$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk %DNA değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).

4.2.3. OKM Bulguları

Komet testinde belirlenen parametreler doğrultusunda UV'ye ait OKM değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.8'de, ekstrata ait OKM değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.9'da, hem uv hem de ekstrat kombin dozlarına ait OKM değerinden elde edilen grafik şekil 4.10'da gösterilmiştir. Olive kuyruk momenti bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.

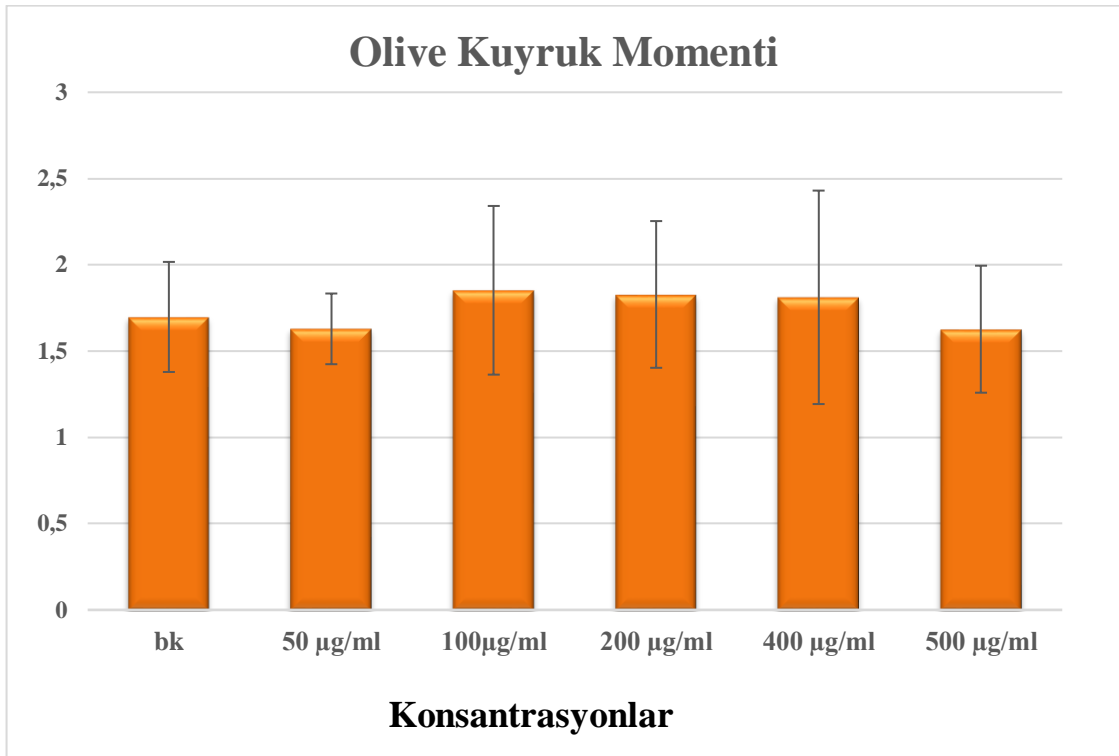


Şekil 4.8. UV yle muamele edilen komet testi OKM değerleri (Büyüme kontrole göre fark $**P\leq 0,001$).

Uv büyüme kontrolü grubunda OKM değeri $2,578918 \pm 9,77965$ olarak belirlenmiştir. UV 3cm+20dk, 3cm+30dk, 3cm+40dk, 6cm+20dk, 6cm+30dk, 6cm+40dk dozlarında ise sırasıyla $34,02058 \pm 9,017047$; $82,27343 \pm 12,46286$; $97,87785 \pm 4,681175$; $79,55061 \pm 15,30275$; $90,79082 \pm 10,21094$; $96,31242 \pm 4,872966$ olarak belirlenmiştir.

UV 3cm+20dk dozunda $34,02058 \pm 9,017047$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri büyüme kontrolü ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P\leq 0,001$). UV 3cm+30dk dozunda $82,27343 \pm 12,46286$ olarak belirlenen ortalama

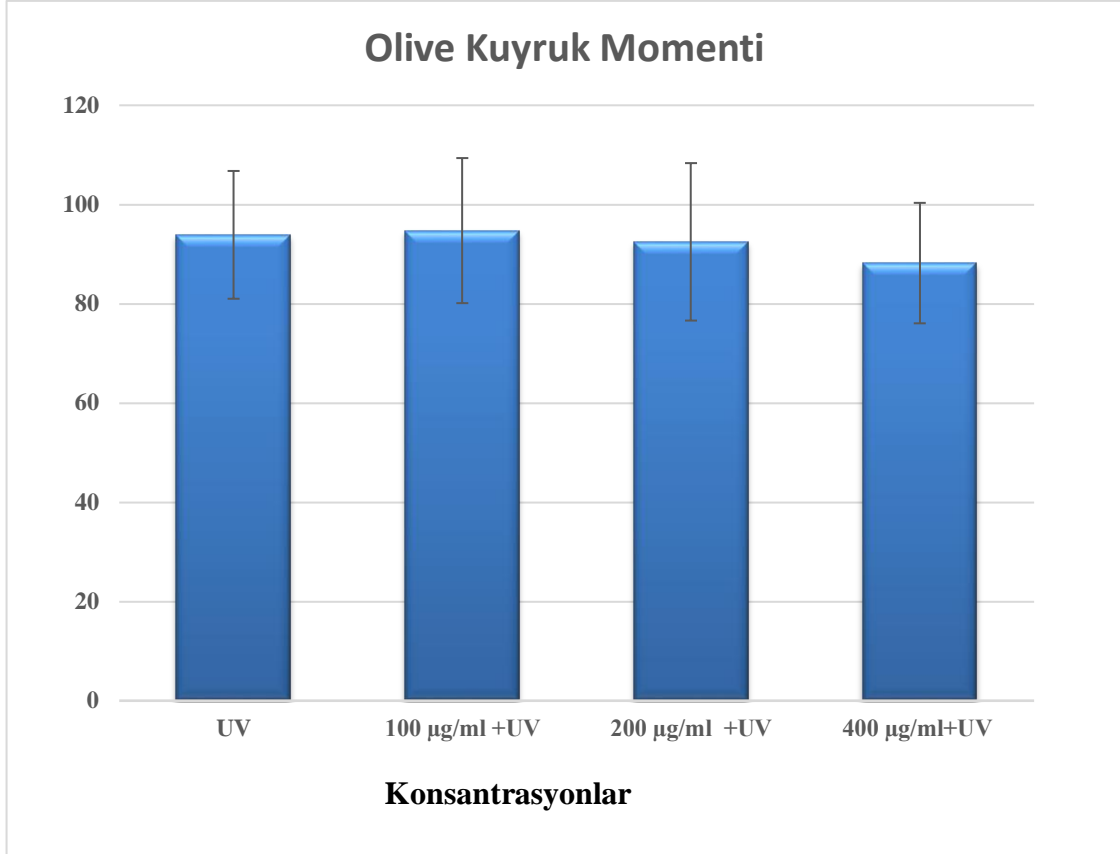
OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). UV 3cm+40dk dozunda $97,87785 \pm 4,681175$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,01$). UV 6cm+20dk dozunda $79,55061 \pm 15,30275$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). UV 6cm+30dk dozunda $90,79082 \pm 10,21094$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$). UV 6cm+40dk dozunda $96,31242 \pm 4,872966$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).



Şekil 4.9. Ekstratla muamele edilen komet testi OKM değerleri (Büyüme kontrole göre fark $**P \leq 0,001$).

Xhantoria parietina ekstratı büyüme kontrol grubunda OKM değeri $1,6980 \pm 0,3189$ olarak belirlenmiştir. *Xhantoria parietina* ekstratı 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml dozlarında ise sırasıyla $1,6289 \pm 0,2048$; $1,8523 \pm 0,4888$; $1,8283 \pm 0,4251$; $1,8116 \pm 0,6186$; $1,6269 \pm 0,3680$ olarak belirlenmiştir.

Xhantoria parietina ekstratı 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml dozları ortalama OKM değeri büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.10. Ekstrat ve UV ile Muamele edilen komet testi OKM değerleri.

Xhantoria parietina ekstratı UV OKM değeri $93,8906 \pm 12,8779$ olarak belirlenmiştir. *Xhantoria parietina* ekstratı 100 µg/ml+UV, 200 µg/ml+UV, 400 µg/ml+UV, dozlarında ise sırasıyla $94,7491 \pm 14,6186$; $92,4841 \pm 15,8683$; $88,1980 \pm 12,1411$ olarak belirlenmiştir.

Xhantoria parietina ekstratı 100 µg/ml+UV, 200 µg/ml+UV, 400 µg/ml+UV dozları ortalama OKM değeri UV ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.1. UV için komet testi ortalama değerleri. K.U.: kuyruk uzunluğu, K.%DNA: Kuyruk %DNA, OKM: Olive kuyruk momenti, S.H.: Standart hata.

	K.U ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	9,251786 ± 2,567455	14,45033 ± 9,77965	2,578918 ± 9,77965
3cm+20dk	45,56435 ± 23,62328	34,02058 ± 9,017047	34,02058 ± 9,017047
3cm+30dk	74,35717 ± 18,21746	82,27343 ± 12,46286	82,27343 ± 12,46286
3cm+40dk	155,825 ± 38,67087	97,87785 ± 4,681175	97,87785 ± 4,681175
6cm+20dk	71,92037 ± 12,15319	79,55061 ± 15,30275	79,55061 ± 15,30275
6cm+30dk	92,61019 ± 17,16799	90,79082 ± 10,21094	90,79082 ± 10,21094
6cm+40dk	113,0118 ± 23,37844	96,31242 ± 4,872966	96,31242 ± 4,872966

Çizelge 4.2. *Xhantoria parietina* ekstratı için komet testi ortalama değerleri.

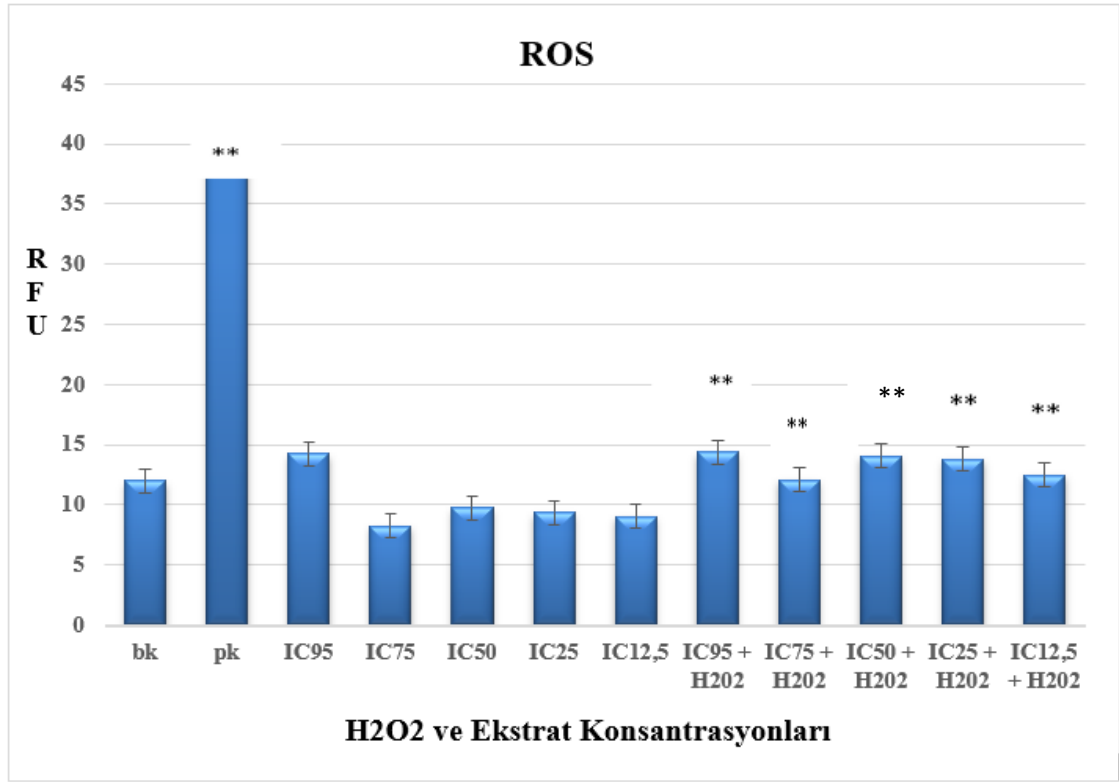
	K.U ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	8,243482 ± 1,647832	12,05571 ± 2,3690	1,6980 ± 0,3189
50 µg/ml	8,13261 ± 1,5896	13,61607 ± 4,2497	1,6289 ± 0,2048
100 µg/ml	8,146675 ± 1,090396	13,12007 ± 3,7686	1,8523 ± 0,4888
200 µg/ml	8,42836 ± 1,113766	12,47231 ± 1,8966	1,8283 ± 0,4251
400 µg/ml	8,54829 ± 1,085186	12,9496 ± 3,4206	1,8116 ± 0,6186
500 µg/ml	8,48109 ± 1,191166	11,43516 ± 2,0114	1,6269 ± 0,3680

Çizelge 4.3. *Xhantoria parietina* ekstratı ve UV kombin dozları için komet testi ortalama değerleri.

	K.U ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	15,15839 ± 3,8964	25,0859 ± 10,9746	5,2661 ± 2,2380
100µg/ml+UV	197,319± 33,6144	94,2518 ± 2,7865	94,7491 ± 14,6186
200µg/ml+UV	196,2718± 29,7929	94,6948 ± 3,9406	92,4841 ± 15,8683
400µg/ml+UV	196,545± 33,8742	93,6244 ± 4,3495	88,1980 ± 12,1411

4.2.4. ROS Testi Bulguları

L929 hücre hattı, (XTT sonuçlarından elde edilen, IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonlarında) UV ve *Xhantoria parietina* ekstratı ile muamele edilerek 4. saatte ki hücre içi ROS seviyeleri ölçülmüştür. Pozitif Kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır (RFU (Relative Floresans Unit)).



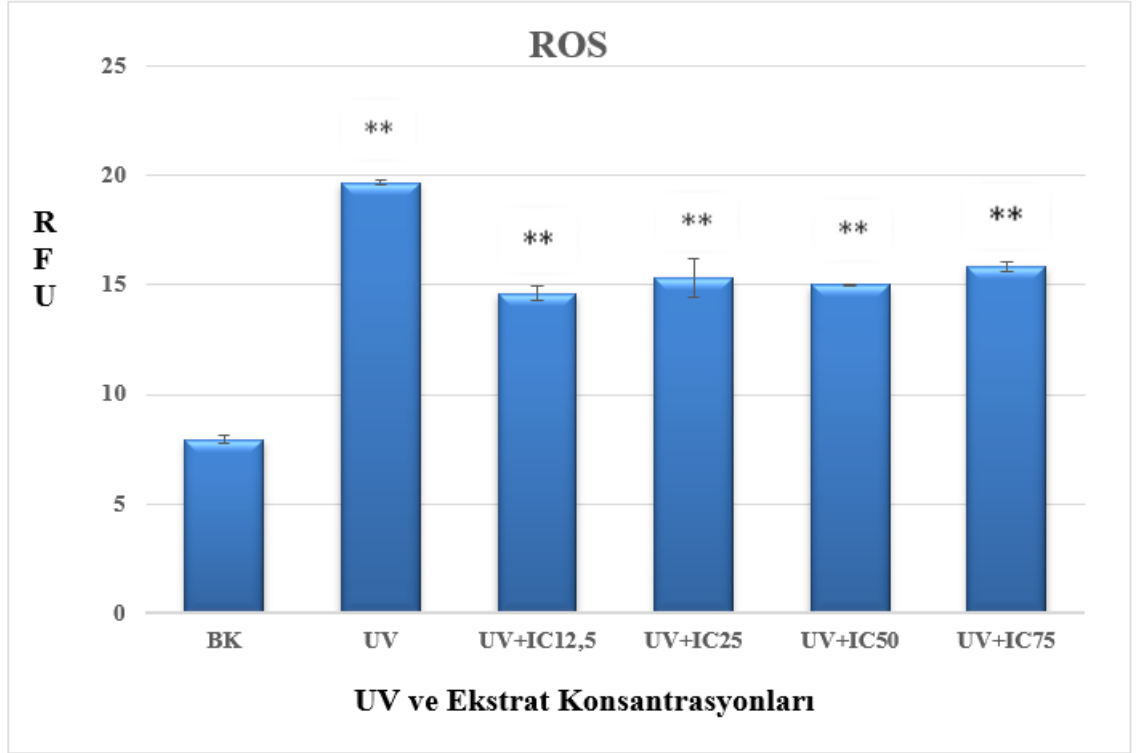
Şekil 4.11. 1929 hücre hattının H₂O₂ ve *Xhantoria parietina* ekstratı ile muamele edilerek 4. saatte ki hücre içi ROS seviyeleri ölçülmüştür ve büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır (**P≤0,001).

L929 hücre hattının, *Xhantoria parietina* ekstratı ile 4 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ortalama ROS değeri 12,031± 0,221678 şeklindedir. XTT IC değeriyle belirlenen IC12,5, IC25, IC50, IC75, IC95 konsantrasyonlarının L929 hücre hattına 4 saat muamele edilmesi sonucundaki ortalama ROS değerleri sırasıyla; 9,043 ± 0,044725, 9,378688 ± 0,075042, 9,737813 ± 1,462739, 8,26825 ± 0,116319, 14,25794± 1,737096 şeklindedir.

Bu konsantrasyonlar, H₂O₂ kombin dozlarıyla IC12.5+ H₂O₂, IC25+ H₂O₂, IC50+ H₂O₂, IC75+ H₂O₂, IC95+ H₂O₂ şeklinde 1929 hücre hattına muamele edilmiştir. Sonuçlar sırasıyla 12,44681±2,250809, 13,81981±0,303968, 14,06484±0,276954, 12,07575±0,072655, 14,35981±0,046227 olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol ise 38,29325 ± 5,056521 olarak saptanmıştır. L929 hücre hattına ait ROS testi bulguları Şekil 4.13.'da gösterilmiştir. L929 hücre hattında *Xhantoria parietina* ekstratı IC95(1359,21), IC75 (1152,01µg/ml), IC50(768,01µg/ml) ve IC25(384,00µg/ml) ve IC12,5 (192,00 µg/ml) konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

konsantrasyon artışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesi istatistiki olarak anlamlı bulunmazken; H₂O₂ kombinli dozlar için anlamlı bulunmuştur(p≤0,001). (Şekil 4.13.)

ROS bulgularında liken ekstratının PK(H₂O₂) ile uygulanan kombin dozlarının, H₂O₂ 'in sebep olduğu ROS artışını istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür.



Şekil 4.12. 1929 hücre hattının UV ve ekstrat ile muamele edilmesi sonucu 4.saatte ROS değerlerinin (RFU, nM) büyüme kontrol ile karşılaştırılması. (**P≤0,001, *P≤0,05)

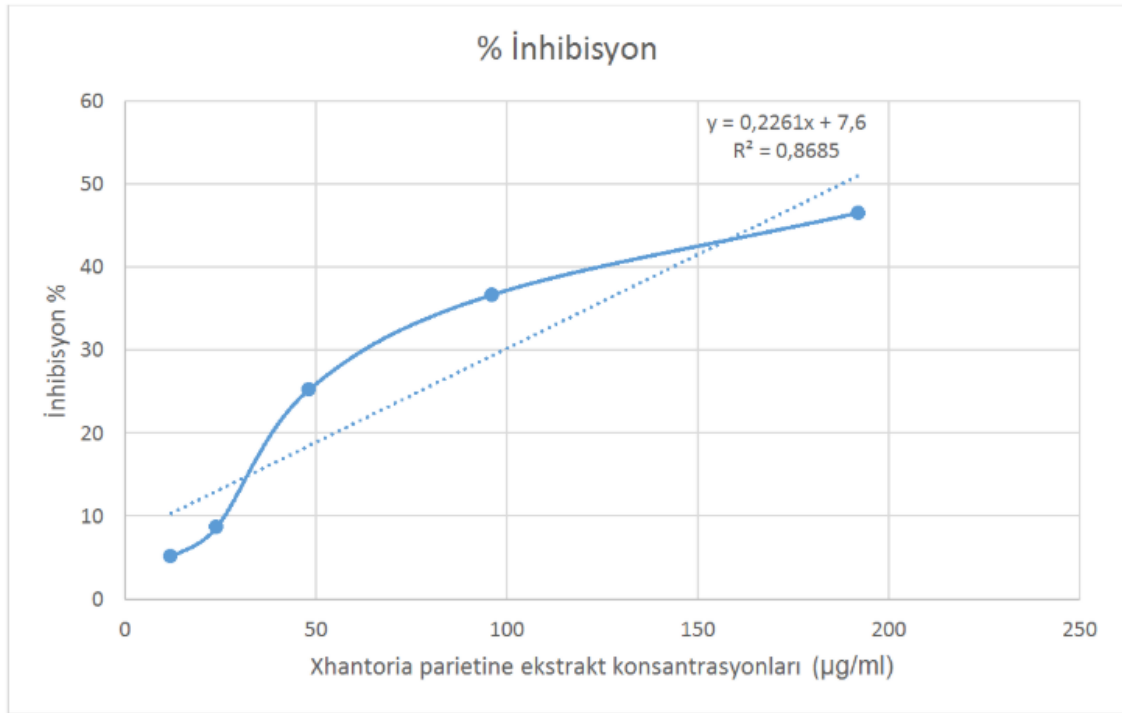
L929 hücre hattının, *Xhantoria parietina* ekstratı ile 4 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ortalama ROS değeri $7,942875 \pm 0,207006$ şeklindedir. IC12.5+UV, IC25+UV, IC50+UV, IC75+UV kombin dozları 1929 hücre hattına muamele edilmiştir. Sonuçlar sırasıyla $14,60625 \pm 0,325269$, $15,31625 \pm 0,892722$, $14,99 \pm 0,065407$, $15,831875 \pm 0,211248$, olarak bulunmuştur. UV Pozitif kontrol ise $19,66875 \pm 0,091924$ olarak saptanmıştır.

ROS bulgularında, liken ekstratının UV ile uygulanan kombin dozlarının, UV'nin sebep olduğu ROS artışını istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür.

4.4. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi Bulguları

DPPH Süpürücü Etki Sonuçları

Xhantoria parietine ekstraktının 12, 24, 48, 96, 192, 384 µg/ml konsantrasyonlarının DPPH radikalini süpürücü etkilerini (%süpürücü etki = % inhibisyon) içeren sonuçlar grafikte verilmiştir. Elde edilen grafiğin denklemi $y=0,2261x+7,6$ olarak belirlenmiştir. Bu denklemden DPPH radikalinin %50 sini süpüren *Xhantoria parietina* ekstrakt konsantrasyonu (IC50Süpürücü)187,527 µg/ml hesaplanmıştır. Bu sonuçlarımız hücre içi ROS testinden elde edilen sonuçlarımız ile uyumlu görülmekte ve *Xhantoria parietine* ekstraktının güçlü bir radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.13. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite yöntemi sonuç grafiği.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda *Xanthoria parietina* ekstratının 1929 fare sağlıklı deri fibroblast hücre hattında oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik etkiler XTT formazan canlılık testi ve komet testi yöntemleriyle, hücre içi ROS düzeyleri ise ROS testi ile araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda *Xanthoria parietina* ekstratının 1929 fare sağlıklı deri fibroblast hücrelerinin yarısını öldürdükleri IC50 dozları bulunmuştur. Her kimyasal için IC50 dozu ve altında iki doz seçilip, çalışmada kullanılmıştır. Tez çalışmasının hipotezine uygun olarak *Xanthoria parietina* ekstratı tek başına önemli bir genotoksik hasar vermediği gözlemlenmiştir. Ancak kuvvetli antioksidan etkisinden beklendiği kadar DNA hasarını ortadan kaldırdığını söyleyemeyiz. Yapılan ROS ve DPPH testleri, *Xanthoria parietina* liken ekstratının, hücre içinde meydana gelen reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldırdığını ve kuvvetli bir antioksidan etkisi olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda solar ultraviyole radyasyon ile ilgili çeşitli hastalık ve rahatsızlıkların görülme sıklığı endişe verici biçimde artmıştır ve büyümeye devam etmektedir. Memeli cildinin UV radyasyonuna kronik olarak maruz kalması, eritem, ödem, güneş yanığı hücresi oluşumu, hiperplazi, bağışıklık baskılanması, DNA hasarı, fotosentez ve melanogenez oluşumu da dahil olmak üzere bir takım biyolojik tepkilere neden olur. Bu değişiklikler cilt kanserinin gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak yer alır.

Cildin güneş ışığına maruz kalması, oluşan serbest radikallere karşı kendini koruma becerisini bozar. UV, DNA hasarı nedeniyle cilt kanseri (skuamöz ve bazal hücreli karsinom) indüklenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca cildin bağışıklık savunma sistemini düşürdüğünden şüphelenilmektedir (Svobodová ve ark. 2003).

Cilt epidermal hücrelerinin zarar görmesi UV ışınımından 2 saat sonra ortaya çıkar. Hasarın ilk göstergesi, keratinosomlarda azalmadır, bu da diskartototik hücrelerin oluşumuyla sonuçlanır. Hücre içi ödem, maruziyetten 16–18 saat sonra görülebilir, hasarlı keratinositler etrafında gelişen hücreler arası ödem ile 30-48 saatte izlenir.

İnsan cildi sürekli güneş ışığında mevcut olan UV ışınlarına maruz kalır. Bu, bir takım patobiyolojik hücresel değişikliklere neden olabilir. Yeni koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi, UV hasarının moleküler mekanizmasını anlamamıza bağlıdır.

Yapılan bir çalışmanın sonucuna göre bitki fenolikleri, UV radyasyonunun cilt üzerindeki olumsuz etkilerinin önlenmesi için bir adaydır ve klinik etkinliklerinin değerlendirilmesi gerekmektedir (Svobodová ve ark. 2003).

Bu çalışmada yaptığımız ROS testi sonucunda Xanthoria parietina ekstratının antioksidan özelliğinden dolayı UV'nin verdiği hasarı engellediği gözlemlenmiştir.

Güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyon, belli ölçüde herkesin cildini etkiler, ancak cildin vereceği tepki kişiden kişiye değişir (Anonim 2012). Güneş ışınlarının meydana getirdiği zararlı etkiler; UV' den etkilenme süresine ve sıklığına, derinin renk ve fototipine bağlıdır (Kaymak ve İltter 2010). Son yıllarda yaşam tarzının değişmesi, bronzlaşma modası ve bu deri rengine ulaşmak için bilinçsizce yapılan uygulamalar ve ozon tabakasının incilmesi sonucu UV ışınlarına maruz kalma süresinin artışına paralel olarak ciltte “fotohasar” dediğimiz belirgin değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Altuntaş ve ark. 2011).Uzun süreli güneş ışığına maruz kalmanın deride eritem, bağışıklığın baskılanması, erken cilt yaşlanması ve cilt kanserine sebep olacağı bilinmektedir (Armeni ve ark. 2004). Doğal güneş ışığı UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (200-280 nm) ve görülebilir ışık (400-700 nm) içermektedir. UVA radyasyonu cildin dermis tabakasına kadar ulaşabilmektedir. UVB radyasyon ise eritema bölgesi olarak bilinen epidermis tabakasında büyük oranda emilerek az miktarda da üst dermis tabakasında kalabilmektedir. UVC radyasyonu ise Dünya yüzeyine erişemeyen radyasyon olarak bilinmektedir (McGregor ve ark. 1996). Ciltteki foto-yaşlanmanın oluşumunda fotonların hücrel DNA'ya direkt etkisiyle birlikte, UVA ve UVB'nin ortaya çıkardığı serbest radikaller ve ROS etkisinin de sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nükleik asit ve proteinler UVB'yi absorbe eden major hücrel kromoforlardır. Kollajen ve elastindeki çapraz bağlı aminoasitler de UV radyasyonu absorbe ederler. DNA tarafından UVB'nin absorbe olması pirimidin bazıları arasında çapraz reaksiyona neden olurken kromoforlar tarafından UVA'nın absorbe olması ROT üretimine neden olur (Beak ve ark. 2004; Yetkin ve ark. 2009; Deliconstantinos ve ark. 1996). UVA oluşumlu ROS, kollajenin çapraz bağlanmasına neden olur. UV radyasyonundan 6-24 saat sonra epidermin bazal tabakasında doza bağlı mitotik aktivite azalması görülür (Heck ve ark. 2003; Yetkin ve ark. 2009). Bunu keratinosit, melanosit ve fibroblastlarda programlanmamış DNA sentezindeki artış takip eder. Programlanmamış DNA sentezi, DNA'daki UV ile indüklenen pirimidin dimerlerini

uzaklaştıran tamir sürecinin sonucudur. Kalan dimerler hücre ölümüne veya hücre fonksiyonunda bozulmaya yol açar (Clydesdale ve ark. 2001). Benzer şekilde, güneşin uzun süreli etkileri sonucunda derinin üst katmanında bulunan DNA'da meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak deri kanserlerine, deri tümörlerine yatkınlık olabilmektedir (Clydesdale ve ark. 2001). Bu yüzden güneş koruyucu filtreler tüm dünyada kullanılmakta ve uzmanlar tarafından bu filtrelerin kullanılması önerilmektedir. Güneş koruyucu olarak hem doğal hem de kimyasal filtreler kullanılabilir. Doğal filtrelerin koruyuculuğunun sağlık açısından daha iyi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada kullandığımız *Xanthoria parietina* ekstratı doğal organik filtrelerdendir.

UV ışınlaşmasının doğrudan etkisi, DNA UV-B'den fotonları emdiğinde oluşur. Bu nükleotidlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesiyle sonuçlanır ve bu daha sonra DNA zincirinde kusurlara yol açar. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPD) ve pirimidin (6-4) pirimidon (6-4 fotoproducts, 6-4 PPs) UV-B'nin neden olduğu DNA hasarının ana ürünleridir. UV-B fotonlarının doğrudan absorpsiyonu, iki komşu pirimidin bazının arasında döngü yükünü indükler ve bunları değiştirir. Bu arada, iki komşu pirimidin bazının kovalent bağ oluşumu fotoürün üretir. Bu ayrıca 314 nm'de UV uyarılması üzerine Dewar değerlik izomerine dönüşür. UV kaynaklı DNA lezyonlarının olduğu yer, tandem pirimidin kalıntılarının (TT, TC, CT ve CC) olduğu yerdir. Bu noktada hücreler, daha fazla DNA hasarını önlemek ve DNA onarım mekanizmasının başlamasını sağlamak için hücre bölünmesini derhal durdurarak tepki vermektedir. Düşük türlerde, UV kaynaklı DNA lezyonlarının spesifik bir şekilde çıkarılmasıyla DNA'yı onarmak için fotolizaz enzimi kullanılır. Enzim lezyon bölgelerinde CPD veya 6-4 PP'leri bağlar ve dimerleri hasarsız bazlara geri böler. Bununla birlikte, insan ve diğer memeli hücreleri artık bu enzime sahip değildir. İnsanlarda UV kaynaklı ana DNA hasar tepkisi, nükleotit eksizyon onarımı (NER) yoludur. Memeli hücrelerinde NER olarak işlev gören 9 ana protein vardır. RAD23'ler, RPA, ERCC1 proteinleri ve diğerleri ayrıca nükleotid eksizyon onarımına da katılırlar. Bu proteinlerin eksikliği, DNA hasarı ve erken cilt yaşlanması ile ilişkili hastalıklara yol açmaktadır (Panich ve ark. 2015). Yaptığımız komet testinde UV nin artan dozlarıyla da doğru orantılı olarak hücrelere DNA hasarı verdiği görülmüştür. Fakat UV yle birlikte *Xanthoria parietina* ekstratıyla muamele edilen hücrelerde, DNA hasarının önemli derecede azaldığı görülmüştür.

Otlar, yüzyıllardır ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanılmıştır. Cilt görünümünü geliştirme ve iyileştirmenin yanında farklı cilt hastalıklarını da tedavi etme potansiyelleri bilinmektedir. Ultraviyole (UV) radyasyonu güneş yanıklarına, kırışıklıklara, enfeksiyonlara karşı daha düşük bağışıklık, erken yaşlanma ve kansere neden olabileceğinden, UV radyasyonundan korunma ve yan etkilerinden korunma için sürekli ihtiyaç vardır. Bitkisel preparatlar ve otlar, başta antioksidan aktivitelerinden dolayı yüksek bir potansiyele sahiptir. Vitaminler, fenolik asitler ve flavonoidler gibi antioksidanlar, çok sayıda negatif cilt değişiminin ana nedeni olan serbest radikal türlere karşı mücadelede ana rolü oynamaktadır. Her ne kadar izole edilmiş bitki bileşikleri, cildin korunmasında yüksek bir potansiyele sahip olsada, bütün bitki özleri, kompleks kompozisyonları nedeniyle daha iyi bir potansiyel göstermiştir. Birçok çalışma yeşil ve siyah çayın (polifenoller) UV ışınlarına maruz kalmanın ardından olumsuz cilt reaksiyonlarını giderdiğini göstermiştir. Aloe vera'dan gelen jelin cildi canlandırdığı ve yeni hücre büyümesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada spektrofotometre testi, konsantre bir *Krameria triandra* özütü olarak, tipik olarak oktil metoksisinamat tarafından absorbe edilen UV radyasyon miktarının % 25 ile % 30'unu emdiğini gösterir. Susam yağı UV ışınlarının % 30'una dayanırken, hindistancevizi, yarfıstığı, zeytin ve pamuk tohumu yağları yaklaşık % 20'sini bloke eder. Naftokinon ve keratinden oluşan bir "sklerojuglonik" bileşik, UV koruması sağlayan reaksiyon ürünüdür. Bitkisel ekstraktın ilaç veya güzelleştirmede geleneksel kullanımı, araştırmalar ve kozmetikte yeni trendler oluşturmak için temel oluşturur (Korać ve Khambholja 2011).

Çalışmada bulduğumuz anlamlı sonuçlardan biri *Xanthoria parietina* ekstratı UV'yle birlikte hücrelere muamele edildiğinde DNA hasar oranını kuyruk uzunluğu bazında düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmada kullandığımız doğal UV filtresi olabileceğini düşündüğümüz *Xanthoria parietina* ekstratının UV kaynaklı genotoksik etkiyi olumsuz yönde etkilemediği gözlemlenmiştir. Yapılan ROS deneyinin sonuçlarına bakılarak bunun sebebinin *Xanthoria parietina* ekstratının antioksidan özelliğinin sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Bu ekstratın güneş koruyucu kremlerde kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak tüm bu verilerin sağlam temellere oturtulabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca bu çalışmada kullandığımız UV filtresi ile in vivo hayvan modelleri üzerinde sitotoksosite ve genotoksosite çalışmaları ile bu etkilerini aydınlatacak mekanizma belirleme çalışmalarının da gerçekleştirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Arlett, C.F., Plowman,P.N., Roger, P.B., Parris, C.N., Abbaszadeh, F., Green, M.H., McMillan,T.J., Bush,C., Foray,N., Lehmann,A.R. 2006.** Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *Br J Radiol*, (79): 510-7.
- Aydemir,B., Karadağ,Sarı,E. 2009.** Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2): 56-60.
- Baliga,M.S.,Katiyar,S.K. 2006.** Seçilen bitkisel botaniklerle fotokarsinogenezisin kemoprevansı. *Photochem Photobiol Sci.*, (5): 243-53.
- Barcroft,A., Myskja,A. 2003.** Aloe Vera: Doğanın Sessiz Şifacı. BAAM Yayıncılık Ltd., Londra.
- Baumann,L. 2009.** Antioksidanlar. McGraw Hill Profesyonel AŞ. 34. 2. New York.
- Bhatia,S., Sharma,K., Namdeo,A.G., Chaugule,B.B., Kavale,M., Nanda,S. 2010.** Porphyra-334'ten türetilen Porphyra-334'ün geniş spektrumlu güneş koruyucu etkisi. *Phcog Res.*, (2) : 45-9.
- Beyazıt, A.,2011.** Güneş ve Deri Sağlığımız. Amerikan Hastanesi Basın Bülteni, Kurumsal Haberler. (Erişim tarihi: 02.12.2012).
- Browden,J. 2009.** Zeytin Yapısının İnanılmaz Etkili Yaşlanma Karşıtı, Antioksidan Pro-Bağışıklık Sisteminin Sağlık Faydalarını Sağlayın. Topanga: Özgürlük Basın,Türkiye.
- Bruins,W., Zwart,E., Attardi,L.D. 2004.** Ser389'da bir p53 noktası mutasyonu ile farelerde UV radyasyonuna karşı artan hassasiyet. *Moleküler ve Hücresel Biyoloji.*, 24 (20): 8884-8894.
- Carini,M., Aldini,G., Orioli,M., Facino,R.M. 2002.** Krameria triandra köklerinden neoliganlar içeren bir lipofilik ekstrenin antioksidan ve foto koruma aktivitesi. *Planta Med.*, 68:193-7.
- Choquenot,B., Couteau,C., Papis,E., Coiffard,I.J. 2008.** Quercetin ve potansiyel güneş koruyucu ajanlar olarak rutin: Etkinliğin bir *in vitro* yöntemle belirlenmesi. *J Nat Prod.*, 71 : 1117-8.
- Christmann,M., Tomicic,M.T., Roos,W.P., Kaina,B. 2003.** Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology.*,:193(1-2):3-34.
- Counet C, Callemien D, Collin S. 2006.** Çikolata ve kakao: Yeni trans-resveratrol ve trans-piceid kaynakları. *Besin Kimyası.*, 98 : 649-57.
- Craig,A..L,Holcakova,J., Finlandiyalı,L.E. 2010.** DeltaNp63, p53 Serin-15 fosforilasyonunu kontrol etmek için ATM'yi transkripsiyonel olarak düzenler. *Moleküler Kanseri.*, 9: 1476-4598-9-195.
- Dayan,N. 2008.** Biyokimya ve Ürün Geliştirmeye Entegre Bir Yaklaşım, William Andrew Inc., Cilt yaşlanması el kitabı.,New York.
- DebeleçBütüner,B., Kantarcı, G.2006.** Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kansere İlişkisi. *J Fac Pharm.*, 35 (2); 149-70.
- Durmaz,A.,Dikmen,N.,Gündüz,C.2010.** DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (Komet Yöntemi). *DergiPark*,19: 236.
- Dweck,A.C. 2002.** Cilt için bitkisel ilaç - kimyası ve cilt ve mukoza zarar etkileri. *Pers Care Mag.*, 3 : 19-21.
- Dweck,A.C.2009.** Renkli kozmetik ürünler. Doğal boyalara kapsamlı odaklanma. *Pers Bakımı.*,2,3:57-69.

- Ekici,L.,Öztürk,İ.,Sağdıç,O.,Yetim,H. 2014.** Et ve et ürünlerinde baharatların doğal antioksidan ve antimikrobiyel olarak kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30(1):66-72.
- Erlund,I. 2002.** Flavonoid quercetin, hesperetin ve naringenin insanlarda kimyasal analizi ve farmakokinetiği, Akademik tez. Helsinki: Helsinki Üniversitesi; Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü, Helsinki Üniversitesi, Sağlık ve Fonksiyonel Kapasite Bölümü.
- Evcı, E.D., Vaizoğlu S., Tekbaş F., Güler C.2003.** Halkla açık bir Plajda UV Işınlara Etkilenim Düzeyleri ve Burada Güneşlenenlerin Güneş Işınlarmın Etkileri ile Korunmaya İlişkin Bilgi Düzeylerinin Saptanması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Türkiye,113-121 pp.
- Friedberg,E.C .2003.** DNA damage and repair, *Nature.*:421(6921):436-40.
- Şen,H., Aksoy, A., Çobanoğlu, G.,Selvi S. 2014.** Natural dyeing works on some lichens species distributed in Ayvacık,Çanakkale and İvrindi,Balıkesir,Turkey.
- García-Bores,A.M., Avila,J.G. 2008.** Deri kanserinin fotokimyasal oluşumundaki moleküler mekanizmalar. *Rev Latinoamer Quím.*, 36 : 83-102.
- Geankoplis, C.J. 1983.** Transport Processes and Unit Operations, 2nd ed., Allyn and Bacon Inc., Boston.
- Geoffrey,M., CooperRobert,E. 2006.** Hücre Moleküler Yaklaşım. *Hausman*, (3):192-230.
- Güler, Ç. ve Akın, L. 2006.** Halk Sağlığı Temel Bilgiler Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 248-301pp.
- Hanawalt,P.C. 2002.** Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.*, (21): 8949-56.
- Hirsch,R.J., Sadick,N., Cohen,J.L. 2008.** Estetik Gençleştirme: Bölgesel Bir Yaklaşım,editörler: Hirsch,R.J., Sadick,N., Cohen,J.L., McGraw-Hill Profesyonel, New York, 2-130pp.
- Hoeijmakers, J.H.J.2009.** DNA hasarı, yaşlanma ve kanser. *New England Tıp Dergisi*, (15): 1475-1485.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.2005.** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, (53): 1841-1856.
- Kapoor,S., Saraf,S. 2010.** Bitkisel nemlendiricilerin viskoelastisite ve hidrasyon etkisinin biyomühendislik teknikleri kullanılarak değerlendirilmesi. *Phcog Mag.*, (6): 298.
- Karabulut, H., GÜLAY.M.Ş. 2016.** Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji AD. 15030. Burdur.
- Karaduman,A.2002.** Solar Radyasyon Ve Deri Üzerine Etkileri. Tekstil ve Mühendis, http://saglik.tr.net/genel_saglik_solar_radyasyon.shtml (Erişim Tarihi: Şubat 2013)
- Katiyar,S.K., Korman,N.J., Muhtar,H.,Agarwal,R.1997.** Silymarinin fare deri modelinde fotokarsinogeneze karşı koruyucu etkileri. *J Natl Cancer Inst.*, (89) :66-556.
- Kulaksız,G., Sancar,A. 2007.** Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, (3): 104-11.
- Kulaksiz,G., Reardon,J.T., Sancar,A. 2005.** Xeroderma pigmentosum tamamlama grubu E proteini (XPE / DDB2): çeşitli XPE komplekslerinin saflaştırılması ve hasarlı DNA bağlama ve varsayılan DNA tamir özelliklerinin analizi. *Moleküler ve Hücreyel Biyoloji*, (22): 9784-9792.
- Lakin,N.D., Jackson,S.P. 1999.** DNA hasarına cevaben p53'ün düzenlenmesi. *Onkojen*, (53): 7644-7655.

- Majo,D.D., Guardia,M.L., Giammanco,S., Neve,L.L., Giammanco,M. 2008.** Polifenolik bileşenleri ile bağlantılı olarak kırmızı şarabın antioksidan kapasitesi. *Besin Kimyası.*, (2) 45–9.
- Maxcy-Rosenau-Last. 1998.**Public Health and Preventive Medicine. Ed. Wallace RB, Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 627-29pp.
- Molyneux, P.2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, (2), 211- 219.
- Moskalev A.A., Shaposhnikov M.v. 2013.** Plyusnina EN ve diğ. Koch benzeri kriterlerin prizmasından dolayı yaşlanmada DNA hasarının ve onarımının rolü. *Yaşlanma Araştırma İnceleme*, (2): 661-684.
- Mutlu, B., Toros, H., Şen, O. 2003.** Ultraviyole Radyasyonun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. 19-21 Mart, III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu Bildiri El Kitabı. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul,130-240pp.
- Onur,E., Tuğrul,B.,Bozyiğit,F.2009.** DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları DNA Damage and Repair Mechanisms.Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa.
- Ou,B., Huang,D., Hampsch-Woodill,M., Flanagan,J.A., and Deemer, E.K. 2002.** Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, (11): 3122-3128.
- Özbek, G. 2003.** Güneş Koruyucuları. *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, (2):110-118.
- Perry,R.H., Green,D.1985.** Perry's Chemical Engineers' Handbook, Mc Graw Hill., New York, 400s.
- Rojas,E., Lopez,M.C., Valverde,M.1999.** Single cell gel electrophoresis assay methodology and applications. *J. Chromatogr.*, (722): 225-54.
- Ronen,A., Glickman,B.W. 2001.** Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*, (3):241- 83.
- Sancar,A., Lindsey-Boltz,L.A., Unsal-Kacmaz,K., Linn,S. 2004.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem.*:73:39- 85.
- Saraf,S., Kaur,C.D. 2010.** Foto-koruyucu yeni kozmetik formülasyonlar olarak fito-bileşimler. *Phcog Rev.*, (4): 1–11.
- Scalzo, R.L.2008.** Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, *Food Chem.*, (107): 40–43.
- Svobodová,A.,Psotova,J.,Walterová,D. 2003.** UV kaynaklı cilt hasarının önlenmesinde doğal fenolikler. *Biomed Kağıtları*, (147): 137-45.
- Tekbaş, Ö.F., Evcı, D., Özcan, U.2005.** Yaklaşan Yaz Mevsimi İle Artan Bir Tehlike: Güneş Kaynaklı Ultraviyole Işımları. Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekimlik Bülteni, Türkiye,98-107pp.
- Tsuda,T. 2000.** Sıçanlarda oksidatif stres altında antioksidanların antioksidan olarak rolü. *Biofactors*. (13): 133-9.
- Wilson,R. 2002.** Aromaterapi. Canlı Sağlık ve Güzellik İçin Temel Yağlar, Aromaterapinin temel prensibi, Penguin Putman A.Ş., New York,400.
- Wood,R.D., Mitchell,M., Sgouros,J., Lindahl,T. 2001.** Human DNA repair genes, *Science*,(16):1284-9.
- Yassi,A., KjellströmKok,T., Guidotti,T.L. 2001.** Basic Environmental Health. Oxford University Press, New York, 375-78pp.

Yoon,T., Chakraborty,A., Franks,R., Valli,T., Kiyokawa,H., Raychaudhuri,P.
2005. DDB2 eksikliği bulunan farelerin tümör eğilimli fenotipi. *Onkojen.*, (3): 469-478.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem ÇIRACI
Doğum Yeri ve Tarihi : Muğla/TÜRKİYE – 27.09.1991
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Milas Lisesi / 2005 – 2009
Lisans : U.Ü. F.E.F. Biyoloji Bölümü / 2009 – 2015
Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D. / 2016 – 2019