



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SİÇANLARDA ULTRAVİYOLE A VE B İLE İNDÜKLENMİŞ
DERİ HASARINDA ELLAJİK ASİT VE SİLİBİNİNİN
DOKU KORUYUCU, ANTIAPOPTOTİK VE
ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
VE STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Uzman Biyolog Seda KESKİN
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Halil ÖZKOL

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE A VE B İLE İNDÜKLENMİŞ
DERİ HASARINDA ELLAJİK ASİT VE SİLİBİNİNİN
DOKU KORUYUCU, ANTIAPOPTOTİK VE
ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
VE STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Uzman Biyolog Seda KESKİN
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Halil ÖZKOL

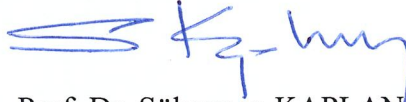
VAN-2018

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2017-6175 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Seda KESKİN tarafından hazırlanan “SIÇANLARDA ULTRAVİYOLE A VE B İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ HASARINDA ELLAJİK ASİT VE SİLİBİNİNİN DOKU KORUYUCU, ANTIAPOPTOTİK VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/08/2018



Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üye. Neşe ÇÖLÇİMEN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

Prof. Dr. Semiha DEDE

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda Ultraviyole A ve B ile İndüklenmiş Deri Hasarında Ellajik Asit ve Silibininin Doku Koruyucu, Antiapoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Moleküler ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma / araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Seda KESKİN

Tarih: 05/09/2018

İmza

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yüksek lisans tezi olarak veren, yüksek lisans eğitimim ve asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran ve tezimin hazırlanmasında destek ve yardımlarıyla yol gösteren değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ ve Doç. Dr. Halil ÖZKOL'a, yine her türlü desteğini gördüğüm saygıdeğer hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÇÖLÇİMEN ve Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye, Prof. Dr. İsmail ÇELİK'e, Öğr. Gör. Dr. Fikret ALTINDAĞ'a, Öğr. Gör. Veysel AKYOL'a, Araş. Gör. Ayşe ŞEKER'e, doktora öğrencisi Abdülbaki DEMİR'e, yüksek lisans öğrencisi veteriner hekim Gizem ESER'e, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Serkan YILDIRIM'a istatistiksel değerlendirmeler aşamasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e, ayrıca eğitim hayatım boyunca ve yaşamımın her alanında destekçim olan başta hayatıma her zaman anlam katan babama-anneme ve can yarım kardeşime teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca TYL-2017-6175 proje numarası ile çalışmaya maddi destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.

ÖZET

Keskin S. Sıçanlarda Ultraviyole A ve B ile İndüklenmiş Deri Hasarında Ellajik asit ve Silibininin Doku Koruyucu, Antiapoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Moleküler ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018. Çalışmalar Ultraviyole A ve B (UVAB) radyasyonunun oksidatif stres ve DNA hasarına neden olduğu, ellajik asit (EA) ve silibininin (SB) ise antioksidan özellik gösterdiğini bildirmektedir. Bu çalışmada, deneysel olarak sıçan sırt derisinde oluşturulan UVAB hasarına karşı EA ve SB'nin tedavi etkinliği biyokimyasal, immünohistokimyasal (TUNEL) ve stereolojik yöntemlerle araştırıldı. Bu amaçla, oksidatif stres ve apoptozda meydana gelen değişiklikler, stereolojik inceleme ile birlikte değerlendirildi. Her biri 7 Wistar albino dişi sıçandan oluşan 6 grup oluşturuldu. Gruplar; Kontrol (K), Ultraviyole A ve B grubu (UVAB), Ellajik asit (EA) grubu, Silibinin (SB) grubu, UVAB+EA (Ultraviyole AB grubu+Ellajik asit) grubu ve UVAB+SB (Ultraviyole AB grubu+Silibinin) grubu olarak adlandırıldı. UVAB, UVAB+EA ve UVB+SB grubundaki hayvanlar 30 gün boyunca günde 2 saat süreyle UVAB ışımına maruz bırakıldı. UVAB+EA ve UVAB+SB gruplarına her UVAB uygulamasından 30 dk önce 50 mg/kg/gün EA ve 50 mg/kg/gün SB gavaj yoluyla verildi. UVAB uygulanmayan EA ve SB gruplarına ise aynı dozlarda 50 mg/kg/gün EA ve SB gavaj yoluyla verildi. Bütün hayvanlar 30. günde sakrifiye edildi. Analizler için sırt deri dokuları alındı. Araştırma sonuçlarına göre; UVAB grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında Total Antioksidan Seviyesindeki (TAS) azalma ve SB ve EA verilen tedavi grupları ile UVAB grubu kıyaslandığında TAS seviyesindeki artış anlamlı değildi ($p>0.05$). UVAB grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında Total Oksidan Seviyeleri (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p<0.05$). Ancak TOS ve OSİ seviyelerindeki bu artışların tedavi gruplarında anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Çalışmada elde edilen stereolojik bulgular değerlendirildiğinde UVAB grubunda epidermis hacim oranında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Tedavi gruplarındaki sıçanların dorsal deri epidermis kalınlıklarında ise UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı ($p<0.05$). EA ve SB'nin UVAB'nin birlikte uygulandığı gruplarda, mast hücre sayısı UVAB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Çalışmada UVAB+EA ve UVAB+SB tedavi gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısı, UVAB grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Bu çalışma, ellajik asit ve silibininin UVAB hasarı tedavisinde faydalı olabildiğini ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için ellajik asit ve silibininin farklı dozlarının oral olarak verilmesi veya topikal olarak denenmesi ile yapılacak *in vitro* ve *in vivo* daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Deri, Ellajik asit, Apoptoz, Oksidatif stres, Silibinin, Stereoloji, UVAB.

ABSTRACT

Keskin S. Investigation of Tissue Protective, Antiapoptotic and Antioxidant Effects of Ellagic Acid and Silibinin in Ultraviolet A and B - Induced Skin Damage in Sharp S. Rats by Molecular and Stereological Methods. Van, Yuzuncu Yil University Institute of Health Sciences, Department of Medical Histology and Embryology, M.Sc. Thesis, Van, 2018. Studies indicate that ultraviolet A and B (UVAB) radiation causes oxidative stress and DNA damage, whereas ellagic acid (EA) and silibinin antioxidant properties. In this study, the therapeutic efficacy of EA and SB was investigated by biochemical, immunohistochemical (TUNEL) and stereological methods against UVAB damage generated experimentally in rat dorsal ridge. For this purpose, changes in oxidative stress and apoptosis were evaluated together with stereological examination. Six groups of 7 *Wistar* albino female rats were formed each. Groups; The control group (K), Ultraviolet A and B group (UVAB), Ellagic acid (EA) group, Silibinin (SB) group, UVAB + EA (Ultraviolet AB + Ellagic acid) group and UVAB + SB (Ultraviolet AB+ Silibinin) group. The animals in the UVAB, UVAB + EA and UVB + SB groups were exposed to UVAB radiation for 2 hours daily for 30 days. 50 mg/kg/day EA and 50 mg/kg/day SB were given orally 30 minutes prior to each UVAB application to the UVAB + EA and UVAB + SB groups. EA and SB without UVAB were given 50 mg/kg/day EA and SB by the same doses. All animals were sacrificed on the 30th day. Ridge skin tissues were taken for analysis. According to the results of the research; UVAB group compared with the control group, the decrease in Total Antioxidant Status (TAS) and the increase in TAS level compared with the UVAB group were not significant ($p > 0.05$). There was a significant increase in Total Oxidant Status (TOS) and Oxidative Stress Index (OSI) levels compared to the UVAB group control group ($p < 0.05$). However, these increases in TOS and OSI levels decreased significantly in treatment groups ($p < 0.05$). When the stereological findings obtained in the study were evaluated, it was observed that the volume ratio of epidermis in the UVAB group was significantly increased compared to the control group ($p < 0.05$). There was a statistically significant decrease in the dorsal skin epidermis thickness of the treatment group rats compared to the UVAB group ($p < 0.05$). When EA and SB were administered together with UVAB, the number of dermal mast cells decreased significantly, compared statistically to the UVAB group ($p < 0.05$). The number of TUNEL positive cells in the UVAB + EA and UVAB + SB treatment groups significantly decreased when compared with the UVAB group ($p < 0.05$). This study found that ellagic acid and silibinin could be useful in the treatment of UVAB damage. In order to support the findings obtained here, there is a need for further *in vitro* and *in vivo* studies to be carried out by oral or topical administration of different doses of ellagic acid and silibinin.

Key words: Skin, Ellagic acid, Apoptosis, Oxidative stress, Silibinin, Stereology, UVAB.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri Histolojisi	3
2.1.1. Epidermis (üst deri).....	3
2.1.2. Dermis (alt deri)	7
2.1.3. Hipodermis (Subkutanöz yağ).....	10
2.1.4. Derinin işlevleri.....	11
2.1.5. Deri embriyolojisi	12
2.2. Ultraviole Radyasyon	13
2.3. UV Radyasyonun Deri Üzerindeki Etkileri.....	14
2.3.1. UV'nin göz üzerindeki etkileri.....	18
2.3.2. UVR'nun eritem oluşumuna etkileri	18
2.3.3. UVR pigmentasyona etkileri.....	19
2.3.4. UVR'nin yararları	19
2.4. Serbest Radikaller.....	20
2.4.1. Serbest radikallerin canlı sistemlere etkileri	21
2.5. Antioksidan Maddeler	22
2.5.1. Deri ve oksidatif stres.....	23
2.6. Çalışmada Etkinliği Araştırılan Kimyasal Maddeler	24
2.6.1. Ellajik asit (EA).....	24
2.6.2. Silibinin (SB)	26
2.7. Çalışmada Takip Edilen Biyokimyasal, Histolojik ve Stereolojik Belirteçler	28
2.7.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSİ).....	28
2.7.2. Apoptozis	29
2.7.3. Deri ve apoptozis.....	30
2.8. Çalışmada Kullanılan Stereolojik Yöntemler.....	33
2.8.1. Fiziksel disektör ile örnekleme ve hücre sayımı	35
2.8.2. Tarafsız sayım çerçevesi	36
2.8.3. Hacim fraksiyonu (yoğunluğu)	37
2.8.4. Toplam hücre sayısının hesaplanması.....	38

2.8.5. Referans Hacminin Hesaplanması (Cavalieri metodu)	38
2.8.6. Hata katsayısı (HK)	40
2.9. Dermoklinikte Yapılan Stereolojik Araştırmalar	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Materyal	42
3.2. Metot	42
3.2.1. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar	44
3.2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve bulunduğu yerler	46
3.2.3. Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması	46
3.2.4. UVAB uygulanması	47
3.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması	48
3.4. Analizlerin Yapılması	51
3.4.1. Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm tayini	51
3.4.2. Total antioksidan seviyesi (TOS) ölçüm tayini	52
3.4.3. Oksidatif stress indeksi (OSI)'nin hesaplanması	52
3.5. TUNEL Boyama Yöntemi	52
3.5.1. Kimyasalların hazırlanması	52
3.5.2. TUNEL boyama protokolü	54
3.6. Stereolojik İncelemeler	55
3.6.1. Kimyasalların Hazırlanması	55
3.6.2. Stereolojik analizler için doku takibi	57
3.7. Doku preparatlarının incelenmesi	60
3.7.1. Çalışmada hacim hesaplamalarında hata katsayısının (HK) hesaplanması ...	62
3.8. İstatistiksel Analizler	63
4. BULGULAR	64
4.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi	64
4.1.1. Klinik bulgular	66
4.2. Makroskobik Bulgular	66
4.3. Histopatolojik Bulgular	68
4.4. İmmunohistokimyasal (TUNEL) Bulgular	72
4.5. Stereolojik Bulgular	79
4.6. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları	90
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	93
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	109
EKLER	110
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	110
EK 2. Tez İntihal Raporu	111

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm	:	Mikrometre
°C	:	Santigrat derece
₁O₂	:	Singlet (tekli) oksijen
AU	:	Arbitrary unit
cm	:	Santimetre
DK	:	Değişim katsayısı
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EA	:	Ellajik asit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	:	Elektromanyetik radyasyon
g	:	Gram
GSH	:	Redükte glutatyon
H&E	:	Hematoksilen-eozin
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HK	:	Hata katsayısı
i.p	:	İntraperitoneal
KAT	:	Katalaz
KH₂PO₄	:	Potasyum dihidrojen fosfat
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
N	:	Toplam tanecik sayısı
NO	:	Nitrik oksit
N_v	:	Sayısal yoğunluk
O₂	:	Oksijen
O₂⁻	:	Süperoksit anyonlar
OH⁻	:	Hidroksil radikali
OSI	:	Oksidatif stres indeksi
PBS	:	Soğuk fosfat tamponu
Q⁻	:	Disektör taneciği
ROS	:	Reaktif oksijen türevleri

SB	:	Silibinin
SM	:	Silimarin
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SRÖ	:	Sistemik rastgele örnekleme
Str	:	Stratum
TAS	:	Total antioksidan seviyesi
TOS	:	Total oksidan seviyesi
UV	:	Ultraviyole
ΣVdis	:	Toplam disektör hacmi



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Epidermisin tabakaları	4
Şekil 2.	Dermoepidermal bağlantı	7
Şekil 3.	Dermis ve ekleri.....	9
Şekil 4.	Ultraviyole dalga boyları	13
Şekil 5.	UV'ye bağlı immüsupresyon molekülleri.....	17
Şekil 6.	Antioksidan-serbest radikal dengesi	21
Şekil 7.	Ellajik asit	25
Şekil 8.	Ellajik asit'in farmakolojik işlevleri	25
Şekil 9.	<i>Silybum marianum</i> L.....	27
Şekil 10.	UVB kaynaklı apoptoz sinyal yolları.....	32
Şekil 11.	Stereolojik metotların temeli	34
Şekil 12.	Örnek ve gözlem kesit	36
Şekil 13.	Tarafsız sayım çerçevesi.....	37
Şekil 14.	¼ ölçekli bir bileşik noktalı alan ölçüm cetveli	39
Şekil 15.	Sıçan sırt derisinin traş edilmesi	44
Şekil 16.	UVA Lambası	47
Şekil 17.	UVB Lambası	47
Şekil 18.	Deney hayvanlarına UVAB ışınının uygulanması.....	48
Şekil 19.	Sıçan sırt deri örneğinin alınması	49
Şekil 20.	5x5 mm'lik UVAB kesit.....	49
Şekil 21.	5x5 mm'lik Kontrol kesit.....	49
Şekil 22.	Doku homojenizasyonu	51
Şekil 23.	TUNEL boyama rehidrasyon serileri.....	54
Şekil 24.	Rutin histolojik boyama rehidrasyon serileri.....	58
Şekil 25.	Stereolojik işlemlerin yapıldığı ışık mikroskopi laboratuvarındaki stereoloji analiz sistemi.....	60
Şekil 26.	Shtereom ® 1.5 sürüm paket programında noktalı alan cetveli	61
Şekil 27.	Vücut ağırlık değişim yüzdesi	65
Şekil 28.	Doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıkları	67

Şekil 29.	Sıçan dorsal derisinde UVAB uygulaması yapılmayan kontrol grubu ve madde verilen gruplara ait makroskobik görünümü (30.gün)	68
Şekil 30.	Sıçan dorsal derisinde UVAB'nin uygulaması sonrası UVAB grubu ve tedavi gruplarına (UVAB+EA grubu ve UVAB+SB grubu) ait makroskobik görünüm (30.gün)	68
Şekil 31.	Kontrol grubu, deri, dermis ve epidermisin normal histolojik görünümü, H&E	69
Şekil 32.	EA (Ellajik asit) grubu, deri, dermis ve epidermisin histolojik görünümü, H&E	70
Şekil 33.	SB (Silibinin) grubu, deri, dermis ve epidermisin histolojik görünümü, H&E	70
Şekil 34.	UVAB (Ultraviyole A ve B) grubu, deri, epidermiste keratinositlerde ve epitellerde proliferasyon, epitellerde hidropik dejenerasyon, dermiste, fibroblastça zengin sıkı bir kollajen, damarlarda hiperemi, H&E.....	71
Şekil 35.	UVAB+EA (Ultraviyole AB+ Ellajik asit) grubu, deri, epidermisin keatinositlerde ve epitellerde hafif proliferasyon, kıl folikül epitellerinde çok az hücrede hidropik dejenerasyon, dermiste fibrositlerce zengin gevşek bağdoku, H&E.....	71
Şekil 36.	UVAB+SB (Ultraviyole AB+ Silibinin) grubu, deri, epidermiste keratinositlerde ve epitellerde orta düzeyde proliferasyon, dermiste, kısmen sıkı bağdoku ve çoğunluğu fibroblastlardan oluşan kollajen, H&E.....	72
Şekil 37.	Kontrol grubunda TUNEL reaksiyonu	74
Şekil 38.	EA grubunda TUNEL reaksiyonu	74
Şekil 39.	SB grubunda TUNEL reaksiyonu	75
Şekil 40.	UVAB grubunda TUNEL reaksiyonu	75
Şekil 41.	UVAB +EA (Ultraviyole A ve B + Ellajik asit) grubunda TUNEL reaksiyonu.....	76
Şekil 42.	UVAB +SB (Ultraviyole A ve B + Silibinin) grubunda TUNEL reaksiyonu.....	76
Şekil 43.	Ellajik asit ve silibinin maddelerinin UVAB uygulanmış sıçan sırt epidermisindeki DNA fragmentasyonu üzerine etkisinin TUNEL yöntemi ile gösterilmesi	78
Şekil 44.	Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak epidermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği.....	80
Şekil 45.	Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak dermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği	81

Şekil 46.	Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak hipodermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği.....	82
Şekil 47.	Kontrol grubu, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom).....	83
Şekil 48.	EA (Ellajik asit) grubu, deri, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom).....	83
Şekil 49.	SB (Silibinin) grubu, deri, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom).....	84
Şekil 50.	UVAB (Ultraviyole A ve B) grubu, deri, dermis fibrositlerden zengin çok sıkı bağ doku (Masson trikrom).....	84
Şekil 51.	UVAB +EA (Ultraviyole A ve B + Ellajik asit) grubu, deri, dermis, gevşek bir bağ doku (Masson trikrom).....	85
Şekil 52.	UVAB +SB (Ultraviyole A ve B + Silibinin) grubu, deri, dermis fibrositlerden zengin sıkı bağ doku (Masson trikrom).....	85
Şekil 53.	Tüm çalışma gruplarına ait dermal mast hücre sayısı.....	86
Şekil 54.	Kontrol grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	87
Şekil 55.	EA grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	87
Şekil 56.	SB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	88
Şekil 57.	UVAB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	88
Şekil 58.	UVAB+EA grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	89
Şekil 59.	UVAB+SB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi.....	89
Şekil 60.	Deri dokusu TAS değerlerinin grafiği.....	90
Şekil 61.	Deri dokusu TOS değerlerinin grafiği.....	91
Şekil 62.	Deri dokusu OSİ değerlerinin grafiği.....	92

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Derinin UVR'na cevabı	15
Tablo 2.	Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	30
Tablo 3.	Deneyde kullanılan kimyasallar ve markaları	45
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan mevcut cihazlar ve buldukları yerler	46
Tablo 5.	Fosfat tamponu hazırlanması	52
Tablo 6.	Light green SF boya solüsyonu hazırlanması	52
Tablo 7.	Asetik asit % 1'lik hazırlanması	53
Tablo 8.	TUNEL metodu doku takip işlem basamakları	53
Tablo 9.	Nötral tamponlu formalin (NTF) Hazırlanması	55
Tablo 10.	Harris'in hematoksilen boya solüsyonu hazırlanması	55
Tablo 11.	Eozin boya solüsyonu hazırlanması	56
Tablo 12.	Kullanıma hazır eozin boya solüsyonu	56
Tablo 13.	Stok solüsyonun hazırlanması	56
Tablo 14.	Sodyum klorür (NaCl) çözeltisi hazırlanması (%1'lik)	57
Tablo 15.	Toluidin mavisi çalışma solüsyonun hazırlanması	57
Tablo 16.	Rutin histolojik doku takip işlem basamakları	57
Tablo 17.	H&E ile boyanma prosedürü	58
Tablo 18.	10., 20. ve 30. gün vücut ağırlıkları değişim yüzdelerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	65
Tablo 19.	Doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıklarının dağılımı ve istatistiksel veriler	66
Tablo 20.	Grupların epidermiste TUNEL pozitif boyalı hücrelerin yoğunluğu	77
Tablo 21.	Kruskal -Wallis testi istatistik sonuçları	78
Tablo 22.	Kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının hacim oranlarının stereolojik olarak hesaplanması ve grupların birbiriyle karşılaştırılması	79
Tablo 23.	Kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak hacimlerinin HK ve DK değerleri	80
Tablo 24.	Çalışma grupları sıçan dorsal dermal mast hücre sayısı	86
Tablo 25.	Deri dokusunda ölçülen TAS sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	90
Tablo 26.	Deri dokusunda ölçülen TOS sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	91
Tablo 27.	Deri dokusunda ölçülen OSİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	92

1. GİRİŞ

Güneş ışığı yaşam için vazgeçilmez olsa da, cilt ile ilgili çeşitli rahatsızlıklara neden olabilir. Güneş ışınımının ultraviyole (UV) radyasyonu özellikle, cildin hafif iltihap etkilerinden, farklı türdeki kanser türlerine kadar ciddi rahatsızlıklarla ilişkilidir. Son yıllarda atmosferdeki ozon tabakasının incelmeye başlaması ile birlikte yaşam tarzındaki değişiklikler, cilt kanseri insidansında artışa neden olmuştur (Gunaseelan ve ark., 2017).

En yüksek dalga boyuna sahip ultraviyole A (UVA;320-380 nm), dermise kadar nüfuz edebildiğinden deri hasarının büyük kısmı oksidatif stresle ilişkilidir. Bu yüzden UVA erken yaşlanmaya, deride kırışıklıklara ve deri kanserinin ilerlemesine sebep olabilir (Gunaseelan ve ark., 2017). Cildin UVA'ya maruz kalması apoptoza sebep olarak, hücrel proteinlerin, lipidlerin ve polisakkaritlerin hasarına bağlı ışığa duyarlı biyokimyasal süreçler tarafından üretilen singlet oksijen, süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi hücrel seviyelerde reaktif oksijen türlerini (ROS) artırır. Ayrıca dolaylı olarak da DNA'ya yapısal hasar verebilir. Işınlarda dalga boyu arttıkça etrafa yaydığı enerji azalır. Enerjisi UVA'ya göre fazla olan UVB 'nin (280-320 nm), deney hayvanlarında cilt kanserine sebep olduğu bildirilmiştir. UVA ışınları UVB'ye eklendiğinde karsinogenik etki şiddeti artar (Gunaseelan ve ark., 2017).

UV radyasyonuna maruz kalma şiddetinin azaltılması arzu edilir ve radyasyonun cilde etkisini en aza indirgeyebilmek için yeni stratejilerin geliştirilmesi önerilmektedir. Güneş ışınımının zararlı etkilerini azaltmaya yönelik yaklaşım fotoprotektif olarak bilinen fitokimyasalların kullanılmasıdır. Son yıllarda, potansiyel antioksidan özelliklere sahip birçok fitokimyasal tanımlanmıştır. Bu kimyasal ajanlar UV'ye maruz kalan derideki zararlı süreçlerin işlemini engelleyebilen, tersine çevirebilen veya geciktirebilme özelliklerine sahiptir (Bharath ve Turner, 2009). Hayvan modellerinde yapılan laboratuvar çalışmaları, bu polifenollerin deriyi cilt kanseri riskleri de dâhil olmak üzere UV radyasyonunun olumsuz etkilerinden koruma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra polifenollerin iltihaplanma, oksidatif stres ve DNA hasarı ile ilişkili cilt hastalıkları için faydalı olabileceği önerilmektedir (Gunaseelan ve ark., 2017).

Ellajik asit (EA), böğürtlen, ahududu, çilek, kıvılcık, ceviz, nar, kurt üzümü ve diğerk bitkisel besinler dâhil olmak üzere çok sayıda meyve ve sebzelerde bulunan polifenolik antioksidandır (Ambigaipalan ve ark., 2016). Diğerk polifenolik antioksidanlarda olduğu gibi EA *in vitro* ve *in vivo* modellerde güçlü antioksidan ve kemoprotektif özelliklere sahiptir. Polifenolik bir bileşik olan EA, kanser hücrelerinde büyümeyi önleyici ve apoptozu teşvik edici aktiviteler gösterdiği daha önceki araştırmalarda bildirilmiştir (Kim ve He, 2014).

Silybum marianum L. (süt devedikeni) ise Asteraceae familyasına ait flavonoligan yapısında bir bitki türüdür. Bitkinin çekirdeğinin polifenolik kısmını silimarin (SM) oluşturur. SM, çoğunlukla polimerik ve oksitlenmiş polifenolik bileşikleri içeren yaklaşık % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 kimyasal olarak tanımlanmamış maddeler içermektedir (Katiyar ve ark., 2008). Bu flavonoliganlar esas olarak silybin (silibinin; SB), isosilibin, silisristin ve silydianindir. Ancak SB, SM'nin en fazla bulunan biyolojik olarak aktif bileşenidir (Katiyar ve ark., 2008). Daha önce yapılan çalışmalarda SM'nin deri tümörüyle ilişkili UV radyasyon hasarını ve kimyasal tümör promotörü kaynaklı hücrel ve biyokimyasal olayları inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Katiyar ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasının amacı; antioksidan özellikleri bilinen ellajik asit ve silibinin fitokimyasallarının Ultraviyole A ve B radyasyonun zararlı etkilerini azaltma potansiyellerini araştırmaktır. Ellajik asit ve silibininin *Wistar* albino sıçanların derilerinde Ultraviyole A ve B'nin yol açtığı oksidan hasara karşı doku koruyucu ve biyokimyasal savunma etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ellajik asit ve silibinin maddelerinin *in vivo* dokudaki aktiviteleri hakkında biyokimyasal, histolojik, immunohistokimyasal ve stereolojik yöntemlerle literatüre yeni bilgiler sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Histolojisi

Deri, insan vücudunun tüm dış yüzeyini kaplar ve onu çevreleyen dünya ile etkileşimin ana bölgesidir. İç organları travmaya, ultraviyole (UV) radyasyona, aşırı sıcaklıklara, toksinlere ve bakterilere maruz kalmasını önleyen koruyucu bir bariyer görevi görür. Diğer önemli işlevleri arasında ise duyuşsal algı, immünolojik savunma, termoregülasyon ve sıvı kaybının kontrolü yer alır (Carlson, 2014).

2.1.1. Epidermis (üst deri)

Epidermis hiçbir kan damarı içermez ve dermoepidermal bileşkenin içinden difüzyon yoluyla besin iletimi ve oluşun atıkları uzaklaştırmak için alttaki dermise tamamen bağımlıdır. Epidermis, derinden daha yüzesel tabakalara kadar farklılaşmanın ilerleyen aşamalarında esasen keratinositlerden oluşun çok tabakalı, skuamöz bir epitelyumdur (Moore ve ark.,1998).

Epidermis dört tabakadan oluşmaktadır:

1. Bazal tabaka (Stratum (Str.) Germinativum)
2. Str. spinozum (Malpighi veya Prickle tabaka)
3. Granüler tabaka (Str. Granulozum)
4. Str. korneum (Keratinize veya Horny tabaka)

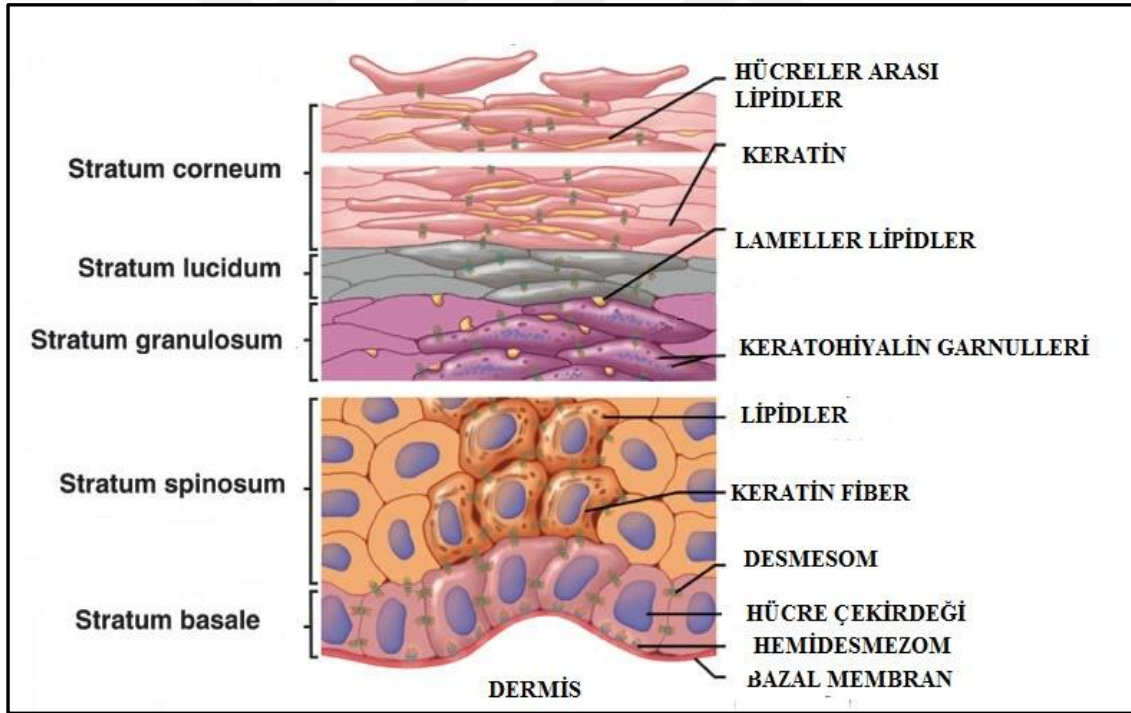
Str. bazale: Epidermisin en alt tabakası olup, tek katlı sıralı prizmatik hücreden oluşun katmandır. Çekirdekleri üst kutba yakın, büyük ve bazofiliktir. Mitotik aktivite yoğun olduğundan epidermisin diğer tabakalarını oluşturun bu tabaka Str. germinativum olarak da isimlendirilir. Bu hücrelerin bölünmesi sonucu meydana gelen keratinositler spinoz tabakayı oluşturur (Eşrefoğlu, 2016a).

Str. spinozum: Bu tabaka düzensiz kenarlı keratinositlerden oluşmaktadır. Hücreşel bölünme kapasiteleri sınırlıdır. Arada kemik iliğı kökenli immün sistem hücreleri olan Langerhans hücreleri bulunmaktadır. Epidermisin en büyük kısmını oluşturun bu tabakanın hücreleri arasında dezmozomlar bulunduğundan, bu yapılar

tahrip olduğunda keratinositler birbirlerinden ayrıldığı için bu süreç akantoliz olarak bilinir (Eşrefoğlu, 2016a).

Str. granülozum: Bu tabakadaki keratinositler keratohyalin granülleri içerir. Avuç içleri ve ayak tabanlarında, kaşınma ve sürtünmenin etkisiyle derinin kalınlaştığı bölgelerde granüler tabakanın üst kısmında soluk pembe renkte Str. lucidum tabakası yer almaktadır (Eşrefoğlu, 2016a).

Str. korneum: Str. corneum hücreleri epidermisin en büyük ve en bol bulunan tabakasıdır. Çekirdeklerini tamamen kaybetmiş, yassı ölü keratinositlerden oluşmaktadır. Kalınlığı vücudun farklı bölgelerine göre değişkenlik gösteren keratinositlerden meydana gelir. Cildi dış ortamdan koruyan birincil bariyerdir. Tabaka, lipitten yoğun yapıştırıcı bir ara madde yardımıyla birarada tutulur (Moore ve ark.,1998).



Şekil 1. Epidermisin tabakaları (Light ve Cooley, 2004)

Keratinositler (kerotinler): Str. germinativum veya bazal tabaka dermoepidermal bileşke için yüzeyseldir. Keratinositlerin bu tek hücre tabakası, hemidesmozomlar aracılığıyla bazal membrana bağlanır. Keratinositler bölündükçe ve farklılaştıkça, derin katmanlardan daha yüzeysel katmanlara geçerler. Str. corneum'a

ulaştıklarında, çekirdeksiz olan keratinositler tamamen farklılaşırlar. Bu hücreler canlılıklarını kaybederek keratinle dolarlar. Bu sürece keratinizasyon denir (Eşrefoğlu, 2016b). Epiderminin Str. korneum katmanı kimyasal maddelere ve mikroorganizmalara karşı fiziksel bir bariyerdir. Yüzeydeki asidik pH ve lipid tabakası da koruma görevine yardımcı olur. Keratinositler derinin bağışıklık fonksiyonunda önemli rollere sahiptirler. Alerjik kontakt dermatit gibi durumlarda immun yanıtı indüklediklerinden, TNF- α gibi çeşitli sitokinleri ve inflamatuvar mediyatörleri salgırlar (Lephart, 2016).

Ayrıca melanositler, bağışıklıkta görev alan Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de epidermiste yer alır (Moore ve ark.,1998).

Melanositler: Epiderminin pigment oluşturan hücreleridir. Nöral krest hücrelerinden köken alan melanositler, esasen güneşten radyant enerjiyi emen ve cildi UV radyasyonunun zararlı etkilerinden koruyan bir pigment olan melanin üretirler. Nöral krest kökenli oldukları için üreme yetenekleri yoktur. Melanin, melanozomu çevreleyen keratinositlere bağlayan dendritlerle çevrili melanozomlar olarak isimlendirilen organellerde birikir. Melanozomlar fagositoz yoluyla granüller halinde bitişik yer aldıkları keratinositlere transfer edilir. Melanositler, epiderminin bazal tabakasında olduğu kadar kıl folikülleri, retina, uveal trakt ve leptomeninkslerde de bulunur. Bu hücreler melanomun köken bölgesidir. Güneş ışınlarının ulaşmadığı deride yaklaşık 10 bazal hücre arasında 1-2 melanosit bulunur (Eşrefoğlu, 2016b). Yüz ve genital bölgede melanositler daha yoğundur. Deri rengindeki ırksal farklılıkların pigment granüllerinin (melanozomların) sayısı, büyüklüğü, şekli ve dağılımı ile yakından ilişkisi vardır. Koyu tenlilerde melanozomların sayısı fazla olup; daha büyük ve sitoplazmada tek tek serpilmiş halde bulunurlar. Hematoksilen-Eosin (H&E) ile boyanmış deri preparatlarında bazal tabakada berrak hücreler olarak görülürler. Bu renk dokunun fiksasyonu sırasında oluşmuş bir artefaktır. Dendritik yapıda bir hücre olan melanosit epidermis içinde uzak mesafelere ulaşarak, çok sayıda keratinosit (yaklaşık 36) ile bağlantı kurar. Keratinositler bu dendritlerin uçlarını fagositoz yaparak sitoplazmalarına alırlar. Keratinositlerdeki melanozomlar nukleus üzerinde şemsiye gibi yerleşerek DNA'yı UV ışınlarından korurlar. Güneşe maruz kalan bölgelerde, melanositlerin keratinositlere oranı yaklaşık 1: 4'tür. Güneş ışınlarına maruz kalmayan bölgelerde ise bu oran 1:30 kadar küçük olabilir. Mutlak sayıdaki melanozom sayısı

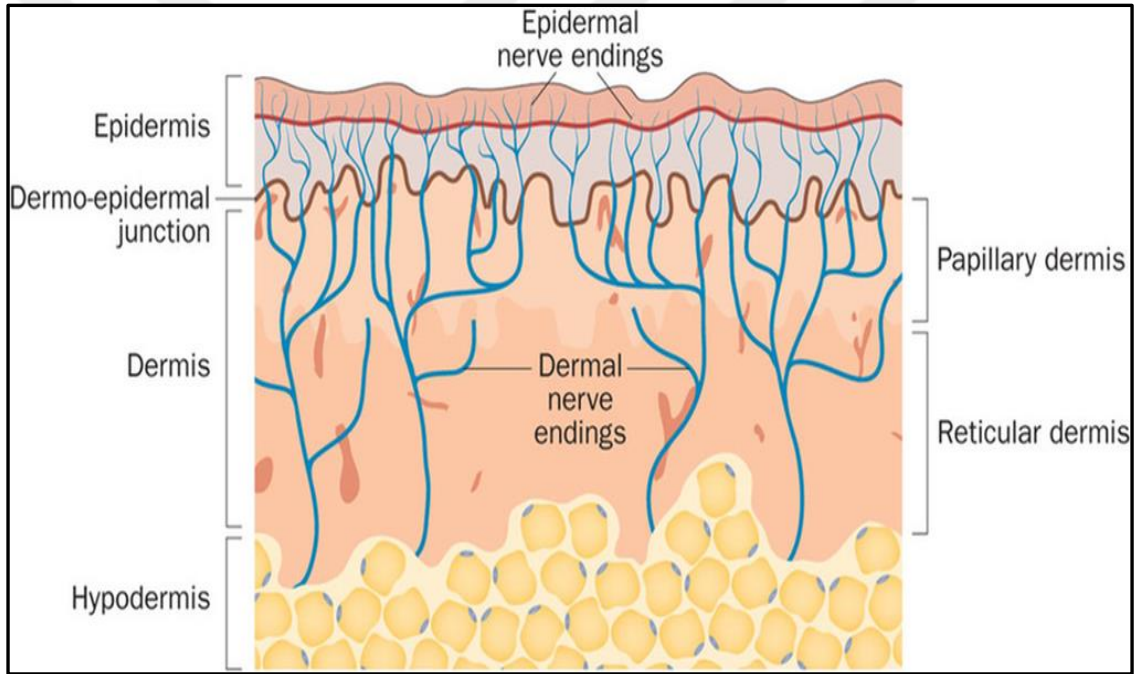
cinsiyet ve çeşitli ırklar arasında aynıdır. Bireyler arasındaki farklı pigmentasyon, hücre sayısından ziyade melanozom büyüklüğü ile ilişkilidir. Güneşe maruz kalma, melanosit uyarıcı hormon (MSH), adrenokortikotropik hormon (ACTH), östrojen ve progesteron hormonları melanin üretimini uyarır. Yaşlanma ile bir bireyin derisinde bulunan melanositlerin sayısında bir azalma görülür (Moore ve ark.,1998).

Langerhans hücreleri (LH): Langerhans hücreleri kemik iliğinden köken alır ve epidermisin bazal, spinöz ve granüler tabakalarında (%3-5) dağılmış halde bulunurlar. Antijen sunan hücreler olarak hizmet ederler. Başlıca afferent görevleri; antijeni tanımak, yakalamak, işlemek ve duyarlı T lenfositlere sunmaktır. Antijen sunan LH, lenf nodlarına göç ederler. Yabancı antijenleri yiyebilir, küçük peptit parçalarına dönüştürebilir, onları majör doku uyumsuzlukları ile bağlayabilir ve daha sonra bunları bağışıklık sisteminin aktivasyonu için lenfositlere sunabilirler. Bunun yanı sıra LH, kontakt dermatit, atopik dermatit, histiyositoz X, insan immün yetmezlik virüsü tip 1 ve deri greft reddinin patogeneğinde önemli olan çeşitli sitokinleri salgılar (Moore ve ark.,1998).

Merkel hücreleri: Nöral krest hücrelerinden köken alan merkel hücreleri, bazal tabakada bulunurlar. Bu hücreler nörosekretuar granüller içerdiklerinden, dokunma duyusunun algılanmasında görev aldıkları düşünülmektedir. Tırnakların, tırnak yataklarında, genital bölge ve cildin diğer bölgelerinde volar yönde bulunur. Bu hücreler hafif dokunuş algısında da gelişmiştir (Moore ve ark.,1998).

Derma-epidermal bileşke (DEB): Cildin epidermal ve dermal katmanlarını birleştiren doku alanı derma-epidermal bileşke olarak adlandırılır. Bu gözenekli taban zarı bölgesi, hücrelerin içinden sıvıların geçişini sağlar ve epidermise mekanik destek görevi görür. Dermal fibroblastlar ve bazal keratinositlerden oluşmuştur (Eşrefoğlu, 2016b).Bu yapı dört bileşene ayrılabilir; 1) Epidermisin Str. bazalındaki bazal hücreler, hemidesmozların perçin benzeri tutturma filamentleri ile bazal laminaya bağlanır, bu yapı gerilme ve makaslama kuvvetlerini epitelyumdan dağıtır. 2) Lamina lucida, 3) Bazal lamina veya bazal membran. 4) Subbasal lamina fibröz elementler. Dermisin dermal papilla tabakasının hücreleri, lifleri (kolajen VII) ve dermal mikrofibrilleri sabitleyerek bazal laminaya bağlar. Lamina lucida ve lamina densa olarak bilinen yoğun bir bölge, epidermisin bazal hücreleri tarafından sentezlenir ve esas olarak tip IV

kolajen ve aynı zamanda ankraj lifleri ve dermal mikrofibrilleri içerir. Lamina lucida daha incedir ve doğrudan epidermal keratinositlerin bazal tabakasının altında yer alır. Daha kalın lamina densa, alttaki dermis ile doğrudan temas halindedir. Bazal membran zonu, yarı geçirgen olduğundan, epidermis ile dermis arasında hücre ve sıvı geçişini sağlar. Epidermisle dermisi bir arada tutar. Mukozal yüzeyler epitel kökenli olduğundan keratinize değildir. Papiller dermisten gelen dermal papilla, deri yüzeyine dik olarak yönlendirilmiş kılcak damar ve lenfatik bir pleksus içerir. Bu parmak benzeri yapılar epidermisin diğer benzer oluşumlarıyla çevrilidir. Oldukça düzensiz olan bu bağlantı, oksijen, besin ve atık ürünlerin dermis ve avasküler epidermis arasında değiştirildiği yüzey alanını büyük ölçüde artırır (Moore ve ark.,1998).



Şekil 2. Dermoepidermal bağlantı (Epidermal - dermal nerve endings (Epidermal-dermal sinir sonlanmaları), Dermo-epidermal junction (Dermoepidermal bağlantı) (Moore ve ark.,1998)

2.1.2. Dermis (alt deri)

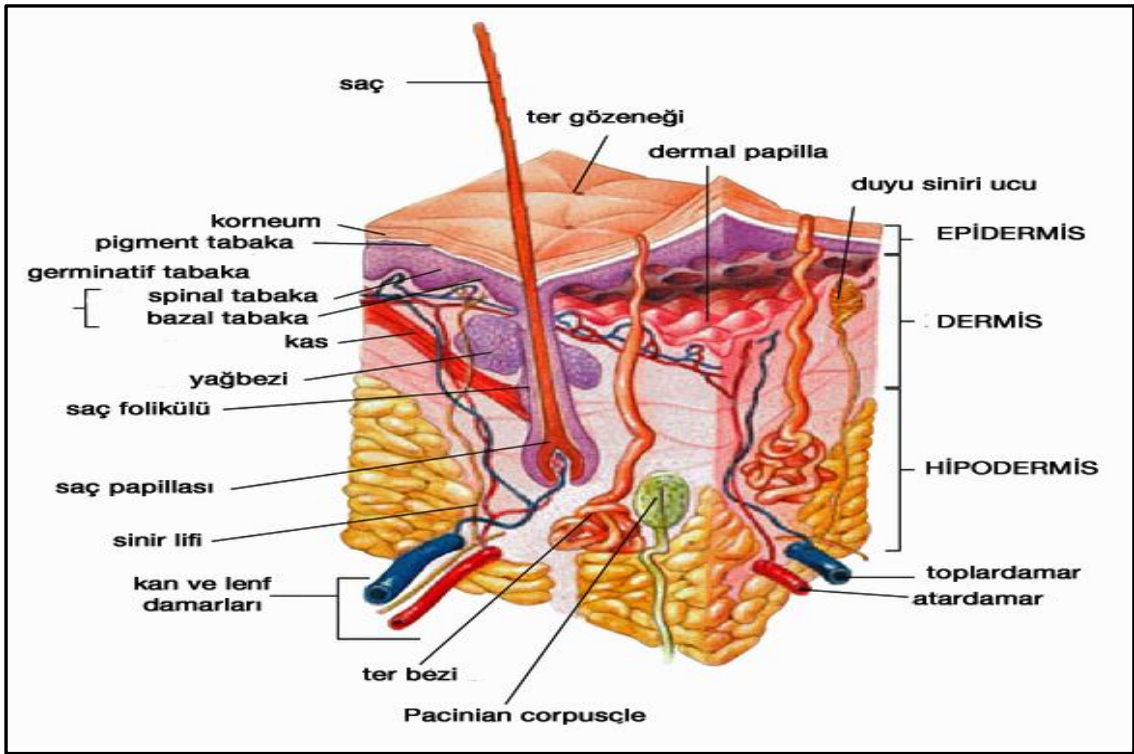
Dermis, cildin kalın, lifli ve elastik olan (çoğunlukla kolajen, elastin ve lifin) ikinci tabakası olup cilde esnekliğini ve gücünü verir. Epidermisi korur ve sinir uçlarını, ter bezlerini, yağ bezlerini, saç köklerini ve kan damarlarını içerir. Dermisin kalınlığı, anatomik konuma göre önemli ölçüde farklıdır ve ince yapı derinliğine bağlı olarak değişir. Dermis 2 katmana ayrılır; Papiller dermis (Str. papillare) ve Retiküler dermis

(Str. retiküler). Yüzeysel katman, epidermal rete sırtları ile dönüşümlü konik yapılar oluşturur, bu da iki tabaka arasında daha iyi yapışma sağlayan dermis ve epidermis arasındaki temas yüzey alanını artırır. Bu tabaka yani dermo-epidermal bileşke dik uzanan sıkı kollajen ve ince elastik lif demetlerinden oluşur. Sinir demetleri, dermisin nörovasküler demetlerinde büyük miktarlarda bulunur. Meissner'ın korpusları, dermal papillaların ucunda bulunan dokunmatik reseptörlerdir. Her bir korpus, her biri uzun bir çekirdeğe sahip bir dizi hücre katmanından oluşur ve içindeki nöron bu hücreler arasında sarılıdır. Korpuskül basınçla deforme olduğunda sinir uçları uyarılır. Vater-Pacini korpuskülü, titreşim basıncını ve dokunuşunu hissedilen derinin derin katmanlarında bulunan kapsüllenmiş reseptörlerdir ve bunlar sinir uçları ağrı, dokunma, basınç ve sıcaklık hissini algırlar. Cildin bazı bölgeleri diğerlerine göre daha fazla sinir ucu içerir, örneğin parmak uçları ve ayak parmakları birçok sinir içerir ve dokunmaya son derece duyarlıdır (Burns ve ark., 2004).

İnsanlarda iki tür ter bezi vardır: Ekrin ter bezleri, öncelikle vücut ısısının düzenlenmesinde görevlidir ve çoğunlukla ayak tabanlarında bulunur. Bu ter bezleri, epidermisten aşağı doğru büyüyen epitelyal hücreler grubudur. Proksimal sarmal salgı kanalı, alt dermiste düz tübüler yapı ve deriye açılan intraepidermal spiral kanal üç ana bileşenidir. Bu bezler, su, tuz ve diğer kimyasallardan oluşan ısı ve strese yanıt olarak ter üretirler. Ter deriden buharlaştıkça, vücudun serinlenmesine yardımcı olur. Ter bezi, glikojenden zengin, şeffaf salgı hücreleri, koyu mukoid hücreler ve kasılma özelliklerinde uzmanlaşmış miyoepitelyal hücrelerden oluşur. Apokrin ter bezleri, koltukaltlarında ve genital bölgede bulunan özel ter bezleridir. Karakteristik vücut kokusu üreten kalın ve yağlı bir ter salgırlar. Apokrin bezleri bazal salgı kanalları tamamen subkutanöz yağda bulunur ve doğrudan cilt yüzeyine açılmaz. Bundan dolayı bu salgının tam kimyasal bileşimi bilinmemektedir (Burns ve ark., 2004).

Yağ bezleri saç köklerine 'sebum' adı verilen yağlı veya mumsu bir madde salgırlar. Sebum, cildi nemli ve yumuşak tutar. Yabancı maddelere karşı bir bariyer görevi görmesinin yanı sıra cildi yağlar ve su geçirmez hale getirir. El ve ayak tabanları hariç yüz ve kafa derisi başta olmak üzere cildin tüm bölgelerinde önemli miktarda yağ bezleri bulunur. Foliküller vücutta bulunan çeşitli saç tiplerini üretir. Vücut üzerinde kıl foliküllerinin sayısı ve dağılımı fetal gelişim sırasında düzenlenir ve doğumdan sonra

ilave foliküller eklenir. Saç, kişinin görünüşüne katkıda bulunur, aynı zamanda vücut sıcaklığının düzenlenmesi, yaralanmalardan korunma ve duyu arttırımı gibi bir dizi önemli fiziksel rollere sahiptir. Ayrıca folikülün bir kısmı hasarlı bir epidermisi rejenere edebilen kök hücreleri de içerir. Cilde besinler dermisin kan damarları tarafından sağlanır. Kan damarları ayrıca sıcak hava koşullarında dilatasyon yoluyla vücut sıcaklığını düzenler, böylece ısı yayılabildiği deri yüzeyinin yakınında dolaşacak büyük miktarda kan akışını kolaylaştırır. Soğuk hava şartlarında ise kan damarları vücut ısını koruyarak, daralmaktadır (Burns ve ark., 2004).



Şekil 3. Dermis ve ekleri (Arda ve ark., 2014)

Fibroblast, dermisin başlıca hücre tipidir. Bu hücreler prokollajen ve elastik lifler üretir ve salgılarlar. Prokollajen, proteolitik enzimler tarafından kümelenecek kesişen ve çapraz bağlanan terminallere bölünür. Bu sıkı çapraz bağlanmış kollajen lifleri, kesme ve diğer mekanik kuvvetlere karşı çekme mukavemeti sağlar. Kollajen dermisin ağırlığının %70' ini oluşturur (Tip I (toplam kollajenin% 85'i) ve Tip III (toplam kollajenin% 15'i). Elastik lifler dermisin ağırlığının % 1'inden azını oluşturur, ancak deformasyona karşı direnerek ve cildi dinlenme şekline geri döndürerek fonksiyonel rol oynarlar (Burns ve ark., 2004).

Epidermal uzantılar, bölünme ve farklılaşma potansiyeli olan epitelyal hücrelerle kaplı intradermal epitelyal yapılardır. Bu yapılar epitelyal hücrelerin kaynağı olarak epidermin yanıklar, sıyrıklar ve bölünmüş kalınlıkta deri grefti toplanması durumlarında kaldırılması veya yok edilmesi gerektiğinde, reepitelizasyonun gerçekleştirilmesi için önemlidir (Burns ve ark., 2004). Epidermal uzantılar şunları içermektedir: Yağ, ter, apokrin ve meme bezleri.

Saç kökleri genellikle dermin altındaki deri altı tabakasında bulunurlar. Bu da yüzün en derin kutanöz yaraları bile tekrar yenileme yeteneğini açıklar.

Apokrin ve meme bezleri: Apokrin bezler yapı bakımından ekrin bezlerine benzerdir, ancak aynı değildir. Bunlar aksillada, anogenital bölgede ve modifiye salgı bezleri olarak, dış kulak kanalında (serum in bezleri), göz kapağında (Moll bezleri) ve memede (meme bezleri) bulunur. Koku üretirler ve ergenlikten önce işlev görmezler. Meme bezi ise modifiye ve yapısal olarak gelişmiş bir tür apokrin bezdir (Poblet ve ark., 2004).

Saç folikülleri: Epidermis ve dermis tarafından oluşturulan kompleks yapılardır. Ayak tabanı, avuç içi, glans penis, klitoris, labia minora, mukokutanöz bağlantı ve parmak ve ayak parmaklarının bölümleri hariç, vücudun tüm yüzeyinde bulunurlar. Yağ bezleri genellikle deri yüzeyinden direkt saç folikülüne açılır ve tüm komplekse pilosebace ünite olarak adlandırılır (Poblet ve ark., 2004).

2.1.3. Hipodermis (Subkutanöz yağ)

En alttaki deri tabakası deri altı yağ tabakasıdır ve aynı zamanda 'cildin altında' anlamına gelen 'hipodermis' olarak da adlandırılır. Gevşek bağ dokusu temel olarak % 50 oranında yağ hücreleri (adipositler), fibroblastlar, kan damarları, sinir hücreleri, makrofajlar ve kolajenden oluşur. Septa adı verilen özel bir bağlantı dokusu ile kas ve kemik dermisi olarak vücutta önemli bir rol oynar. Hipodermis vücut sıcaklığının düzenlenmesini kontrol eder. Fazla vücut ısısı, buharlaşma yoluyla soğumaya yardımcı olan vazodilatasyon ve terleme ile kontrol edilir. Aşırı soğukta vücut sıcaklığı, vazokonstriksiyon ve doğrudan ısı enerjisine termojenez ile dönüştürülerek kontrol edilir. Kahverengi yağ dokusu, protonların adenosin trifosfatın sentezinden

mitokondriyal gradyanından aşağı doğru hareket etmesini sağlayan ve böylece enerjinin ısı olarak dağılmasına izin veren eşsiz bir proteine (termogenin olarak da bilinen ayrılmış protein-1) sahiptir. Kahverengi yağdaki bir hücre çekirdeği proteini olan Rev-Erb- α , vücut sıcaklığını kontrol etmek için bir odak noktası görevi görür ve ortamdaki beklenmedik değişikliklerin çevresel isteklerine cevap vermek için uyum sağlarken, temel vücut sıcaklığı ritmini oluşturmak ve sürdürmek için gereklidir. Deri altı yağ tabakası ayrıca, kasları ve kemikleri çarpma ve düşmelerden koruyan koruyucu bir bariyer olarak işlev gören bir depodur; bir enerji deposu ve bir endokrin organ olarak kabul edilir. Yağ hücreleri veya lipositler ayrıca vücut ağırlığını hipotalamus yoluyla düzenleyen leptin adı verilen bir hormon üretirler (Prost, 2006).

2.1.4. Derinin işlevleri

Genel olarak, derinin işlevleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Kierszenbaum ve Tres, 2012).

- Vücudun mekanik, termal, fiziksel hasara ve zararlı maddelere karşı koruyucu bir bariyeri olarak hareket eder.
- Nem kaybını önler (dehidrasyon).
- Güneşten gelen UV radyasyonunun zararlı etkilerine karşı korur.
- Duyusal bir organ görevi görür.
- Sıcaklık kontrolünü düzenler.
- İmmünolojik sürveyansta önemli bir rol oynar.
- D3 vitamini sentezler. (Deride bulunan 7-dehidrokolesterol, deri üzerine düşer (dik açıyla gelen gün ışığı ile) ultraviyole ışığı ile reaksiyona girdiğinde D3 vitamini yapılır; Str. basale ve Str. spinosumda üretilmektedir.
- Deride mikroorganizmaların yıkımı ve vücudun bağışıklık sistemi ile etkileşimi, Langerhans hücreleri, fagositik hücreler ve epidermal dentritik hücreler tarafından gerçekleştirilir (Kierszenbaum ve Tres, 2012).

2.1.5. Deri embriyolojisi

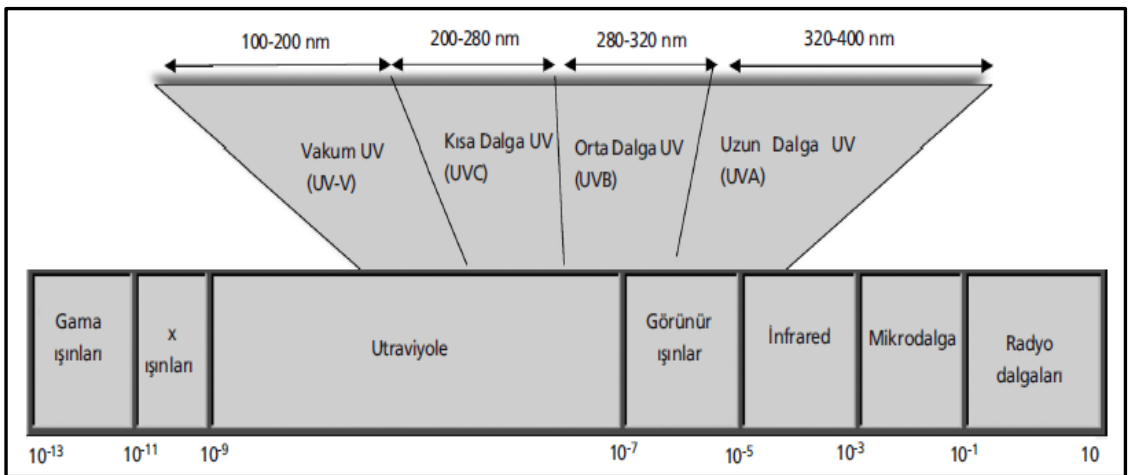
Deri iki yönlü bir kökene sahiptir: yüzeysel bir tabaka olan epidermis (E), yüzey ektoderminden gelişir. Derin bir tabaka olan dermis (D) ise mezenşimden gelişir (Sadler, 2012).

Epidermisin gelişimi: İkinci ayın başlangıcında bu epitel bölünmeye başlar ve yassılaştan hücreler, periderm veya epitrikyum tabakası halinde yüzeyde bırakılır. Bazal tabakadaki hücrelerin çoğalmasıyla, üçüncü bir ara bölge (gelecekteki spinal tabaka) oluşturulur. Dördüncü ayın sonunda, epidermis son düzenlemesini kazanır ve dört katman ayırt edilebilir (germinatif, spinöz, granül ve keratinize). Bazal (germinatif) tabaka yeni hücrelerin üretiminden sorumludur. Bu tabaka daha sonra parmak izi içinde cildin yüzeyine yansıyan sırtlar ve oyuklar oluşturur. Kalın bir spinöz tabaka, ince tonofibrilleri içeren büyük polihedral hücrelerden oluşur. Granüler tabaka, hücrelerinde küçük keratohyalin granülleri içerir. Epidermisin sert yüzeyini oluşturan keratinize tabaka, keratin yüklü, sıkıca paketlenmiş ölü hücrelerden oluşur. Periderm hücreler genellikle intrauterin yaşamın ikinci kısmında dökülür ve amniyotik sıvıda bulunabilir. Gelişimin ilk 3 ayında, epidermis nöral krestten köken alan hücreler tarafından işgal edilir. Bu hücreler, dendritik süreçlerle epidermisin diğer hücrelerine aktarılabilen melanin pigmentini sentezler. Doğumdan sonra, bu melanositler cildin pigmentasyonunu sağlar (Sadler, 2012).

Dermisin gelişimi: Dermis, lateral plak mezoderminden ve somitlerdeki dermatomlardan köken alır. 3. ve 4. aylarda koryum epidermise doğru ilerleyen dermal papilla ve birçok düzensiz papiller yapıyı oluşturur. Bu papillaların çoğu küçük bir kılcak veya duyuşal sinir uç organı içerir. Dermisin daha derin tabakası olan subkoryum, büyük miktarda yağ dokusu içerir. Doğumda cilt, yağ bezlerinden salgılanan ve dejenerasyona uğramış epidermal hücreler ve tüyler tarafından oluşturulan beyazımsı bir macun olan vernix caseosa tarafından kaplanır. Vernix caseosa cildi amniyon sıvısının maserasyon etkisine karşı korur (Carlson, 2014).

2.2. Ultraviöle Radyasyon

100 nm'den daha uzun dalga boyları, noniyonize radyasyon olarak tanımlanır. Çünkü bu fotonların enerjisi, çözelti içindeki atomların iyonizasyonu için yetersizdir. UVR, elektromanyetik radyasyonun (ER) küçük bir kısmını kapsar. Diğer bölgeler, radyo dalgaları, mikrodalgalar, infrared, görünür ışık, X ray, UVA radyasyondur. Her bir UV bölümünde, radyasyonun biyolojik etkileri dalga boyuna göre değişir. Bunun için UV spektrumu 3 bölgeye ayrılmıştır. Farklı disiplinlerce farklı sınırlandırmalar mevcut olup, dalga boyları arasında aslında keskin bir sınır yoktur. Bazı otörler UVA ile UVB arasındaki sınırı 320 nm, bazıları ise 315 nm'yi kabul eder. Bu nedenle bandlar arasında bir "üst üste gelme" den bahsedilebilir. Dermatologlar ve çevre bilimciler göre UVA 400-320, UVB 320-290 ve UVC 290-200 nm olarak ifade edilir (Kavak ve Gürlevik, 2010). ER, güneşten kaynaklanan ya da yapay olarak elde edilen bir enerji türüdür. UVR ise elektromanyetik spektrumun X ışınları ile görünür alan arasındaki bölümdür. Yeryüzündeki UVR'un niteliği ve niceliği güneşin yükselmesi, ışınların atmosferdeki moleküller, özellikle ozon tabakasında ve bulutlar tarafından absorbe edilmesi veya saçılması gibi faktörlerle değişir. UVR, yeryüzündeki güneş ışığının yaklaşık %5'i olup, fotobiyolojinin çoğunlukla ilgi alanıdır. Güncel kullarımdaki UV ışığı (UVL, ultraviölet light) yanlış bir terimdir. 'Işık' terimi, 400-700 nm'deki retina'ya ulaşan ve "görme" duygusu ile sonlanan dalga boyu için tercih edilir. Doğru terim, UV radyasyondur (Kavak ve Gürlevik, 2010).



Şekil 4. Ultraviöle dalga boyları (Kavak ve Gürlevik, 2010)

UVA (320-400 nm) : UVR'un en uzun ve UVB'den daha az biyolojik aktif dalga boyuna sahiptir. Çoğunlukla pigmentasyondan, daha az eritemden sorumludur. "Uzun dalga UV" ya da görünür ışığa yakın olduğu için "yakın UV radyasyon", gözle görülmediği için de "siyah ışık" olarak isimlendirilir. Atmosferik ozon, UVA'nın çok küçük bir kısmını absorbe eder. UVA-1 (340-400 nm) ve UVA-2 (320-340 nm) olmak üzere 2 tipi vardır. Bunun nedeni, DNA ve diğer moleküllerde farklı fotokimyasal reaksiyonları indüklemesidir. UVA-1 oksijene bağımlı fotokimyasal tepkimeleri indüklerken, UVA-2 ise DNA tarafından direkt absorpsiyonla UVB tipi fotokimyasal reaksiyonu indükler (Kavak ve Gürlevik, 2010).

UVB (290-320 nm): UV radyasyonun en aktif dalga boyu olup, temel olarak eritemden sorumludur. "Orta dalga UV" ya da "güneş yanığı UV radyasyonu" olarak da bilinmektedir. UVB deri kanserine neden olan radyasyondur. Çoğunluğu ozon tarafından engellenir (Kavak ve Gürlevik, 2010).

UVC (200-290 nm) : Atmosferde ozon ve su buharı tarafından filtre edildiği için dünyaya ulaşmayan ışınlardır. UVR'un en kısa dalga boyu olduğu için "kısa dalga UV", sterilizasyonda ve mikroorganizmaları öldürmek için kullanıldığından "germisidal ışın" olarak da isimlendirilir (Kavak ve Gürlevik, 2010).

Gözle görülebilen radyasyon için ışık terimi daha uygun bir adlandırma iken, diğer dalga boyları için radyasyon daha doğru bir terimdir. Görünür ışık 400-760 nm olarak kabul edilmektedir. Solar radyasyon, fototerapideki UVB ve fotokemoterapideki UVA radyasyonun kaynağı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır (Diffey, 2002).

2.3. UV Radyasyonun Deri Üzerindeki Etkileri

UVA derinin daha derin tabakası olan dermise kadar penetre olur. Dermiste bulunan elastik lifler, prematüre fotoyaşlanması, fototoksik ve fotoallerjik reaksiyonlar ve deri kanseri oluşumundan sorumludurlar. Reaksiyon şiddeti deride önceden mevcut olan melanin pigmenti miktarına ve UVA ışınımının dozuna bağlıdır. UVA'ya bağlı eritem ışınımına maruz kalındıktan hemen sonra ortaya çıkar. Yoğunluğu 10-12 saat sonra optimal düzeydedir ve kızarıklık 24 saate kadar devam edebilir. UVA'nın eritemojenik

veya güneş yanığı oluşturma kapasitesi UVB 'ye göre 600 ile 1000 kat daha düşüktür (Kiremitçi, 2005).

Güneş yanığından asıl sorumlu olan ve deride melanin pigment sentezini stimüle etmekte en etkili banttır. Ciltte serbest radikal oluşumunu artırır, oksidatif reaksiyonla da hücre ve dokuların yıkılması sonucu ağrı ve enflamasyon ortaya çıkar. UVB 'nin deri kanseri ve fotoyaşlanma şeklinde ortaya çıkan uzun vadeli yan etkileri iyi bilinmektedir. Hem UVA hem de UVB eritemojenik ve melanojenik olmasına karşın bu etkileri oluşturmak için gerekli UVB miktarı UVA'ya göre 600 ila 1000 kat daha azdır. Ancak yeryüzüne ulaşan UVA miktarının UVB 'den 10-20 kat fazla olduğu göz önüne alındığında UVA'nın da uzun vadeli kümülatif etkilerinin UVB kadar önemli olabileceği söylenebilir. Fototoksik ve fotoallerjik reaksiyonlardan UVB genellikle sorumlu değildir. İlaçlara bağlı kutanöz fotosensitizasyon reaksiyonlarından asıl sorumlu olan UVA'dır. Bu nedenle hem UVA hem de UVB'nin akut ve gecikmiş zararlı etkilerine karşı mutlaka korunulmalıdır (Kiremitçi, 2005).

UVC'nin ise dokuda hasar yapıcı etkisi vardır (Karsinojenik bant). Ozon tabakası tarafından tamamen absorbe olması ve yeryüzüne çok az ya da hiç ulaşmaması gerekir. Ozon tabakasında oluşan incelme ve yer yer delinmeler nedeniyle son zamanlarda önem kazanmıştır. Yapay kaynaklardan yayılan UVC'nin normal deride eritem dozu 25 cm mesafeden 30 saniyedir. Eritemden sonra hiç pigmentasyon oluşmadan ağır yanıklar görülür. UVC radyasyonuna maruz kalıldıktan birkaç saniye sonra ağrılı konjunktivit gelişir (Kiremitçi, 2005).

Tablo 1. Derinin UVR'na cevabı (Kiremitçi, 2005)

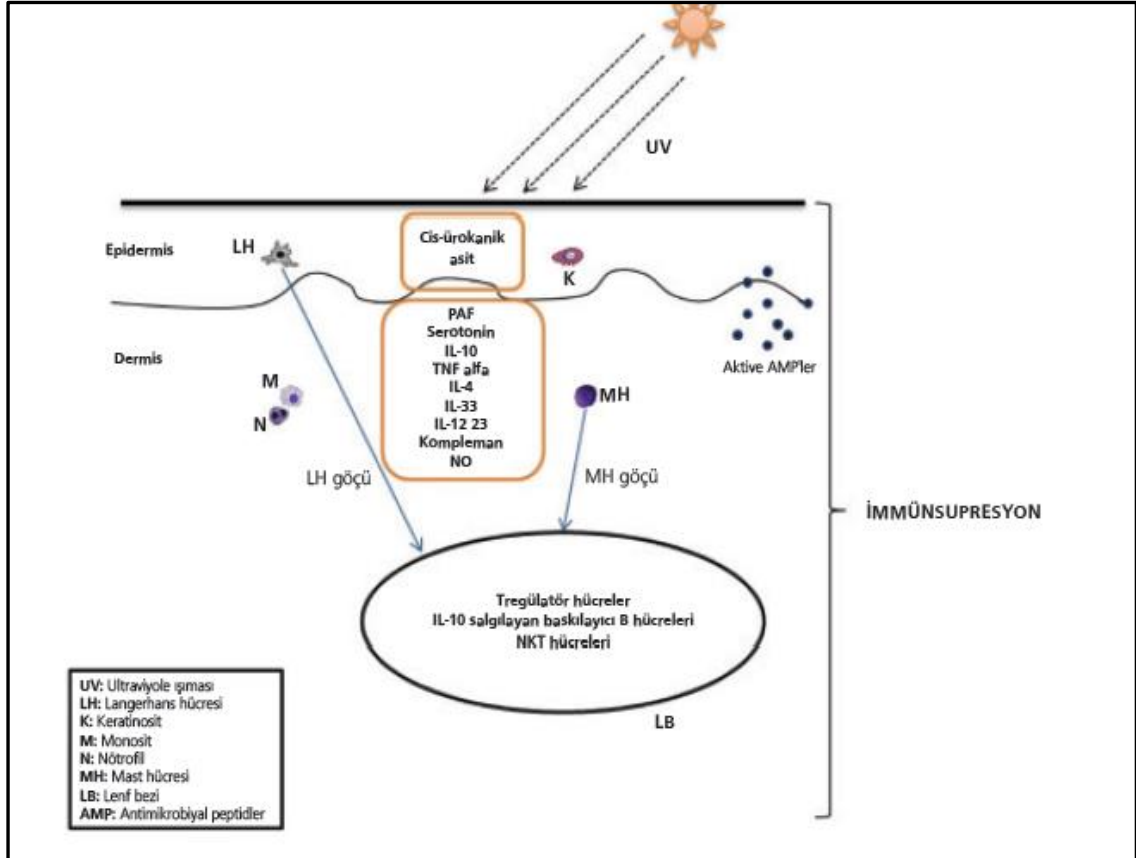
UVR bandı	Güneş Yanığına Cevap	Pigmentasyon	Yaşlanma	Karsinojenik Etki
UVA 320-400	Zayıf eritem, açık kırmızı renk	Orta-yüksek	Hafif-Orta	Etkisiz
UVB 290-320	Güçlü eritem, pembe kırmızı renk	Çok güçlü	Güçlü	Güçlü
UVC 200-290	Orta eritem, pembe renk	Zayıf	Etkisiz	Orta -Yüksek

Özellikle 280- 320 nm dalga boyunda ultraviyole ışınmasına (UV) maruz kalmak hem spesifik hem de nonspesifik immün yanıtları etkileyebilir. Langerhans hücreleri, T regülatör hücreler, aktif B hücreleri, mast hücreleri, NKT hücreleri ve cis-ürokanik asit, serotonin, platelet aktive edici faktör (PAF) ve nitrik oksit (NO) gibi bazı mediatörlerin UV'ye bağlı immüsupresyonun uyarılmasında önemli bir rol oynadıkları görülmektedir. UV ile uyarılan immüsupresyon deride antijenik uyarıları engelleyebilir ve dengeli bir apoptozis ve DNA onarımına ortam hazırlayabilir (Akyol ve Hayta, 2013).

Kromoforlar (fotoreseptörler) deride UVR'yi absorbe eden moleküllerdir ve karakteristik absorpsiyon spektrumları vardır. Deride aromatik aminoasitler, ürokanik asit, lipidler, nükleik asitler, melanin ve bunların prekürsörleri UV ışınmasını absorbe edebilirler. Solar ışımaya maruz kalındığında fotokimyasal değişikliklere neden olan kromoforlar deride biyolojik bir dozimetre özelliği taşırlar. Örneğin; 260 nm dalga boyunda ışımaya yalnızca suprabazal hücre tabakalarında hasar oluşturur. Oysa sadece %3'ü bazal tabakaya ulaşabilen 300 nm dalga boyunda ışımaya ise epidermin tüm tabakalarına hasar vermektedir. Çünkü 260 nm dalga boyundaki ışımaya DNA ve ürokanik asit tarafından kolayca absorbe edilir. Fotonların absorpsiyonundan sonra kimyasal reaksiyonları tetikleyecek şekilde uyarılmış bir durum ortaya çıkar ki bunlar spesifik fotoürünlere (örneğin; DNA primidin dimer ve okside membran lipidleri) dönüşür. Fotoürünler protein sentezine yol açan fosforilasyon, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon faktör aktivasyonu gibi olaylar kaskadını çalıştırır ve inflamasyon (güneş yanığı), melanogenezis (bronzlaşma), karsinogenezis ya da otoimmüniteyle sonuçlanan apoptozis, mitoz, diferansiyasyon ya da transformasyon gibi hücrel değişiklikler gelişir (Leitenberger ve ark., 2007; Young, 1997).

Langerhans hücreleri (LH) antijen sunumundan sorumludurlar. LH, deride UV ışınmasını takiben morfolojik, immünofenotipik ve migratuvar değişiklikler gösterirler. UV ışınması olunca epidermisten hızla bölgesel lenf bezlerine göç eden LH'de fonksiyonel değişiklikler de olur (Leitenberger ve ark., 2007). Yapılan diğer bir çalışmada ise UVB'ye bağlı immüsupresyonda IL-10 üreten ve OX40L eksprese eden LH'nin antijen spesifik regülatör T hücrelerinin uyarılması açısından zorunlu olduğunu bildirmişlerdir (Yoshiki ve ark., 2010).

Mast hücreleri sitokinler ve diğer immünmodülatör faktörleri salgılamak yoluyla kazanılmış immün yanıtları düzenleyebilirler. Mast hücrelerinin alerjik yanıtlardaki rolleri çok iyi bilinmekle beraber, UV ışınmasına maruz kalmamış insan derisinde mast hücre yoğunluğu melanoma ve bazal hücreli karsinom riskiyle pozitif korelasyon gösterirken UV'ye maruz kalmış deride ise antitümör etkinlikleri gösterilmiştir (Sarchio ve ark., 2012; Ribatti ve ark., 2003; Grimbaldston ve ark., 2003).



Şekil 5. UV'ye bağlı immünsupresyon molekülleri (Akyol ve Hayta, 2013)

UVB ışınması, epidermiste immünolojik moleküller eksprese etmeleri açısından keratinositleri de etkilemektedir. Keratinosit kültüründe UV ışınmasını takiben sitokinlerin, nöropeptidlerin ve prostanooidlerin salgılandığı gösterilmiştir (Matz, 2007). UVB ışınması, keratinositler tarafından C3 üretimini aktive edebilir ve UVB'ye bağlı immünsupresyon için C3 gereklidir (Matz, 2007).

2.3.1. UV'nin göz üzerindeki etkileri

Young (1994) 'a göre, güneş ışığının göze verdiği zararlı etkiler aşağıdaki gibi özetlenebilir: Güneş ışığına bağlı tüm göz rahatsızlıklarının temel nedeni oksijen ve ısı ile birlikte UV ışınımıdır. UV radyasyonu oksidasyon sonucu ısı tarafından üretilerek kademeli olarak doğal yapıya zarar verir. Sonucunda anormal görme bozukluğuna ulaşılır ve fotokeratit gibi bazı göz hastalıkları ortaya çıkar. Fotokeratit, akut ve birkaç saat güneşe maruz kaldıktan sonra oluşabilir, ancak çoğunluğu kroniktir ve güneşe maruz kaldıktan yıllar sonra ortaya çıkar. Bunun yanında pterijium, katarakt, retinal yaşlanma, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve bazal hücreli karsinom gibi cilt kanserleri de görülmektedir (Deda ve Atmaca, 2001).

Hayvan modellerinde, insanlarda benzer bir hasar doğrudan oluşturulamaz; çünkü hayvan ve insan gözlerinin özellikleri birbirinden farklıdır. Örneğin, korneada UV maruziyetinde UV ışınım potansiyelinde farklılık görülür, ancak kemirgen kornea UV'yi sadece 300 nm'nin altında absorbe eder. Bu sınırlılıklarına rağmen, aynı yöne işaret eden hayvan çalışmaları ve insan epidemiyolojik çalışmaları, yeterince güvenilir korelasyonlar için güçlü bir temel oluşturur. Kromoforlar, DNA'da bol miktarda bulunduğu için mutageneze duyarlı hale gelirler. UVR'nin göz yapılarında bir diğer zararı ise DNA ile etkileşime girerek kornea veya lens hücreleri gibi germinal epitelyal hücrelere zarar vermektir (Behar-Cohen ve ark., 2014 ; Krutman ve ark., 2014).

2.3.2. UVR'nun eritem oluşumuna etkileri

Eritem, UVR'a vasküler yanıtın bir yansımasıdır ve genellikle bifaziktir. Hemen oluşan eritem hafif bir kızarıklık şeklindedir, UVR'den hemen sonra başlar ve yaklaşık 30 dakika sonra solarak kaybolur. Gecikmiş eritem ise 2-6 saat bir bekleme aralığı sonrası ortaya çıkar, 12-16 saatte en yüksek düzeye ulaşır ve birkaç günde geçer. Her iki faza, artmış vasküler permeabilite eşlik eder (Morison, 2005).

Eritemin oluşmasında rol oynayan bazı faktörler şöyle sıralanabilir (Diffey, 2002).

- Dalga boyu
- Doz

- Bireysel duyarlılık
- Radyasyona önceki maruziyet
- Vücut bölgesi
- Alan büyüklüğü

2.3.3. UVR pigmentasyona etkileri

Derinin doğal rengi, en iyi güneşe maruz kalmayan gluteal bölgeden belirlenir. UVR'dan kaynaklanan pigmentasyon, fakültatif bir pigmentasyon olarak tanımlanır. UVR'a melanositlerin yanıtı bifaziktir. Mevcut pigmentasyonu olan bireylerde UVA ile ani pigment koyulaşması görülür. Birkaç dakikada ortaya çıkar, bir saat içinde solar. Gecikmiş pigmentasyon, bronzlaşma, yeni melanin üretimini içerir ve günler içerisinde oluşup, haftalar ve aylar sonra kaybolur (Diffey, 2002). Pigmentasyon gelişiminde etkili faktörler şöyle sıralanabilir:

- Dalga boyu
- Pigmentasyon
- Yaş
- Deri kalınlığı

2.3.4. UVR'nin yararları

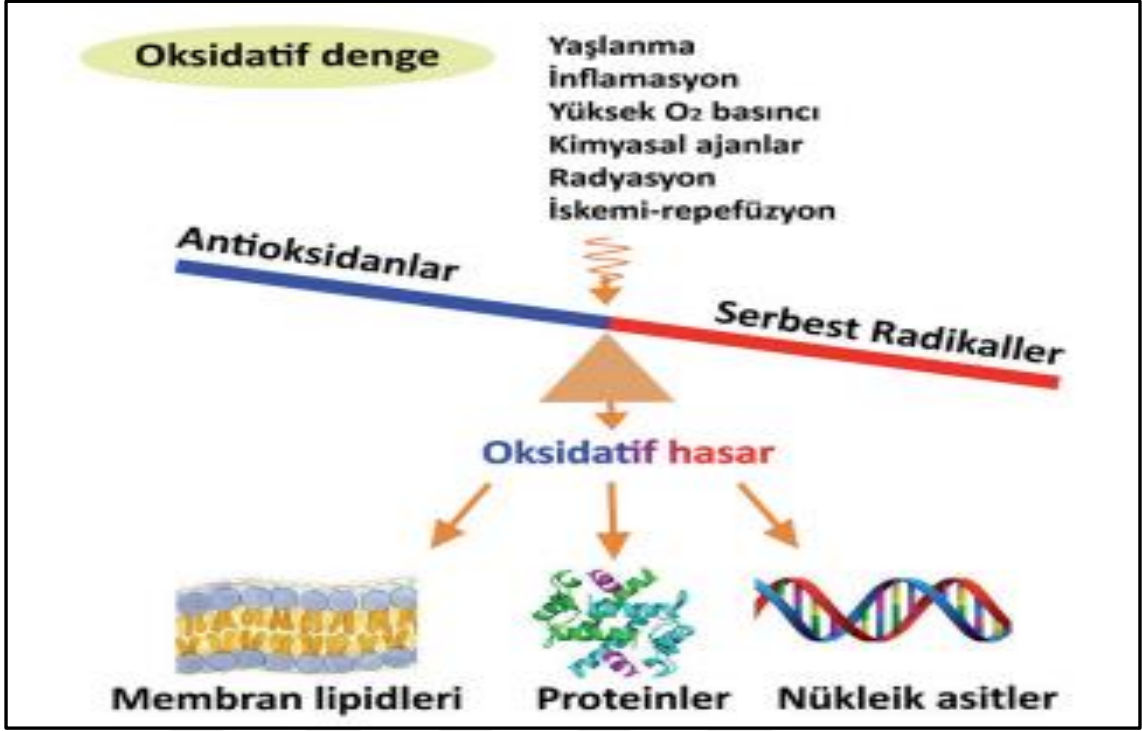
İnsanlar için güneşin yararları yıllardır bilinmektedir ve cildin güneş ışığına maruziyeti sonucunda üretilen D vitamini, önemli bir vitamindir. Yapılan araştırmalar, bugün D vitamininin kanser, kalp hastalıkları, kırıklar ve düşme, otoimmün hastalıklar, grip, Tip-1 ve Tip-2 diyabet ve depresyonu önleyici işlevleri olduğunu desteklemektedir. Klinik araştırmalar birçok hastalık üzerinde güneş ışığının olası etkilerinden bahsetmektedir. Güneşe verilen fizyolojik tepki, D vitamini üretiminin çok ötesindedir. Deri UV radyasyon ile uyarıldığında nitrik oksit salgılamakta, vazodilatasyon gerçekleşmekte ve kan basıncı düşmektedir. Yapılan diğer bir araştırmada ise UVA'ya aktif maruziyet devam ettiği süre zarfında diyastolik kan basıncının yaklaşık olarak 5 mmHg düştüğü ve maruziyetten 30 dk sonrasında kadar düşük seviyede kaldığı görülmüştür. UVB maruziyeti sonucunda insan cildi beta-endorfin üretmektedir. Bu opioid peptitlerin, iyi olma halini destekleyici, immun sistemi güçlendirici, ağrıyı

azaltıcı, relaksasyonu destekleyici, yara iyileşmesini hızlandırıcı etkileri vardır. Göz ile alınan ışık sinyalleri, sirkadiyen ritmin kontrolü için melatonin ve serotonin üretimini düzenlemekte ve mevsimsel duygu-durum bozukluğu görülme olasılığının azalmasında rol oynadığı bilinmektedir (Baggerly ve ark., 2015; Yang, 2011; Liu ve ark., 2014; Sprouse-Blum ve ark., 2010).

2.4. Serbest Radikaller

Oksijen yaşamın devam etmesi için vazgeçilmez bir elementtir. Oksijen, enerji üretiminde kullanıldığında, hem reaktif oksijen türlerinin hem de reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikaller vücudun normal oksijen kullanımı sırasında mitokondri tarafından devamlı, birçok endojen ve eksojen kaynaktan da üretilmektedir. Enerji üretiminde oluşan bu serbest radikaller lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişiklik meydana getirebilir. Üretilen bu serbest radikallerin hem zararları hem de yararları vardır (Shinde ve ark., 2012).

ROS'lar organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam ömürleri çok kısa olmalarına rağmen yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır (Shinde ve ark., 2012).



Şekil 6. Antioksidan-serbest radikal dengesi (Özcan ve ark., 2015)

2.4.1. Serbest radikallerin canlı sistemlere etkileri

Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron taşıma sistemlerinde (sitokrom p450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar esnasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Yapılan çalışmalarda insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikalın saldırısına uğradığı belirtilmektedir (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller nötralizasyona uğramazlarsa, hücre zarı proteinlerini ve lipidlerini yıkarak hücre zarını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellerler. Nükleustaki nükleik asite (DNA'ya) etki ederek DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirirler. İmmun sistem hücrelerini yok ederek, bu sistemin işlevlerini zorlaştırırlar. Yaşlanma ve kansere sebep olabilirler (Akkuş, 1995; Aydoğan ve ark., 2007). Hücre zarında bol miktarda doymamış yağ asidi bulunduğundan serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (Valko ve ark., 2007). Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton kopararak "Lipid peroksidasyon" olarak adlandırılan reaksiyonun başlamasına sebep olurlar. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksitler, alkoller,

aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin birçok bileşeniyle reaksiyona girerek hücrel ve metabolik olaylar üzerinde toksik etki yaratırlar (Köse ve Doğan, 1992). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olarak iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücre yüzey belirleyicilerin bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu işlevinden dolayı MDA, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Köse ve Doğan, 1992).

2.5. Antioksidan Maddeler

Antioksidan maddeler ‘antioksidan savunma sistemleri’ veya kısaca ‘antioksidanlar’ olarak bilinen serbest radikalleri nötralize eden, insan vücudaki ve gıdalardaki serbest radikallerin olumsuz etkilerini ve oluşumunu durduran veya yok eden maddelerdir (Aydoğan ve ark., 2007). Antioksidanlar hücre için zararlı reaksiyon sistemlerini durdurarak, toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Antioksidan madde içeriği zengin kimyasal maddelerle, serbest radikallerin ve aktif oksijenin meydana getirdiği oksidatif hasar engellenebilmektedir (Katakwar ve ark., 2016).

Antioksidanların bilinen etki mekanizmaları şunlardır (Akkuş, 1995) :

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirirler.
2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler.
3. Zincir kırıcı etki; Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler.
4. Onarıcı etki: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.
5. Hücrel kinaz kayıplarını önleme: Oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederler.
6. Enzimatik etki: SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler.

2.5.1. Deri ve oksidatif stres

Derinin UV'ye maruziyeti sonucunda eritem, ödem ve bunu takiben pigmentasyon veya bronzlaşma gibi akut enflamatuvar değişiklikler, fotoyaşlanma, immün baskılanma ve fotokarsinojenite gibi kronik değişiklikler görülebilir (Bickers ve Athar, 2006; Ichihashi ve ark., 2000). UV'nin neden olduğu bu zararlı etkileri gidermek için güneşten koruyucu ürünler geliştirilmiştir. Bunlar UV ışınını doğrudan bloke ederek veya UV radyasyonunu absorblayarak etkilerini gösterirler. Deri yaşlanmasına karşı kullanılan bu ürünlerde paraamino benzoik asit türevleri, sinnamatlar, salisilatlar, oktokrilen ve ensulizol gibi UVB ışınını filtre edici ajanlar ve benzofenonlar, butil metoksibenzoil ve meradimat gibi UVA filtreler kullanılmaktadır. Bunun yanısıra UV radyasyonunun neden olduğu/artırdığı veya deri yaşlanmasını hızlandıran oksidatif hasarı azaltmak için çeşitli kaynaklardan elde edilen pek çok antioksidan madde olup, bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (Fuchs, 1992; Renzing ve ark., 1996). Genç yaşlardan hatta çocukluk çağından itibaren etkin olarak güneşten korunma, fotoyaşlanmanın önlenmesindeki en temel basamaktır. İyi bir şekilde güneşten korunma deri yaşlanmasını geciktirmenin yanısıra UV'ye bağlı oluşan DNA hasarı, immün sistemin baskılanması ve kanser oluşturuvcu etkilerin önlenmesine de büyük katkılar sağlayacaktır (Lin ve ark.,2003).

Deride görülen en temel hasar, UV'nin derinin lipit yapısında değişiklik yaparak eritem ve inflamasyona neden olan yapıları oluşturması ve derinin protein ve aminoasit yapısındaki temel elemanlarında (elastin ve kollajen lifleri) geri dönüşümsüz bozukluğa neden olmasıdır (Muramatsu ve ark., 1992). Bu nedenle, ROS bugün deri yaşlanmasının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. Dermokozmetikte hammadde olan antioksidanların kullanım amacı; derinin doğal savunma mekanizmasını oluşturan fizyolojik antioksidanların eksilen miktarlarının yerine konulmasıdır (Bickers ve Athar, 2006).

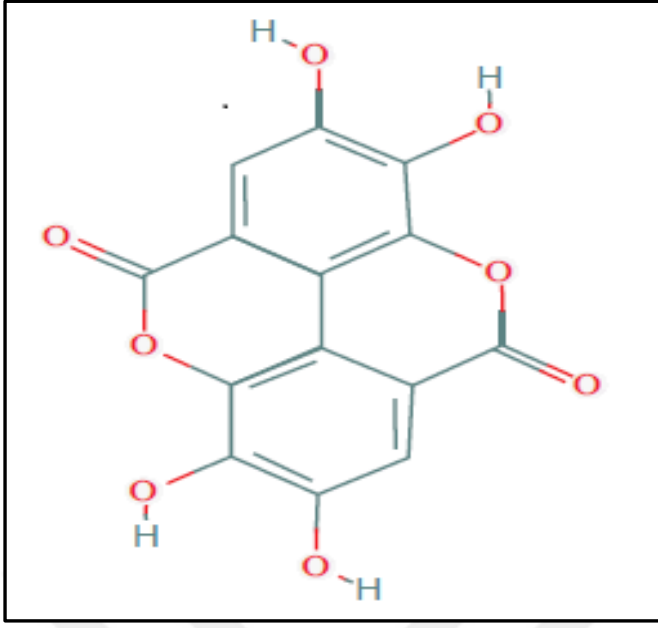
2.6. Çalışmada Etkinliği Araştırılan Kimyasal Maddeler

2.6.1. Ellajik asit (EA)

Bitkilerde farklı formlarda bulunan fenolik bileşenler ya da diğer bir adıyla fenolik fitokimyasallar doğadaki besin kaynaklarının en çok bulunan sekonder metabolitleridirler. Polifenollerin en yaygın görülen formlarından tanenler yüksek molekül ağırlığına sahip fenolik bileşiklerdir. Bitkisel kaynaklı tanenler, hidrolize olabilen tanenler (Ellagitanenler) ve kondanse tanenler (Proantosiyaniidler) 'dir (Rios ve ark., 2018).

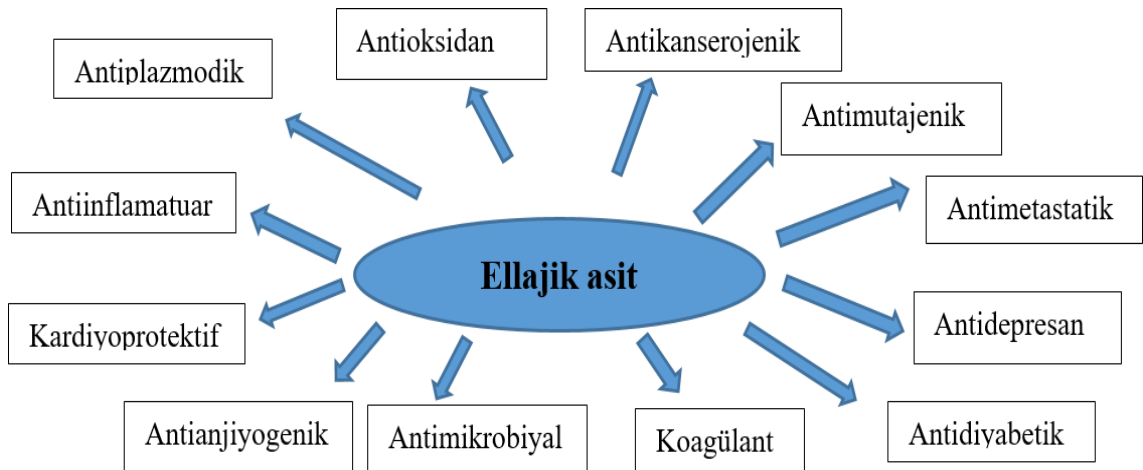
Polifenollerin hidrolize olabilen tanen sınıfına ait olan ellagitanenler, ellajik asidin kompleks türevleridir. Ellagitanenlerin asit ya da bazlarla hidrolizi ile heksahidroksidifenik asit, bundan da ellajik asit elde edilir. Nardaki hidrolize olabilen tanenler; gallotanenler, ellagitanenler, punicalagin ve punicalin gibi gallagil tanenlerden oluşmaktadır. Heksahidroksidifenik asidin dilaktonu olan ellajik asit, hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton gruplarından oluşur. Lipofilik kısmı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür (Neves ve ark., 2018.). Hidroksil grubu antioksidan aktiviteyi artırır ve hücreleri oksidatif hasardan korur (Pari ve Sivasankari, 2008).

EA' nın sistematik adı 2,3,7,8-tetrahidroksi (1) benzopirano (5,4,3-cde)(1) benzopiran-5,10 dion olup, kapalı formülü $C_{14}H_6O_8$ ve molekül ağırlığı 302,197 g/mol dır (Viuda-Martos ve ark., 2010).



Şekil 7. Ellajik asit ($C_{14}H_6O_8$)

EA, nar, ceviz, ahududu, çilek, ceviz gibi çok sayıda meyve, fındık ve sebzelerde bulunan güçlü bir antioksidandır. EA, meyve ve fındıkta bulunan polifenoller olan ellagitanninden (ET) elde edilir. Ellajik asit ayrıca intestinal mikroflora ile metabolik olarak ürolitinlere dönüştürülür. EA'ye atfedilen çeşitli farmakolojik özellikler, tek başına ellajik asite, metabolitlerine ve her ikisinin birleşimine bağlı olarak hala tam olarak bilinmemektedir (Bisen ve ark., 2012).



Şekil 8. Ellajik asit'in farmakolojik işlevleri (Bisen ve ark., 2012)

EA'in çoklu yolların düzenlenmesindeki moleküler etkileri aşağıdaki gibi gerçekleştirilir:

Nükleer eritroit-2 bağlantılı faktör-2 (Nrf2) üzerinden antioksidan cevabın aktivasyonu, Nükleer faktör-kappa B (NF-B) ile siklooksijenaz (COX-2) ve sitokinler gibi proinflamatuvar ajanların inhibisyonu (Cornelio Favarin ve ark., 2013), Trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), Transfome edici büyüme faktörü beta (TGF), hepatik büyüme faktörü (HGF) olarak, bazı büyüme faktörü ekspresyonunun düzenlenmesi (Rani ve ark., 2013), Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), siklin D1 ve E, p21, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) gibi tümör hücresi hayatta kalma/hücre döngüsü genlerinin modülasyonu baskılayıcılar (p53, DUSP6, Fos), onkogenler (K-Ras, c-Myc) adezyon moleküllerinin azaltılması (Labrecque ve ark., 2005).

2.6.2. Silibinin (SB)

Silibinin; *Silybum marianum* L. bitkisinden elde edilen bir flavonoglignandır. Silibinin $C_{25}H_{22}O_{10}$ kimyasal formülünde, moleküler ağırlığı 482,44 g/mol olan bir bileşendir (Deep ve Agarwal, 2010). *Silybum marianum* bitkisi deve dikenini, süt dikenini ve meryem ana bitkisi isimleriyle de bilinmektedir. Silibinin ile silibin eş anlamlıdır (Wellington ve Jarvis, 2001). Silymarin yedi flavonolignan dâhil olmak üzere sekiz önemli bileşik kompleksidir. Bunlar silibin A, silibin B, izosilibin A, izosilibin B, silikristin, izosilikristin, silidianin ve bir flavonoid olan taxifolindir. Silibinin, silymarin kompleksinin (%70) biyolojik açıdan en aktif bileşeni olup, silibin A ve silibin B'nin karışımından oluşmaktadır (Kroll ve ark., 2007).

Silimarin, süt devedikeni bitkisi *Silybum marianum* L. tohumlarında bulunan bir özdür (Deep ve Agarwal, 2010). Angiospermlerin geniş ve yaygın bir ailesi olan Asteraceae familyasının bir üyesidir. *S. marianum* L., 30-100 cm yükseklikle, gövdesi köşeli, seyrek tüylü, tek veya iki yıllık otsu bir bitkidir. Yapraklar soluk yeşil renkte, beyaz damarlara sahip, kenarları derin dişli ve dikenlidir. Çiçekleri mor veya beyaz renklidir (Kroll ve ark., 2007).



Şekil 9. *Silybum marianum* L. bitkisi (<https://florabase.dpaw.wa.gov.au/browse/profile.php/8227>)

SB antioksidan, antiinflamasyon, immünomodülatör, antiviral ve hepatoprotektif etkiler dâhil olmak üzere çok sayıda özelliğe sahip bileşiktir. Bazı kanser türlerinin görülme sıklığını azaltır (Abu-Zaiton, 2013). Ayrıca antibakteriyel, antialerjik, antimutagenik, antineoplastik, antitrombotik ve vazodilatatör etkiler de dâhil olmak üzere diğer tedavi edici özelliklere sahiptir (Abu-Zaiton, 2013). SB, ribozomların ve DNA sentezinin oluşumunda önemli bir artış sağlar, ayrıca yaralı karaciğerde protein sentezi düzeyini yükselterek karaciğer dokusu yeniden oluşumunu indükler (Deep ve Agarwal, 2010). Fibrojenizi inhibe eder ve mantar zehirlenmesi ve endüstriyel kirlilikler ile hepatotoksisteye sarılık, alkol kötüye kullanımı, fibrozis, siroz tedavisinde kullanılır (Bhattacharya, 2011). Bunun yanında ayrıca diyabet insidansını azaltabilir. SB, inflamasyonu önler, hücrenin hayatta kalma, farklılaşma ve büyümede rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler ve koordine eder (Ramasamy ve Agarwal, 2008). SB yapılan diğer çalışmalara göre, prostat, yumurtalık, göğüs, akciğer, deri ve mesane dâhil olmak üzere çeşitli kanserlerde tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabildiği gösterilmiştir (Bhattacharya, 2011). İleri çalışmalar,

silimarinin antimetastatik aktivitesi ile çeşitli kanserleri tedavi etmek için temel yaklaşımlardan biri olan antianjiyogenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Ramasamy ve Agarwal, 2008). Birkaç *in vitro* çalışma, bu bitkinin, hepatit C virüsüne (HCV) karşı etkili anti-enflamatuar ve antiviral ajan olarak biyoaktivitesini vurgulamıştır (Calani ve ark., 2012). SB antikanserojen, antifibrotik, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antioksidan etkinlikleri ve bu etkinliklerinin altında yatan kimyasal ve hücrel mekanizmalarla ilgili araştırmalar hala devam etmektedir (Calani ve ark., 2012).

2.7. Çalışmada Takip Edilen Biyokimyasal, Histolojik ve Stereolojik Belirteçler

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

Oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücrel hasarlara yol açan biyokimyasal bir süreçtir (Inal ve ark., 2001). Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu oluşabildiğinden, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile mümkündür (Yogesh ve ark., 2018).

Doku homojenati: Çeşitli doku örneklerinde (karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis, akciğer gibi) oksidatif stres parametrelerinin çalışılması için dokular önce homojenize edilir. Bunun için, doku örnekleri tartılıp uygun bir tampon çözeltisi (w/v) ile homojenizatör içerisinde iyice ezilip homojenize edilir. Hazırlanan doku homojenatları – 80°C’de derin dondurucuda analiz yapıncaya kadar saklanır (Bolcal ve ark., 2007)

Antioksidan savunma sisteminin ölçümü: Toplam antioksidan aktivitenin tayini için Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) denilen bir metotla total antioksidan kapasite ölçülebilmektedir. Oksijen radikali absorplama yeteneği de aynı total antioksidan kapasitenin tespiti için kullanılır, ancak burada floresan ölçümü yapılmaktadır (Armstrong ve Browne, 1994; Jackson ve ark., 1995; Motchnik ve ark.,1994; Erel, 2004).

Toplam oksidan durumunun ölçümü (TOS) için yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemde, örnekte bulunan oksidanlar demir iyonu-o-dianisidin bileşimini ferrik iyonla okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleriyle güçlendirilir. Demir iyonu asidik bir ortamda ksilenol portakalı ile renkli bir bileşim oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Analiz hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri bakımından ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq / L}$) ifade edilir (Erel, 2005).

Oksidatif stres indeksi (OSI) , TOS seviyesinin TAS seviyesine oranı kabul edilir. OSI değeri (Erel, 2005) aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{OSI (AU=Arbitrary Unit)} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) / \text{TAS (mmol Trolox Eq/L)}$$

2.7.2. Apoptozis

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür (Barisic ve ark., 2003). Embriyodan başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü devam eder. Bazı hücreler yıllarca yaşarken, bir kısmı sadece birkaç saat yaşar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır. Fizyolojik oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen apoptoz terimini ilk kez 1972 yılında Wyllie kullanmıştır. Yunancada apo=ayrı ve ptosis=düşen anlamına gelmektedir. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların DNA kırıklarına yol açtıklarını göstermiştir (Brouckaert ve ark., 2004). Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal temelleri atılmıştır. Bu tarihten sonra apoptoz konusunda çalışmalar hızla artmıştır. Ökaryotik hücre ölümünün en sık rastlanan formu olan apoptoz, tümör regresyonu ve embriyonik gelişim sırasında görülmektedir (Gültekin ve ark., 2008). Hücre morfolojide değişiklikler ile karakterize edilen apoptoz, dokuların gelişim evrelerinde, dokulardaki hücre yüzeyinde belirleyici homeostatik mekanizmada, immün olaylarda, hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlara bağlı hasarlanmalarında, yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır (Gordeziani ve ark.,2017). Apoptotik hücre

ölümü, nekrotik hücre ölümünden farklı özellikler göstermektedir (Huppertz ve ark.,1999; Willingham, 1999). Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü sitotoksiste, serbest radikal hasarı, sitokinler ve inflamatuvar yaralanma tarafından tetiklenmektedir (Chan ve ark., 2014; Lemasters, 2018).

Tablo 2. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (Huppertz ve ark.,1999)

Özellik	Apoptoz	Nekroz
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik / patolojik
Eksüdatif yangı	Genellikle var	Yok, ± hücrel immünitede
Işık Mikroskopi	Bazofili, piknoz karyoreksis, karyolizis	Kresentik görünüm karyolizis, eozinofilik partikül
Elektron Mikroskopi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik hücreler ve komşu
Mekanizma	Kimyasal ya da yapısal parçalanma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücrel yıkım
Uyaran	Hücre havuzcuğunun korunması, DNA hasarı, Hipoksi, Sinyal yolağındaki dengesizlik	Metabolik stres, Besin yokluğu, Isı ve pH değişikliği, Hipoksi, Anoksi
Hücrenin akıbeti	Apoptotik cisimcik	Liziz

Apoptoz iki yolla gerçekleşir; İnstrinsik (Mitokondriyal) yol ve Ekstrinsik yol (Direkt ve Dolaylı mekanizma). Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler (Chan ve ark., 2014).

2.7.3. Deri ve apoptozis

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, cilt gelişimini, homeostazisini ve tümör oluşumunu düzenleyen önemli bir işlevdir. Epidermis çeşitli dış uyaranlara maruz kalır ve en önemlilerinden biri UV radyasyondur. UVA ve UVB spektrumları biyolojik

etkilerinde ve deri tabakaları içerisindeki penetrasyon derinliklerinde farklılık gösterir. UVB ışınları, DNA tarafından doğrudan emilir. UVA, öncelikle reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla DNA hasarına neden olabilir. Fotohasarlı hücreleri ortadan kaldırarak, apoptozun epidermal karsinogenezin önlenmesinde önemli bir işlevi vardır. UV kaynaklı apoptoz farklı yollar içeren karmaşık bir olay olup, şunları içerir: 1. Tümör baskılayıcı genin p53'ün aktivasyonu; 2. Hücre ölüm reseptörlerinin doğrudan UV ile veya ölüm ligandlarının otokrin salınımıyla tetiklenmesi; 3. Mitokondriyal hasar ve sitokrom C salınımı; 4. Fibroblast ilişkili tümör nekroz faktörü reseptörü ve TNF ile ilgili apoptozis indükleyen ligand reseptörü gibi ölüm reseptörleri yoluyla dışsal yol kaspaz kaskadını aktive eder; 5. Apoptozun intrinsik veya mitokondriyal yolu, Bcl-2 protein ailesi, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) ve pro-apoptotik (Bax, Bak, Bid) tarafından düzenlenir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge, hücre sağkalımını veya ölümünü belirler (Pustisek ve Situm, 2011).

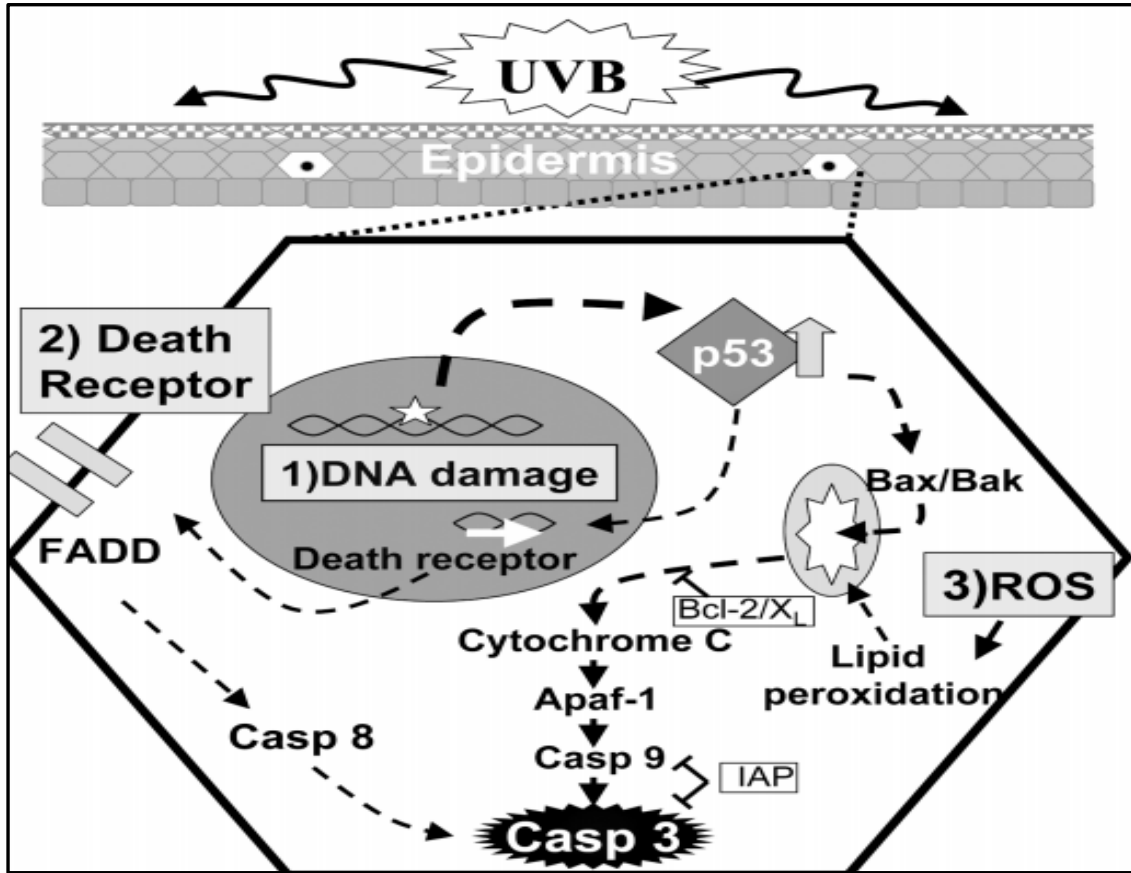
Derideki apoptoz, kimyasal maddeler ve iyonlaştırıcı radyasyon ile tetiklenebilir; ancak, en güçlü hasar cildin güneş ışığına maruz kalmasıdır. UV radyasyon, deride güçlü bir apoptozis indükleyicisidir. Apoptotik epidermal keratinositler olarak bilinen güneş yanığı hücrelerinin (SBCs) görünümleri büzülmüş piknotik çekirdek ve eozinofilik bir sitoplazma ile ayırt edilirler. Bu özellikler, SBC'lerin H&E ile boyanan kesitlerde kolaylıkla tanınmasını sağlar. SBC'ler, UVR'ye 24-48 saat maruz kaldıktan sonra en geç 8 saat sonra tespit edilebilir ve sonra 60-72 saat içinde kaybolurlar. *In vitro*, apoptoz inflamasyona yol açabilecek nekroz olarak bilinen ikincil plazma membranının permeabilizasyonu ile sonuçlanır. Ancak apoptotik hücrelerin hızla klirens olması nedeniyle, *in vivo* fizyolojik koşullar altında bunun olmayacağına inanılır (Reefman ve ark., 2005).

Deride, apoptotik keratinositlerdeki desmozomların kaybı, Str. corneum'a doğru daha hızlı gerçekleşir. Daha sonra bu dökülme yoluyla SBC'lerin büyük bir kısmı deriden atılır. Ayrıca Str. corneum'a ulaşmadan önce makrofajlar, Langerhans hücreleri ve keratinositler, SBC'leri sindirirler. UVA, cildin epidermal ve dermal tabakalarına nüfuz eder ve biyomoleküller tarafından zayıf bir şekilde emilir. Aksine UVB; epidermal tabakasından daha fazla nüfuz etmez ve güçlü bir şekilde DNA ve protein

tarafından emilir. UVB bu nedenle deride SBC'lerin en etkili indükleyicisidir (Reefman ve ark., 2005).

UVB kaynaklı apoptoz, birçok sinyal yollarının dâhil olduğu karmaşık bir mekanizma olarak kabul edilir:

- Direkt DNA hasarı ile uyarılan apoptoz
- Ölüm reseptör aracılı apoptoz
- Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla apoptoz



Şekil 10. UVB kaynaklı apoptoz sinyal yolları (Reefman ve ark., 2005)

UVB kaynaklı apoptoz (1) Doğrudan DNA hasarı, Bax/Bak'i aktive eden p53'ün mitokondriden sitokrom c salımıyla sonuçlanması, daha sonra apoptotik proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1), kaspaz-9'a ve kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozun uygulanması. P53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olarak da hareket edebilir ve ölüm reseptörlerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu indükleyebilmektedir. (2) Ölüm reseptörü kümelenme kaspaz-8'i harekete geçiren FADD'nin devreye girmesine ve aktivasyonuna yol açar. Bu da kaspaz-3'ü aktive eder. (3) ROS 'ların doğrudan oluşumu, mitokondriyal

membranın lipid peroksidasyonuna ve daha sonra kaspaz-3 aktivasyonuna yol açan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olur. Bcl-2 ve Bcl-XL, sitokrom c salınımını inhibe ederken, apoptoz inhibitörleri (IAP'ler) kaspazların aktivasyonunu engelleyebilir (Reefman ve ark., 2005).

2.8. Çalışmada Kullanılan Stereolojik Yöntemler

Stereoloji, iki boyutlu (2-D) çeşitli cisimlerden alınan kesitlerden elde edilen gözlemleri üç boyutlu (3-D) nicel bilgi sağlamakta kullanılan teknikler kümesidir (Odacı ve ark., 2005; Yurt ve ark., 2018). Bu teknik kan damarı uzunluğu, hücre hacmi ve yüzey alanı gibi özelliklerin hesaplanmasını sağlar. Bu da niceliksel verilerin, farklı etkenler arasındaki doz-etki ilişkilerini tahmin etmek için kullanılabilir (Deniz ve ark., 2018).

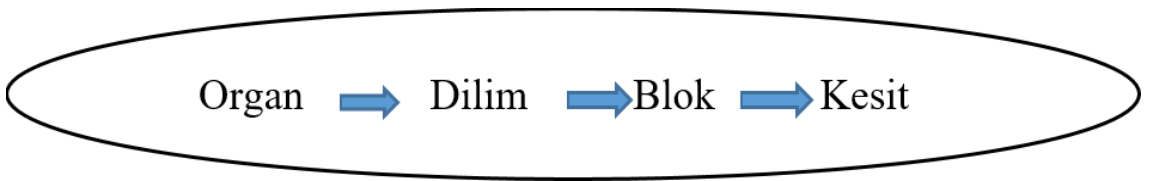
Kantitatif verilere ek olarak, stereoloji araştırmacıya tarafsız olarak örneklerin hangi 3-D gerçeklikle ilişkili olduğuna ait veriler veya biyopsiler toplama fırsatı da sunmaktadır. Stereoloji nedensel varsayımlar için daha güçlü destek veya morfolojik kanıtlara dayalı hipotezler sağlar (Cruz ve Orive, 1999, Gundersen ve ark., 1999, Gundersen ve Jensen, 1987).

Stereoloji, varsayımlar yaparak incelenen yapıların geometrik özellikleri ve dağılımı hakkında bilgi verir. Örneğin; elektron mikroskopisi ile görülen bir desmozomun diskoit şekli veya epidermisin bazal katmanı boyunca eşit olarak melanositlerin dağılımı. 1980'li yıllarda tasarıma dayalı stereoloji Gundersen, Cruz-Orive, Jensen ve diğerlerinin çalışmaları ile yenilenmiştir (Odacı ve ark., 2005). Özellikle disektöre prensibine girişte güvenilir 3D'li büyüklük, şekil ve yer hakkında herhangi bir varsayım yapmadan incelenen veriler, nesnelerin dağılımı veya yönlendirilmesine imkân sağlamıştır. Böylece model tabanlı stereolojinin zayıf yaklaşım modelleriyle sistematik hata ortadan kaldırılmıştır. Stereoloji, metalürji ve jeoloji gibi araştırmaların birçok alanında kullanılmıştır. Gundersen, West ve Pakkenberg tıp alanındaki sinir bilim çalışmalarıyla dermatolojiye stereolojik yöntemler hakkında bir temel kazandırmışlardır (West ve Gundersen, 1990; Pakkenberg ve

Gundersen, 1995; Cruz ve Orive, 1999; Gundersen ve ark., 1999; Gundersen ve Jensen, 1987).

Stereolojik metotların çok yönlülüğü, uygulamadaki basitliği ve yapılabilir olması bilgisayar tabanlı görüntü analizleri yardımıyla dermatolojik araştırmalara katkı sağlar (Odacı ve ark., 2005). Ayrıca kolayca uygulanabilirliği ve metodolojinin gereklilikleri araştırmacılara tekniğe tanıtmakla kalmayıp, stereolojik çalışmaları değerlendirmelerini de sağlar (Yurt ve ark., 2018). Biyolojik özelliklerin stereolojik tahmini, örneklemin gerçekte ne ölçüde iyi örneklendiğinin sayısını yansıtmaktadır. Örneklemin boyutunu artırılmasıyla tahminen iş yükü buna göre artacaktır ve bunun tersi iş yükünde azalma olacaktır. Stereoloji alışan araştırmacının görevi sayı, uzunluk, alan ve hacim hesaplamalarını asgari çabayla yaparak güvenilir nicel tahminler sunmaktır (Deniz ve ark., 2018).

Stereolojik metotlar, tarafsız metotlardır ve kurallarına uygun bir biçimde uygulandığında, sistematik hatadan bağımsız sonuçlar elde edilmesini sağlar ve örnekleme sayısı arttırıldııkça gerçek değere daha fazla olasılıkla yaklaşmak mümkün olur (Odacı ve ark., 2005). Stereolojik metotların temelini “Sistematik Rasgele Örnekleme” (SRÖ) stratejisi oluşturur (Deniz ve ark., 2018). Belli bir örnekleme aralığı ile ilgilenilen yapının tamamının örneklenmesidir. İlk aralıkta içinden rastgele bir noktadan başlanması esastır. Sistematik olması, örneklemenin önceden belirlenmiş eşit aralıklarla yapılmasını, rastgele olması ise bu sistematik örneklemenin belirlenen örnekleme aralığı içindeki rastgele bir sayı ile başlamasını ifade eder. Stereolojik bir çalışmanın tarafsız olması için sistematik rastgele örneklemenin, gerekli tüm seviyelerde (organdan alınacak dilimlerde, dilimlerden alınacak bloklarda, bloklardan alınacak kesitlerde ve kesitlerde inceleme yapılacak alanlarda) uygulanması gerekir (Cruz ve Orive, 1999, Gundersen ve ark., 1999, Gundersen ve Jensen, 1987).



Şekil 11. Stereolojik metotların temeli

2.8.1. Fiziksel disektör ile örnekleme ve hücre sayımı

Disektörün ilk ortaya çıkan biçimi olan yöntemde, iki tane ardışık veya birbirlerinden belli bir uzaklıkla ayrılmış olan iki kesit alınır, birinde bulunup, diğerinde bulunmayan tanecikler sayılır. İki kesit arasındaki mesafe disektör yüksekliği olarak ifade edilir ve yapılan sayım sonucunda, disektör yükseklikleri boyunca örneklenebilen disektör taneciklerinin yani tanecik uçlarının sayısı bulunur. Bu da, çalışılan taneciklerin sayısal yoğunluğunu (N_v) verir (Korkmaz ve Tümkaya,1997; Odacı ve ark., 2005).

$$N = \frac{\sum Q^-}{h \cdot \sum a(\text{çer})} \cdot V(\text{ref})$$

N: Toplam tanecik sayısı

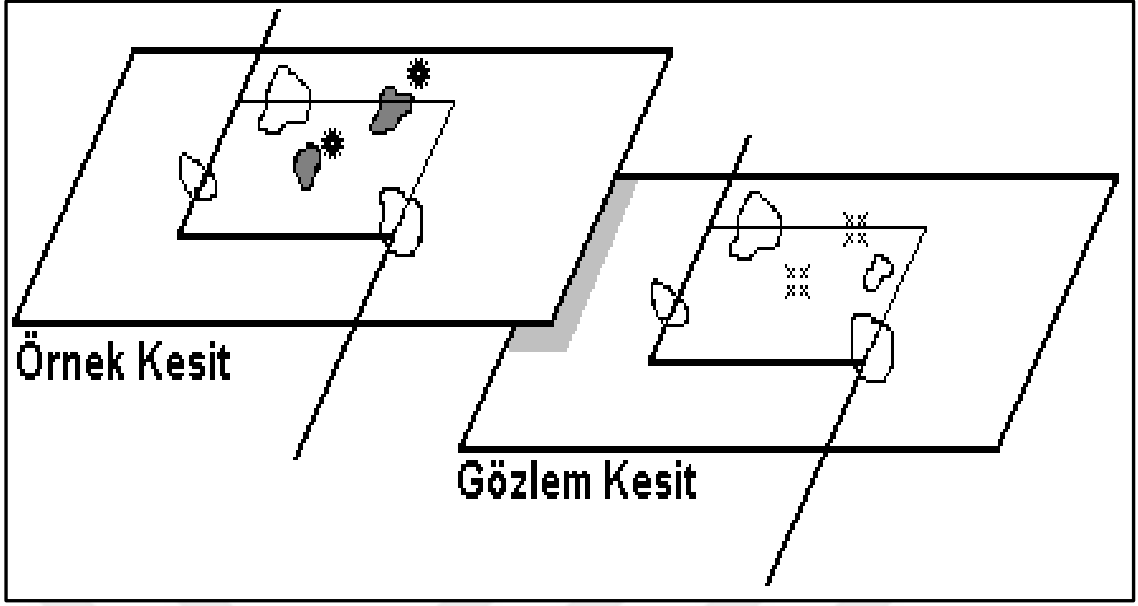
Q: Disektör taneciklerinin sayısı

h: Kesitler arasındaki mesafe (yani disektör yüksekliğini)

a (çer): Sayımda kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin alanı

V(ref): Çalışılan yapının toplam (veya referans) hacmini belirtmektedir.

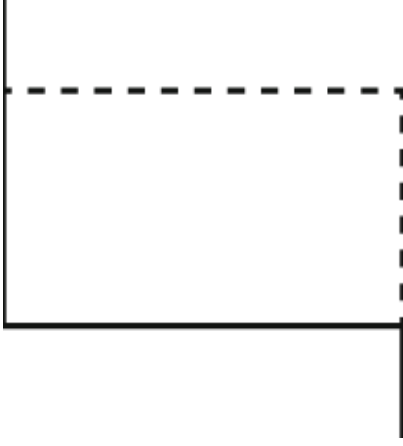
Eğer bu formülden V(ref) değeri çıkartılacak olursa, sonuçta elde edilecek olan değer, toplam hacim hesaba katılmadığından taneciklerin sayısal yoğunlukları olacaktır. Fakat birçok durumda, sayısal yoğunluk değeri, toplam tanecik sayısı değişimiyle ilgili doğrudan bilgi vermediğinden, özellikle karşılaştırmalı çalışmalarda bu değer kullanılması ve buna bağlı biyolojik yorumlar yapılması sakıncalı olabilmektedir (Korkmaz ve Tümkaya, 1997; Odacı ve ark., 2005).



Şekil 12. Örnek ve gözlem kesit (Gundersen, 1977)

2.8.2. Tarafsız sayım çerçevesi

Tanecik sayımı yaparken tanecik izdüşümlerinden yararlanıldığında, kesitlerde görülen tanecik izdüşümlerinin belli bir alanla sınırlandırılarak sayılmaları gerekir. Bu durumda, izdüşümlerin hangi kurallara göre sınırlandırılması gerektiği konusu ortaya çıkmaktadır. Tarafsız sayım çerçevesi, bir kalın ve düz, bir de ince ve kesikli iki tip çizgi ile sembolize edilen dörtkenara sahip basit bir dikdörtgen veya karedir (Odacı ve ark., 2005). Sayım kuralları açısından diğer sayım çerçevelerinden farklıdır. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “dâhil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler ise “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rast gelen izdüşümler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden izdüşümler ise sayım dışı bırakılır (Yurt ve ark., 2018).



Şekil 13. Tarafsız sayım çerçevesi

2.8.3. Hacim fraksiyonu (yoğunluğu)

Hacim fraksiyonu, iki hacmin oranını ifade eder. Burada ifade edilen hacimler, ilgilendiğimiz referans hacmi içerisinde yer alan iki ayrı yapı hacminin oranı olabileceği gibi, referans hacmi ile içerdiği bu yapılardan birinin hacminin oranı da olabilir. Buna göre ilgilendiğimiz bir elemanın hacim fraksiyonu, aşağıdaki formülle gösterilir:

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

V_v sembolü hacim fraksiyonunu belirtirken, parantez içindekiler ile de bu fraksiyonun hangi referans hacmindeki hangi elemana ait olduğunu gösterir. Hacimlerin yerine kesitlerde referans hacmi ile ilgili eleman üzerine rastgelen noktaların oranlarının da aynı eşdeğere sahip olduğu bulunmuştur (Odacı ve ark., 2005). Burada yapılması gereken sadece kesitler üzerine belirli aralıklarla noktalar içeren bir noktalı alan cetvelinin rastgele bırakıldıktan sonra ilgili eleman ile referans hacmine rastgelen noktaların sayılıp oranlanması yeterlidir. Bu durumda da hacim fraksiyonu için P_p (eleman, ref) ifadesi kullanılır (Deniz ve ark., 2018).

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

Hacim fraksiyonu bir orandan ibaret olduğu için biyolojik yapılarda doğrudan anlam ifade eden bir parametre olarak kullanılmazlar. Çünkü eleman hacmindeki bir değişim doğrudan ilgili elemandaki bir farklılıktan kaynaklanmayabilir. Bundan dolayı

hacim fraksiyonu mutlak bir değer olan toplam hacim şeklinde ifade edildiğinden, ayrıca hesaplanmış referans hacmi ile çarpılır. Sonuçta ilgili elemanın o referans hacmindeki toplam hacmi elde edilir (Korkmaz ve Tümkaya, 1997).

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

2.8.4. Toplam hücre sayısının hesaplanması

Fiziksel disektörde, birim hacimdeki hücrelerin sayısı (N_v), sayım yapılan ardışık kesit çiftinin birinde olup diğerinde olmayan hücrelerin (Q =disektör taneciği) sayılması ile hesaplanır. İki komşu kesitin yöndeş yüzeyleri arasındaki mesafe (t , kesit kalınlığı) ve örneklenen kesitlerin üzerine yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesinin alanı (a), disektörün hacminin ($V(\text{dis.})$) tespit edilmesi için kullanılır. Buradan alınan kesitlerde bulunan toplam dermal mast hücre sayıları için aşağıdaki eşitliği yazabiliriz:

$$N_v = \frac{\sum Q}{\sum V(\text{dis})} = \frac{\sum Q}{h \cdot \sum a}$$

Daha sonra, her denekteki deriden alınan toplam hücre sayılarını hesaplamak için, sayısal yoğunluk, N_v , ortalama hacmi $V(\text{ref})$ ile çarpılır.

$$N = N_v \times V_{\text{ref}}$$

a = Sayım çerçevesinin alanı

t = Her kesit çifti arasındaki mesafe

N = Hesaplanan toplam sayı

N_v = Sayısal yoğunluk

V_{ref} = Yapının toplam(referans) hacmi

2.8.5. Referans Hacminin Hesaplanması (Cavalieri metodu)

Cavalieri ilkesi, 1635 yılına kadar İtalyan Matematikçi Bonaventura Cavalieri (1598-1647) tarafından formüle edilmiştir (Howard ve Reed, 2005). Keyfi biçimde şekillendirilmiş bir nesnenin toplam hacminin nesne üzerinde tarafsız bir şekilde tahmin

2.8.6. Hata katsayısı (HK)

Cavalieri yöntemi, kesit almak ve nokta saymak için hesaplanmış olan hacim değerlerini sorgulayabilmektedir. Elde edilen kesit sayısını veya kullanılan nokta sıklığının yeterli olup olmadığını öğrenmek amacıyla elde edilen verilerin hata katsayısı (HK) hesaplanır (Gundersen ve Jensen, 1987). HK, örnekleme stratejisi ve örnek büyüklüğü olarak tanımlanan ve araştırmacı tarafından kontrol edilebilir iki etkene bağlıdır. Bu iki faktör yapılacak bir ön çalışma ile belirlenir (Pakkenberg ve Gundersen 1995). HK, standart hatanın popülasyon ortalamasına bölünmesi ile hesaplanabilir (Pakkenberg ve Gundersen 1995; Mouton, 2002). Hata katsayısı % 5 ve altında ise yapılan işlemin doğruluğuna karar verilir (Mazonakis ve ark., 1998; Şahin ve ark., 2003).

2.9. Dermoklinikte Yapılan Stereolojik Araştırmalar

Kortizonların keratinosit kültürü morfolojisine etkisi adlı çalışmada zamanla epidermal hücreler arasında cilt oklüzyon boşlukları olduğu görülmüştür. Keratin ve keratohiyalin filamentlerinin farklı epidermal tabakalardaki dağılımları ve bu tabakaların hacimleri stereolojik yöntemlerle belirlenmiştir (Kamp ve ark., 2011). Yaşa, cinsiyete ve farklı deri bölgelerine bağlı olarak elastin ve kollajen lifler gibi bağ doku elemanları hacimlerinin farklı dermal seviyelerdeki kompozisyonları stereolojik yönden değerlendirilmiştir. Ehlers Danlos sendromlu hastaların derisinde dermal elastin ve kollajen liflerinin dağılımları incelenmiştir (Kamp ve ark., 2011). Konfokal mikroskopik ve immünohistokimya çalışmalarında disektör yöntemi kullanılarak epidermiste bulunan Langerhans hücre sayısı stereolojik metotlarla ile belirlenmiştir. Disektör yöntemiyle ışık mikroskopisi altında atopik dermatitli hastaların derisinde lenfositler sayılarak, sağlıklı insanların derisindeki lenfositlerle karşılaştırılmıştır. Langerhans hücre sayısı incelenen posterpatik nöropatili hasta insan derisi ile normal insan derisi karşılaştırıldığında Langerhans hücre sayısında hiçbir fark görülmemiştir (Jemec ve Wulf, 1997).

Stereolojik tekniklerle kolayca tahmin edilen bir diğer özellik ise ortalama epidermal kalınlıktır. Tüysüz farelere nakledilen insan derisi transplantasyonu işlemi

süresince zamanla akantozu sergilediği gösterilmiştir. Transplantasyondan sonra zamanla akantozun olduğu bölgede her bir epidermal tabakalaşma oluşmuş ve bu kalınlık akantoz çizgilerin kesiştiği yerdeki nokta sayım yöntemiyle belirlenmiştir. Sağlıklı ve hastalıklı ciltte lenfatik ağı karakterize etmek için stereoloji ile birlikte kullanılan *in vivo* floresan lenfanjiografi ve kapilleroskopi diğer noninvaziv uygulamalardır. Duyusal nöropatili hastalardaki ve sağlıklı olanlardaki miyelinsiz intraepidermal sinir lifleri immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir (Kamp ve ark., 2009).

Stereoloji yara iyileşmesi, anjiyogenez ve yara izi gibi çeşitli araştırmalara da uygulanmıştır. Ayrıca kan damarları, fibroblastlar, farklı travma türlerinden sonraki deri iyileşmeleri için diğer belirteçler ile epidermin hücrel kompozisyonunu ölçmede birçok farklı prob kullanılmıştır. Mikrobiyal transglutaminazla çapraz bağlı kollajen doku implante edilmiş sıçanlarda yara alanı, kan damarlarının yüzey ve uzunluk yoğunluğu, inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların hacim fraksiyonları stereolojik yöntemler kullanılarak iyi bir cilt mimarisinin korunmasında, yara kasılmasının önlenmesi ve anjiyogenezin uyarılmasıyla daha iyi sonuç sağladığı görülmüştür (Kamp ve ark., 2009).

Dermatolojideki zorluklardan biri bazal membranın derinliği olduğundan tercihen yeterli çözünürlük ile daha derin yapılarını tanımlamada derideki yapıları görselleştirebilen *in vivo* görüntüleme teknikleri geliştirmektir. Buna ek olarak akantoz ve derideki pullanma gibi çeşitli deri hastalıklarının sağladığı zorluklar karşısında dahi bu tekniklerle güvenilir görüntüler elde edilebilir. Bu bağlamda, *in vivo* konfokal mikroskopi, yüksek çözünürlüklü ultra ses ve optik tomografi umut vericidir, ancak bunlar derinin daha derinlerine penetre olabilecek seviyede yeterli değildir. Stereoloji yeni bir teknik olmamasına rağmen tarafsız, kantitatif olmayan dokunun 3B özellikleri hakkında bilgi şekil, boyut ve dağılımıyla bağımsız bileşenler hakkında bilgi verir. Klinik dermatolojik araştırmalarda kantitatif veriler oluşturmada görüntüleme tekniklerini kullanmak, görüntüleme teknikleri ve teknolojik uygulamalara rağmen düşük maliyeti ve çok yönlülüğünden dolayı stereolojinin kullanımı göz önünde bulundurulmalıdır (Jemec ve Wulf, 1997).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, randomize ve kontrollü deneysel bir çalışmadır. Deneysel çalışmalar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nde, diğer analizler ise Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvarlarda, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Enzimoloji Laboratuvarı'nda ve Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvarda 2017 ve 2018 yılları arasında gerçekleştirildi.

Çalışmaya, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.05.2017 tarih ve 2017/05 sayılı kararıyla başlandı.

3.1. Materyal

Çalışmada ağırlıkları 180-200 g arasında değişen 42 adet erişkin (2 aylık) *Wistar* albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi. Sıçanlar araştırma süresince Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nde barınma odasında polikarbonat kafeslerde, her kafeste en fazla 7 hayvan olacak şekilde tutulmuştur. Deneysel süresince tüm sıçanlar standart pellet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Hayvanlar bu süre içerisinde su ve yem açısından herhangi bir sınırlandırmaya maruz bırakılmamışlardır. Muhafaza edildikleri oda, 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık olacak şekilde standartlar dâhilinde ayarlanmıştır. Ayrıca laboratuvarın oda sıcaklığı termometre, nemi ise higrometre ile ölçülerek sıcaklığın 23 ± 1 °C 'yi aşmaması için laboratuvar sürekli olarak aspiratör ile havalandırılmıştır.

3.2. Metot

Çalışmada oluşturulan toplam 6 grup her grupta 7 adet sıçan olacak şekilde aşağıdaki gibi işlemlere tabi tutulmuştur.

Kontrol grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara deneysel süresi olan 1 ay boyunca herhangi bir muamele yapılmadı.

UVA + UVB grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara özel olarak tasarlanmış ve kapağında UVA ve UVB lambalarının yer aldığı kabin içerisinde bir ay boyunca günde 2 saat süreyle UVA (1.25 mW/cm²) ve UVB (0.22 j/cm²) kombine olarak uygulandı. Kafes içerisinde yer alacak hayvanların bu lambalara uzaklığı 30 cm olarak belirlendi.

EA (Ellajik Asit) grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 50 mg/kg/gün ellajik asit bir ay boyunca gavaj yoluyla verildi.

SB (Silibinin) grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 50 mg/kg/gün silibinin bir ay boyunca gavaj yoluyla verildi.

UVA + UVB + EA grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlar bir ay boyunca günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVA ve UVB'ye aynı anda maruz bırakılarak, her UV uygulamasından önce 50 mg/kg/gün ellajik asit bir ay boyunca gavaj yoluyla verildi.

UVA + UVB + SB grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlar bir ay boyunca 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVA ve UVB'ye aynı anda maruz bırakılarak, her UV uygulamasından önce 50 mg/kg/gün silibinin bir ay boyunca gavaj yoluyla verildi.

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

Deney hayvanları traş makinası (CVS marka) ile önce sırt bölgelerinden yaklaşık 15 cm²'lik alanı kapsayacak şekilde kaba tüyleri traş edildi. Ardından geriye kalan tüylerin alınması için iyi kalite jilet (Gillette) ile tamamen temizlendi. Traşlama işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce yapıldı ve bunu takiben çalışmanın devam ettiği 30 gün içerisinde haftada 3 kez olmak şartıyla toplamda çalışma boyunca 21 kez deney hayvanları traşlandı. Uygulama gruplarının yanında kontrol grubu da olası standart sapmayı bertaraf etmek için aynı muameleye maruz bırakılmıştır.



Şekil 15. Sıçan sırt derisinin traş edilmesi

3.2.1. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar

TAS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics LOT:AS17078A)

TOS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics LOT:RL0024)

TUNEL kiti (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Applied Science,
Cat No: 000000011684817910, LOT:30967400)

Tablo 3. Deneyde kullanılan kimyasallar ve markaları

Kimyasalların Adları	Marka
EA (Ellajik asit)	Merck E2250
SB (Silibinin)	Merck S0417
Proteinaz K	Roche 03115828001
NaOH (Sodyum Hidroksit)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Potasyum dihidrojen fosfat)	Merck
Ketamin	Phizer
EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit)	Merck 324503
Serum Fizyolojik (%0,9'luk)	Polifarma
Formalin (%37'lik)	Tekkim
NaCl (Sodyum Klorür)	Merck
Na ₂ HPO ₄ (Disodyum dihidrojen fosfat)	Merck
H ₂ O ₂ (Hidrojen Peroksit)	Merck
Light Green SF Yellowish	Merck
Glasiyel Asetik asit (CH ₃ COOH)	Merck
Boncuk parafin	Leica
Metanol (CH ₃ OH)	Merck
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC, IHC Kromojen)	Merck
Su bazlı yapıştırıcı	Scytek Lab. AML030
Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat (NaH ₂ POH ₂ O)	Merck
Sodyum fosfat, dibazik, anhidröz (NaHPO ₄)	Merck
Harris's hematoksilen boya	Merck
Alüminyum amonyum sülfat (AlNH ₄ (SO ₄) ₂)	Merck
Merkürük oksit	Merck
Eosin Y	Merck
Etanol (C ₂ H ₅ OH, %96'luk)	Merck
Toluidin mavisi O	Merck
Ksilen (C ₈ H ₁₀)	Tekkim
İmmersiyon yağı	Merck

3.2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve bulunduğu yerler

Çalışmada kullanılan cihazların isimleri ve buldukları yerler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan mevcut cihazlar ve buldukları yerler

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli	Mevcut Olduğu Anabilim Dalı (AD.)
Precisa XR-205SM-DR Hassas Terazi	Biyoloji AD. Laboratuvarı
Hettich Universal 320 R Soğutmalı Santrifüj	Biyoloji AD. Laboratuvarı
Mettler Toledo Inlab Expert Pro-ISM Seven Excellence pH metre	Biyoloji AD. Laboratuvarı
Yellow Line Mekanik Homojenizatör	Biyoloji AD. Laboratuvarı
20 KHz Jencons Ultrasonik Homojenizatör	Biyoloji AD. Laboratuvarı
Radwag AS 220/X Hassas Terazi	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
GENESYS™ 10S UV-Vis Spektrofotometre - Thermo Fisher Scientific Spektrofotometre	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
TTS 3 digital yellow line vorteks	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
Aurigo Cerrahi Set	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
Otomatik pipet Socorex Swiss Brand	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
Siemens Derindondurucu Buzdolabı	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
WiseStir MSH-20A – Dijital Manyetik Karıştırıcı	Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarları
Zeiss, Axioskop 40 (Germany) Işık Mikroskobu	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Nikon Eclipse Ni (Amsterdam Netherlands) Işık Mikroskobu	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Dijital Fotograf Makinesi (Canon EOS 1000D)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Rotary Mikrotom – Kaset Tutuculu (Leica RM 2125 RT- Germany)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Distile Su Cihazı (Elektromag-M4)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Doku Yüzdürme Banyosu (Thermo Shandon)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Yarı Otomatik, Isıtma Tablalı Parafin Gömme Cihazı (Kunz Instrument WD-4)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Etüv (Nüve)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Çeker Ocak	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Derin Dondurucu Buzdolabı (Beko)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları
Yarı Otomatik Doku Takip Cihazı (Thermo Shandon-Citadel 2000)	Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları

3.2.3. Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması

Ellajik asit ve silibinin, steril serum fizyolojik (% 0,9) solüsyonunda süspanse edilerek intragastrik gavaj yoluyla, hayvan başına 1 cc olacak şekilde belirlenen dozlarda gruplardaki sıçan sayısına göre miktarları hesaplanarak, 30 gün boyunca her gün UVAB uygulamasından önce taze hazırlanarak verildi. Hayvanlarda verilen

maddelere karşı herhangi bir yan etki (kusma, diyare, uyuşukluk, uyku hali vb.) gözlenmedi.

Ellajik asit uygulanması: Çalışmada UVAB uygulamasından 30 dk önce, 3. ve 5. gruptaki hayvanlara 50 mg/kg EA gavaj yoluyla gün aşırı olarak verildi (Uzar ve ark., 2012).

Silibinin uygulanması: Çalışmada UVAB uygulamasından 30 dk önce, 4.gruptaki hayvanlara 100 mg/kg ve 6.gruptaki hayvanlara 50 mg/kg SB gavaj yoluyla gün aşırı olarak verildi (Muriel ve ark., 2005)

3.2.4. UVAB uygulanması

UVAB uygulaması için 65 cm eninde, 126 cm boyunda ve 30 cm yükseklik ebatında ve sıçanların standart kafeslerinin rahatlıkla sığabileceği özelliklerde önceden tasarlanmış ahşap UVAB kabini kullanıldı. Kabinin üst kapağına Philips markalı UVA (Philips TL-D 15W) (İnal ve ark., 2001) ve UVB (Philips TL 20W/01 RS) (Silva ve ark., 2014) lambaları monte edildi. 30 gün boyunca, günde 2 saat süreyle 30 cm uzaklıktan UVAB ışınları sıçanlara uygulandı. UVAB uygulaması süresince kabinin içine hayvanların su ve yemleri bırakılmadı. Gerekli koruyucu önlemler alınarak deney süresince sıçanların genel morfolojik ve fizyolojik durumları kontrol edildi.



Şekil 16. UVA Lambası



Şekil 17. UVB Lambası



Şekil 18. Deney hayvanlarına UVAB ışınının uygulanması

3.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması

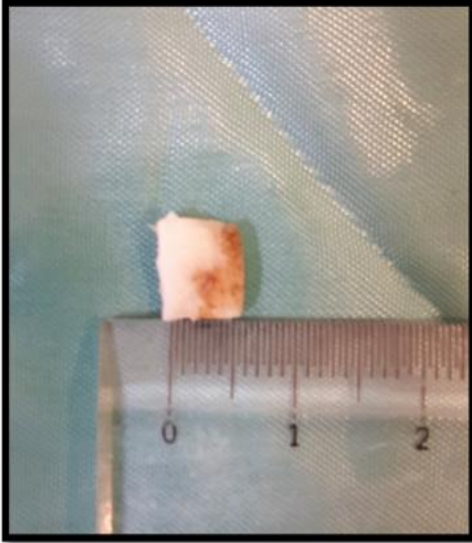
Doku örneklerinin alınması için; bütün gruptaki hayvanlara, EA, SB ve UVB uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra her sıçan için 100 mg/kg ketamin dozu i.p olarak enjekte edilerek anestezi uygulandı.

Biyokimyasal analizler için; toplanan deri dokusu örnekleri ise % 0.9'luk serum fizyolojikte yıkama işleminden geçirilerek laboratuvarında inceleme zamanına kadar -80 °C'de derin dondurucuda tutuldu. TAS ve TOS analizleri daha sonra elde edilen doku süpernatantlarında spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

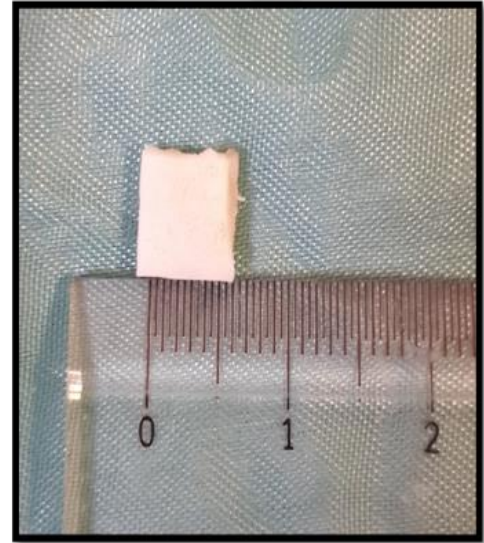
Stereolojik analizler için; 5x5 mm boyutunda (Miyachi ve ark., 1983) alınan deri dokusu örnekleri %10'luk nötral tamponlu formaldehitte bir hafta bekletildi.



Şekil 19. Sıçan sırt deri örneğinin alınması



Şekil 20. 5x5 mm'lik UVAB kesit

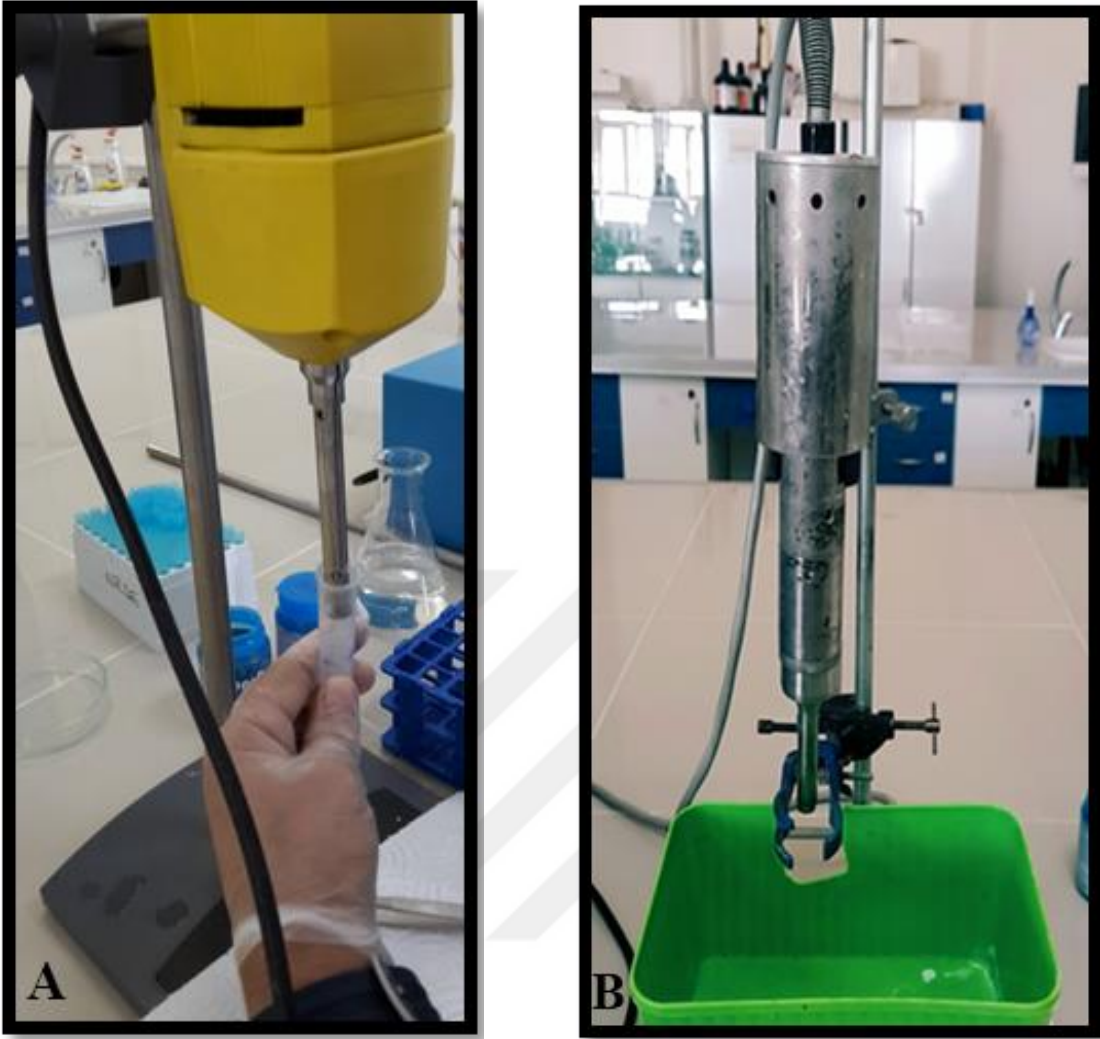


Şekil 21. 5x5 mm'lik Kontrol kesit

TUNEL boyama için; 5x5 mm boyutunda alınan alınan deri dokusu örnekleri ise % 10'luk nötral tamponlu formaldehitte 24 saat bekletildikten sonra PBS'de (pH 7.2) 48 saat boyunca yıkandı.

Doku homojenatlarının hazırlanması: Deney sonrası derin dondurucuda -80°C 'de bekletilen deri dokusu örnekleri oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak çözüldü. Dokularda antioksidan enzim tayini için doku ekstraksiyon işlemleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi (Xia ve ark., 1994).

- Ekstraksiyon için; 1.7 g KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat) ve 0,73 g EDTA pH 7,4 olacak şekilde 250 ml distile suda çözülerek doku homojenat tamponu hazırlandı.
- Her çalışma grubundan alınan 0,5 g doku örneği tartım kâğıtlarına konarak hassas terazide tartıldı ve steril bistüri yardımıyla ufak parçalara ayrıldı.
- Doku parçaları 16x100 mm ebatlarında dibi yuvarlak, yüksek mukavemet gücüne sahip polipropilen deney tüpü içine konarak üzerine 1 ml soğuk fosfat tampon eklendi ve ardından önce mekanik parçalayıcıda homojenize edildi.
- Elde edilen karışım soğuk tutulmak kaydıyla üzerine 2 ml soğuk fosfat tampon ekleyerek dokunun iyice parçalanması sağlandıktan sonra tekrar mekanik parçalayıcıda homojenize edildi.
- Daha sonra karışımın üzerine 2 ml daha soğuk fosfat tampon ekleyerek son durumda toplam 5 ml tampon olacak şekilde ultrasonik homojenizatörde homojenize edildi.
- Elde edilen homojenatlar uygun deney tüpleri içerisinde soğutmalı santrifüjde 9500 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 15 dk santrifüj edildi.
- Daha sonra elde edilen berrak süpernatantlar eppendorf tüplerine aktarılarak spektrofotometrik analizler için hazır hale getirildi.



Şekil 22. Doku homojenizasyonu (A: Mekanik ve B: Ultrasonik Homojenizatör)

3.4. Analizlerin Yapılması

3.4.1. Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm tayini

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

3.4.2. Total antioksidan seviyesi (TOS) ölçüm tayini

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

3.4.3. Oksidatif stress indeksi (OSI)’nin hesaplanması

Total oksidan seviye (TOS) / Total antioksidan seviye (TAS) şeklinde bölünerek oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı ve AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edildi (Kösecik ve ark., 2005).

3.5. TUNEL Boyama Yöntemi

3.5.1. Kimyasalların hazırlanması

Tablo 5. Fosfat Tamponu Hazırlanması (PBS: Phosphate Buffered Saline, pH: 7,2)

NaCl (Sodyum klorür)	8,5 g
Na ₂ HPO ₄ (Disodyum dihidrojen fosfat)	1,910 g
KH ₂ PO ₄ (Potasyum dihidrojen fosfat)	0,380 g

Yukarda belirtilen miktarlardaki maddeler oda sıcaklığında 1000 ml distile suda karıştırılarak iyice eritilir. Sonra hazırlanmış karışımın pH 7,2’ye ayarlanır.

Hazır Solüsyon Fosfat Tamponu Hazırlanması: 20X ‘lik hazır PBS karışımından 50 ml alınarak üzeri 950 ml distile suya tamamlandı.

H₂O₂ (Hidrojen peroksit) Hazırlanması (%3): 9 ml H₂O₂ alınır üzerine 300 ml metanol eklenir.

Tablo 6. Light green SF boya solüsyonu hazırlanması:100 ml için solüsyon karışımı

Light Green SF Yellowish toz boya	0.2 g
Distile su	100 ml
Asetik asit % 1’lik	0.2 ml

Yukardaki miktarlar çözülür ve filtre kâğıdından geçirilerek boyamaya hazır hale gelir.

Tablo 7. Asetik asit % 1'lik hazırlanması için 1000 ml karışım

Asetik asit % 100	10 ml
Distile su	990 ml

Taze hazırlanmış boya solüsyonları kullanılmadan önce filtre edildi.

PBS'de yıkandıktan sonra deri dokuları doku takip kasetlerine düzgün şekilde yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen sürelerde yarı otomatik doku takip cihazında (Thermo Shandon-Citadel 2000) doku takibi yapıldı.

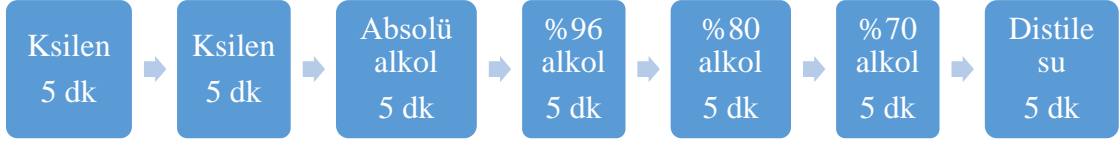
Tablo 8. TUNEL metodu doku takip işlem basamakları

% 70'lik etanol	90 dk	Suyunu alma
% 80'lik etanol	90 dk	Suyunu alma
% 90'lik etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık a etanol	60 dk	Suyunu alma
Absolü alkol	60 dk	Suyunu alma
Ksilen	60 dk	Saydamlaştırma
Ksilen	90 dk	Saydamlaştırma
Ksilen	90 dk	Saydamlaştırma
Parafin	90 dk	Parafinizasyon
Parafin	90 dk	Parafinizasyon

Doku takibinden sonra sertleşmiş doku örnekleri katlanmış kenarları düzeltildikten sonra gömme kalıbının içerisine dikey konumda olacak şekilde gömülerek parafin bloklar haline getirildi.

Çalışmada TUNEL boyama için her hayvana ait deri dokusu örneklerinden 5 µm kalınlığında 1'er kesit alındı. Parafin kesitler 35–40 °C sıcaklıktaki su banyosuna (benmari) atıldı ve kesilme esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlandı. Su banyosunda doku kesitleri lisenli lam yardımıyla sudan alındı.

Lisinli lama alınan doku kesitleri 58 °C 'lık etüvde 60 dk bekletildi. Daha sonra parafini dokulardan tamamen uzaklaştırmak için preparatlar aşağıdaki ksilen ve alkol serilerden geçirilerek rehidrasyon işlemi yapıldı.



Şekil 23. TUNEL boyama rehidrasyon serileri

3.5.2. TUNEL boyama protokolü

DNA fragmantasyonu TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling kiti (In Situ Cell Death Detection Kitl Roche Diagnostics; Cat. No. 11 684 817 910, LOT: 30967400) ile gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoksinükleotidil transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmanite nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır. Bu yöntem DNA kırığının antikör ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır.

- Rehidrasyondan sonra preparatlara aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.
- PBS'de yıkama 2x3 dk
- %0,1'lik Proteinaz K (Roche) damlatılarak oda sıcaklığında 30 dk inkübasyon
- Tekrar PBS'de 2x5 dk yıkama
- Metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda ısısında 15 dk inkubasyon
- Tekrar PBS'de 2x5 dk yıkama
- Preparatlar buharlı kabin içerisinde ve üzerlerine işaretleme tepkimesi için Terminal Deoksi Transferaz (TdT) reaksiyon karışımı damlatılarak oda sıcaklığında 60 dk inkübasyon
- Negatif kontrollere ise TdT enzim içermeyen solüsyondan damlatma
- Sonra preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkama
- Ardından her bir preparata oda sıcaklığında 30 dk inkübe etmek üzere converter-POD solüsyonu ekleme

- PBS'de 2x5 dk yıkama
- Renk reaksiyonu için aminoethyl carbasole (AEC) kromojeni (Genemed, Cat. No: 54-0022 USA) boyama ve 5 dk inkübasyon
- Preparatları 3x3 dk PBS'de yıkama
- Çeşme suyunda 3x3 dk yıkama
- Zemin boyaması yapılması (Lamların üzerine Light Green boyası damlatma ve 7 dk bekleme)
- Son olarak çeşme suyunda 3x3 dk yıkama
- Su bazlı yapıştırıcı (Aqueous Mount- Scytek Laboratories, AML030) ile kapatılarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51) inceleme

3.6. Stereolojik İncelemeler

3.6.1. Kimyasalların Hazırlanması

Tablo 9. Nötral Tamponlu formalin (NTF) Hazırlanması

% 40 'lık formalin	100 ml
Distile su	900 ml
Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat (NaH ₂ POH ₂ O)	4 g
Sodyum fosfat, dibazik, anhidröz (NaHPO ₄)	6,5 g

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak istenilen NTF tespit solüsyonu hazırlanır.

Tablo 10. Harris'in hematoksilen boya solüsyonu hazırlanması (Bancroft ve Cook, 1994)

Harris'in hematoksilen	5 g
Absolu alkol	50 ml
Alüminyum amonyum sülfat	100 g
Distile su	1000 ml
Merkürük oksit	2,5 g

- Hematoksilen alkol içinde hafif ısıda eritilir.
- Alüminyum amonyum sülfat ısı yardımıyla distile su içinde eritilir.
- İkişi geniş bir erlenmayerde karıştırılır.
- Hızla kaynatılır, ısıdan alınır.
- Kabarcıklar çıkarken cıva oksit azar azar ilave edilir.
- Çözelti koyu mor renk alınca cam kap dıştan soğuk suya tutularak soğutulur.
- Böylece boyamaya hazır hâle gelir. Fakat 2-3 gün bekletilirse daha olgunlaşır. Olgunlaşmış çözelti koyu renkli şişelere alınıp ağzı sıkıca kapatılarak karanlık yerde saklanır.
- Boya kullanılacağı zaman % 4 oranında glasiyel asetik asit eklenir.

Tablo 11. Eozin Boya Solüsyonu Hazırlanması (Bancroft ve Cook, 1994)

Eozin Y	10 g
Distile su	200 ml
% 96'lık alkol	800 ml

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak stok eozin boya solüsyonu hazırlanır.

Tablo 12. Kullanıma Hazır Eozin Boya Solüsyonu

Stok eozin solüsyonu	250 ml
% 80'lik alkol	750 ml
Glasiyel asetik asit	5 ml

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak kullanıma hazır eozin boya solüsyonu hazırlanır.

Tablo 13. Stok solüsyonunun Hazırlanması (Bancroft ve Cook, 1994)

Toluidin Mavisi O (% 1)	1 g
%70'lik alkol	100 ml

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak toluidin mavisi stok boya solüsyonu hazırlanır.

Tablo 14. Sodyum klorür (NaCl) çözeltisi hazırlanması (%1'lik)

NaCl	0,5 g
Distile su	50 ml

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak pH: 2-2,5 arasında taze NaCl çözeltisi hazırlanır.

Tablo 15. Toluidin mavisi çalışma solüsyonunun hazırlanması (Bancroft ve Cook, 1994)

Toluidin mavisi stok solüsyonu	5 ml
%1 'lik NaCl	45 ml

Yukardaki belirtilen miktarlar istenilen oranda karıştırılarak taze ve tekrar kullanımlık Toluidin mavisi çalışma solüsyonu hazırlanır.

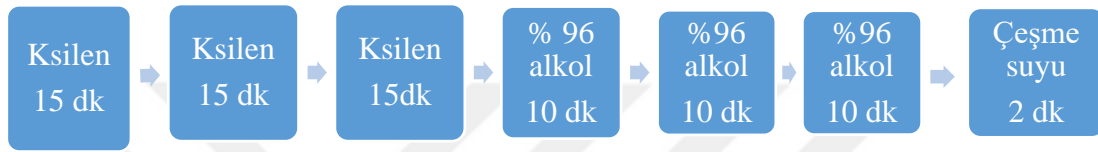
3.6.2. Stereolojik analizler için doku takibi

Stereolojik analizler için deney hayvanlarından alınan deri dokusu örnekleri % 10'luk nötral tamponlu formalinde bir hafta boyunca tespit edildi. Tespit sonrası doku örnekleri çeşme suyunda bir gün boyunca yıkandıktan sonra doku takip kasetlerine düzgün şekilde yerleştirildi ve aşağıda belirtilen sürelerde yarı otomatik doku takip cihazında (Thermo Shandon-Citadel 2000) doku takibi yapıldı. Doku takibinden sonra sertleşmiş doku örnekleri katlanmış kenarları düzeltildikten sonra gömme kalıbının içerisine dikey konumda olacak şekilde gömülerek parafin bloklar haline getirildi.

Tablo 16. Rutin histolojik doku takip işlem basamakları

% 70'lik etanol	90 dk	Suyunu alma
% 80'lik etanol	90 dk	Suyunu alma
% 90'lık etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık etanol	60 dk	Suyunu alma
% 96 'lık a etanol	60 dk	Suyunu alma
Absolü alkol	60 dk	Suyunu alma
Ksilen	60 dk	Saydamlaştırma
Ksilen	90 dk	Saydamlaştırma
Ksilen	90 dk	Saydamlaştırma
Parafin	90 dk	Parafinizasyon
Parafin	90 dk	Parafinizasyon
Toplam süre	15 saat	

Çalışmada stereolojik analizler için tüm gruplardaki hayvanlardan alınan deri dokusu örnekleri 5 µm kalınlığında her 60. kesit olmak üzere yaklaşık toplam 12-14 arasında değişen ardışık kesitler halinde, parafin bloktaki tüm doku bitene kadar mikrotomda alındı. Alınan bu kesitler 35–40 °C sıcaklıktaki su banyosuna atıldı ve kesilme esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlanarak rodajlı lam yardımıyla sudan alındı. Lama alınan doku kesitleri 58 °C 'lık etüvde 60 dk bekletildi. Daha sonra parafini dokulardan tamamen uzaklaştırmak için preparatlar aşağıdaki ksilen ve alkol serilerden geçirilerek rehidrasyon işlemi yapıldı.



Şekil 24. Rutin histolojik boyama rehidrasyon serileri

Hemotoksilen-Eozin (H&E) Boyama: Ardışık alınan kesitlerde deri dokusunun epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi ve yüzde (%) hacimlerinin stereolojik analizler yardımıyla ölçülebilmesi için H&E boyama yapıldı.

Deparafinizasyon işlemi sonra kesitlere gerekli boyama prosedürü uygulandı.

Tablo 17. H&E ile boyanma prosedürü

Hematoksilen boyama	1 dk
Çeşme suyunda yıkama	2 dk
Eozin boyama	30-45 sn
Çeşme suyunda yıkama	2 dk
Alkol (%96'lık)	5+5 dk
Ksilen	5 dk
Kapatma (Entellan)	

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

Masson Trikrom Boyama: Masson tarafından tanımlanan için bir yöntemdir ve Masson'un adı ile anılır (Bancroft ve Cook, 1994). Deri dokusunun tabakalarının genel

hatlarının ayırt edilebilmesi için her hayvandan bir veya iki adet kesit alındı ve bu kesitler Masson Trikrom Boyama Seti (Bio-Optica, Masson trichrome with aniline blue, Code: 04-010802) ile boyandı. Deparafinizasyon işlemi sonra kesitlere kit boyama protokolü uygulandı.

Kitte bulunan ayraçlar

A) Weigert'in demirli hematoksilin - A solüsyonu	18 ml
B) Weigert'in - demirli hematoksilin - B solüsyonu	18 ml
C) Alkollü pikrik asit solüsyonu	30 ml
D) Mallory'nin Ponceau acid fuchsin (Biebrich Scarlet) solüsyonu	30 ml
E) Phosphomolybdic asit solüsyonu	30 ml
F) Masson'un anilin mavisi	30 ml

Weigert'in demirli hematoksilini çekirdeği, pikrik asit eritrositleri, asit boya karışımı (asit fuksin-ponceau ksilidin) sitoplazmayı ve anilin mavisi ise bağ dokusunu boyar.

Kit Boyama Protokolü

- Kesitlerin üzerine sırayla 6 damla A ayracı ve 6 damla B ayracı konarak 10 dk bekletilir.
- Boya yıkanmadan kesit üzerinden akıtılarak giderilir.
- Kesitlerin üzerine 10'ar damla C ayracı konularak 4 dk beklenir.
- Kesitler distile suya 3-4 sn batırılıp çıkartılarak yıkanır.
- Üzerlerine 10'ar damla D ayracı konularak 2 dk bekletilir.
- Kesitler distile su ile yıkanır.
- Kesitlerin üzerine 10'ar damla E ayracı konularak 10 dk beklenir.
- Boya yıkanmadan kesit üzerinden akıtılarak giderilir.
- Kesitlerin üzerine 10'ar damla F ayracı konularak 10 dk beklenir.
- Kesitler distile su ile yıkanır.
- Kesitler 2-3 kez alkole batırılır.
- Kesitler kurduktan sonra ksilende 5 dk bekletilir ve entellan ile kapatılır.

Toluidin Mavisi ile Boyama: Mast hücreleri bağ dokusunda bulunur ve sitoplazması, heparin ve histamin içeren granüller (metakromatik) içerir. Toluidin mavisi, mast hücrelerini kırmızı-mor (metakromatik boyama) ve arka planı ise mavi yani ortokromatik boyar. Metakromazi ise hücrelerin boya çözeltisinden farklı bir renkle boyanma esasına dayanır (Bancroft ve Cook, 1994). Hücrelerin boyanma özellikleri ise doku elemanlarının pH'ına, boyanın konsantrasyonuna ve bazik boya sıcaklığına göre farklılık göstermektedir. Mavi veya mor boyalar kırmızı renk kayması gösterir ve kırmızı boyalar metakromatik doku elemanları ile sarı renk kayması gösterir (Bancroft ve Cook, 1994). Çalışmada ardışık alınan kesitlerde deri dokusundaki dermal

bağ dokusu mast hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi ve fiziksel disektör yöntemi ile sayılabilmeleri için toluidin mavisi boyaması yapıldı.

Deparafinizasyon işlemi sonrası kesitlere aşağıdaki boyama protokolü uygulandı.

- Toluidin Mavisi ile boyama 1-2 dk
- Distile suda yıkama 2 dk
- Alkolde (%70'lık) dekolore etme 3 dk
- Ksilen 3 dk
- Kapatma (Entellan)

Sonuçta dermal mast hücreleri mor menekşe veya erguvan renginde, zemin ise mavi veya tonları boyanır.

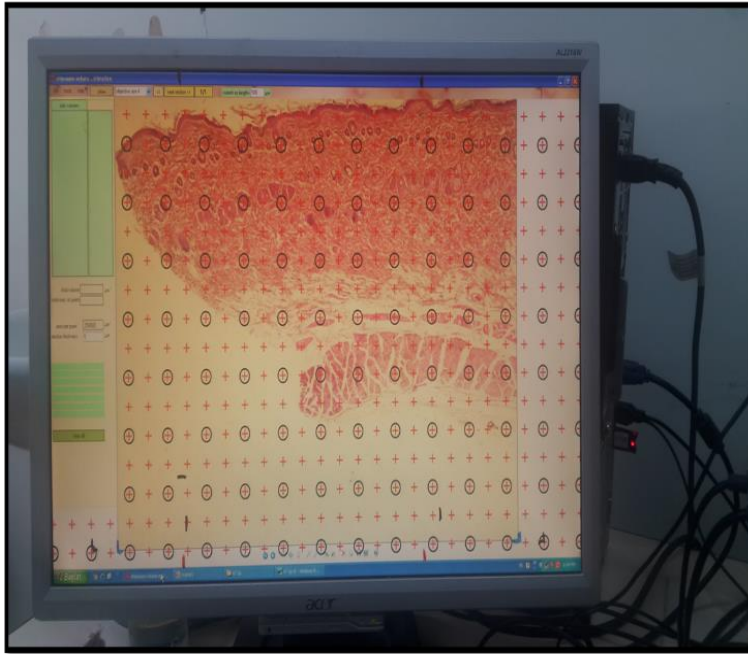
3.7. Doku preparatlarının incelenmesi

Tüm stereolojik analizler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı (Şekil 25). Ardışık kesitler üzerinde stereolojik metotlardan olan fiziksel parçalama uygulayarak partikül sayımları etkin ve tarafsız bir şekilde elde edildi.



Şekil 25. Stereolojik işlemlerin yapıldığı ışık mikroskobu laboratuvarındaki stereoloji analiz sistemi

Hacim Hesaplamaları Analizleri: Hazırlanan doku preparatları Nikon Eclipse Ni marka fotoataçmanlı trinoküler (Amsterdam, Netherlands) ışık mikroskopunda 4x Nikon Plan objektif kullanılarak fotoğrafları alındı. Kesit alınan örneklerdeki deri tabakalarının hacim oranları (%) Cavalieri Prensibi 'ne göre noktalı alan ölçüm cetveli kullanılarak ışık mikroskopunda (Zeiss Axioskop 40 (Germany), Canon EOS 1000D kamera ataçmanlı, 4X Achroplan objektif) yapıldı. Bu analizler için Shtereom ® 1.5 yazılım paket programı (Design Based Unbiased Stereology Software, Denizli) seçildi. (Gundersen ve Jensen, 1997).



Şekil 26. Shtereom ® 1.5 sürüm paket programında noktalı alan cetveli

Hacim yoğunluğunu hesaplama formülü

Epidermis /Toplam Hacim Oranı (%): Kesit örneklerindeki epidermise denk gelen noktaların kapladığı alan / Örneklerdeki derinin tüm tabakalarına denk gelen noktaların kapladığı alan

Dermis /Toplam Hacim Oranı (%): Kesit örneklerindeki dermise denk gelen noktaların kapladığı alan/ Örneklerdeki derinin tüm tabakalarına denk gelen noktaların kapladığı alan

Hipodermis /Toplam Hacim Oranı (%): Kesit örneklerindeki hipodermise denk gelen noktaların kapladığı alan / Örneklerdeki derinin tüm tabakalarına denk gelen noktaların kapladığı alan

Sayısal Yoğunluk Analizleri: Dermal mast hücre sayısal yoğunluk hesaplaması için fiziksel disektör- Cavalieri metodu uygulandı. Nikon Eclipse Ni marka Nikon DS-Fi2 kameralı ışık mikroskopunda 100X, NA =1,25 Nikon Plan objektif kullanıldı. Her grupta rastgele olarak alınan birinci kesitin ardından her 60. ardışık çift seri kesit sistematik alınarak oluşturuldu. Her hayvana ait alınan deri örneğinden yaklaşık 12-15 örnek kesit alınarak dermal mast hücre sayısal yoğunluğu hesaplandı (Gundersen ve Jensen, 1987; West ve ark., 1991). Kesit çiftlerinden mikrometrik oküler yardımıyla sistematik rastgele olarak yatay ve dikey konumda 50 µm x 50 µm adım aralığı ile alan örnekleme yapılarak ilk kesitte olup ikinci kesitte bulunmayan hücreler sayıma dâhil edildi. Hücre sayımında kullanılan sayım çerçevesinin alanı 1,081,75 µm² olarak ölçüldü.

Dermal mast hücre sayımı için aşağıdaki sayısal yoğunluk formülü kullanıldı.

$$N_v = \Sigma Q^- / \Sigma V_{dis}$$

N_v : Sayısal yoğunluk

ΣQ^- : Bir hayvana ait kesitlerde görülen toplam hücre sayısı

ΣV_{dis} : Bir hayvana ait kesitlerde kullanılan toplam disektör hacmi

3.7.1. Çalışmada hacim hesaplamalarında hata katsayısının (HK) hesaplanması

Bir bireydeki stereolojik analizin kabul edilebilir sınırdan olup olmadığı HK hesaplanması ile belirlenir (Gundersen ve Jensen, 1987). Hacim hesaplamalarında HK değerinin %5'den küçük ya da eşit olması hedeflenir (Gundersen ve Jensen 1987; Gundersen ve ark 1999; Garcia-Finana ve ark., 2003; Şahin ve ark., 2001). Deneydeki her gruptaki hayvan sayısı yeterlik testi için ise değişim katsayısı (DK) hesaplaması yapılarak biyolojik varyasyona bağlı değişiklikler dikkate alınarak gruptaki hayvanların

sayısının yeterli olup olmadığı belirlendi. Bu şekilde her grupta bulunması gereken optimum hayvan sayısı da belirlendi.

3.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için Microsoft® IBM SPSS Sürüm 21.0 paket programı kullanılarak üzerinde durulan değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Non-parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Önem derecesi bütün testler için $p<0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi

Deneyin başladığı günden itibaren 10., 20. ve 30. günde düzenli yapılan ağırlık tartımları sonucu elde edilen verilerden aşağıdaki formül kullanılarak tüm gruptaki sıçanların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdeleri hesaplandı.

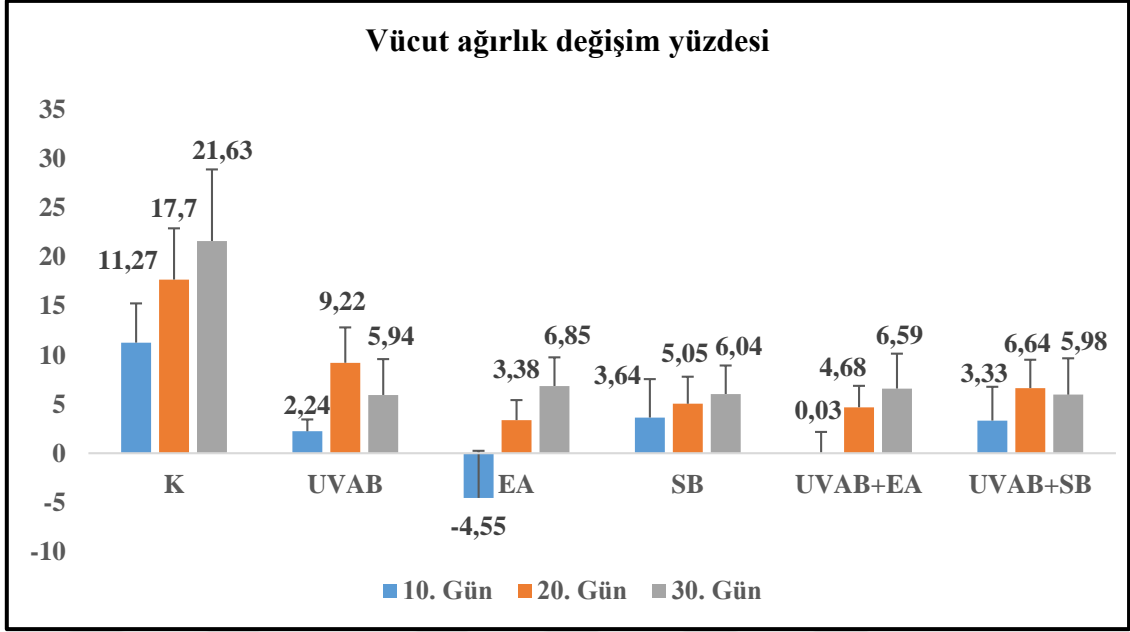
$$\text{Vücut ağırlık değişim yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Son ağırlık} - \text{İlk ağırlık}}{\text{İlk ağırlık}} \times 100$$

Gruplar:

Kontrol (K); UVA ve B (Ultraviyole A ve B) ; EA (Ellajik asit) ; SB (Silibinin); UVAB+EA (Ultraviyole A ve B + Ellajik asit) ve UVAB+SB (Ultraviyole A ve B + Silibinin) olarak adlandırılmıştır.

UVA ve B'nin uygulandığı gruplarda yer alan sıçanların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde (10., 20. ve 30. gün) , kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.05$).

Kontrol grubunun vücut ağırlık değişim yüzdesinde ise (10., 20. ve 30. gün) , EA ve SB verilen gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p < 0.05$).



Şekil 27. Vücut ağırlık değişim yüzdesi. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

Tablo 18. 10. , 20. ve 30. gün vücut ağırlıkları değişim yüzdelерinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

Gruplar (10. Gün)	Ort.	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	<i>p</i>
K	11,27 ^c	4	12,16	6,32	15,47	0,001
UVAB	2,24 ^b	1,20	2	,97	4,39	
EA	-4,55 ^{ab}	4,80	-3,33	-12,24	1,03	
SB	3,64 ^b	3,91	3,40	-1,14	10,46	
UVAB+EA	0,03 ^a	2,15	-0,11	-2,10	3,40	
UVAB+SB	3,33 ^b	3,44	4,21	-2,38	6,97	
Gruplar (20. Gün)	Ort.	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	<i>p</i>
K	17,70 ^b	5,23	16,47	11,84	26,19	0,002
UVAB	9,22 ^a	3,61	9,41	4	13	
EA	3,38 ^a	2,04	3,09	1,08	6,59	
SB	5,05 ^a	2,75	5,60	1,23	8,05	
UVAB+EA	4,68 ^a	2,20	4,39	1,89	7,95	
UVAB+SB	6,64 ^a	2,89	6,12	3,16	9,68	
Gruplar (30. Gün)	Ort.	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	<i>p</i>
K	21,63 ^b	7,29	20,27	13,16	33,33	0,029
UVAB	5,94 ^a	3,66	5,88	0,95	9,89	
EA	6,85 ^a	2,92	5,56	3,23	11,34	
SB	6,04 ^a	2,99	5,68	2,8	10	
UVAB+EA	6,59 ^a	3,56	7,69	0,94	10,53	
UVAB+SB	5,98 ^a	3,69	7,61	1,02	9,52	

^{a, b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ olduğundan farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.1.1. Klinik bulgular

Bütün gruplarda yem ve su tüketimi normal olarak izlendi. UVAB'ye maruz bırakılan sıçanlarda traş edilen sırt bölgelerinde deride aşırı bir kalınlaşma bazı sıçanlarda ise kalınlaşma dışında derilerinde çatlama ve kanama gözlemlendi. Ratlar UV kabinine bırakıldıktan sonra gözlerini kıstımlardır. Bazı ratların gözlerinde kanama kulaklarında pörsüme ve kızarma gözlemlenmiştir.

4.2. Makroskopik Bulgular

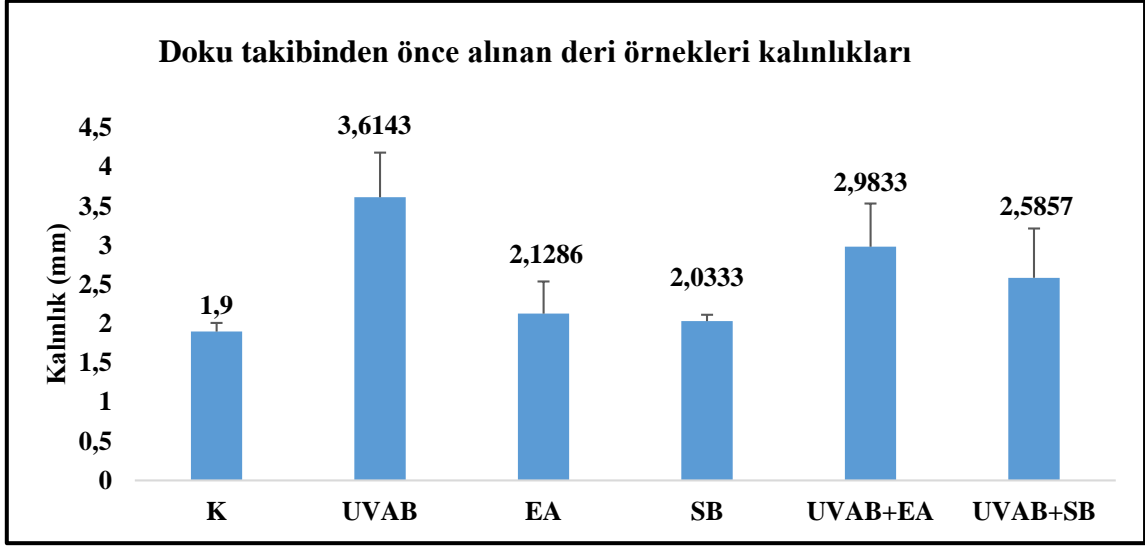
UVA ve B'nin deride oluşturduğu morfolojik hasara karşı, EA ve SB'nin koruyucu etkisini *in vivo* olarak incelediğimiz bu çalışmadan elde edilen makroskopik bulgular tablolar ve grafikler halinde kendi içinde başlıklara ayrılmış şekilde aşağıda verilmiştir.

Gruplar; K, UVAB, EA, SB, UVAB+EA ve UVAB+SB olarak adlandırılmıştır.

Tablo 19. Doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıklarının dağılımı ve istatistiksel veriler

Gruplar	Ort.	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	<i>p</i>
K	1,9 ^a	0,11	1,9	1,7	2	< 0.001
UVAB	3,61 ^d	0,57	3,6	3	4,5	
EA	2,12 ^{ab}	0,41	2	1,8	3	
SB	2,03 ^a	0,08	2	2	2,2	
UVAB+EA	2,98 ^c	0,55	3,1	2	3,6	
UVAB+SB	2,58 ^{bc}	0,63	2,4	2,2	4	

^{a,b,c,d}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ olduğundan farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 28. Doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıkları

UVAB'nin uygulandığı gruplarda yer alan sıçanların histolojik doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Kontrol grubunda yer alan sıçanların histolojik doku takibinden önce alınan deri örneklerinin kalınlıkları, EA ve SB verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı saptandı.

UVAB+EA ve UVAB+SB tedavi gruplarında yer alan sıçanların histolojik doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıklarında UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Deney sonu (30.gün) makroskopik bulgular: UVAB uygulaması yapılmayan (Şekil 29) Kontrol grubu, EA grubu ve SB grubu sıçan sırt derilerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. UVAB grubunda, UVAB+EA grubu ve UVAB+SB grubu tedavi gruplarına kıyasla sıçan sırt derilerinde yoğun eritem ve skar oluşumları görüldü (Şekil 30). UVAB iridasyonu sonrası tedavi gruplarında (UVAB+EA ve UVAB+SB) ise UVAB grubuna kıyasla daha az eritem ve skar oluşumları saptandı (Şekil 30).



Şekil 29. Sıçan dorsal derisinde UVAB uygulaması yapılmayan kontrol grubu ve madde verilen gruplara ait makroskobik görünümü (30.gün). K (Kontrol) grubu; EA (Ellajik asit) grubu; SB (Silibinin) grubu

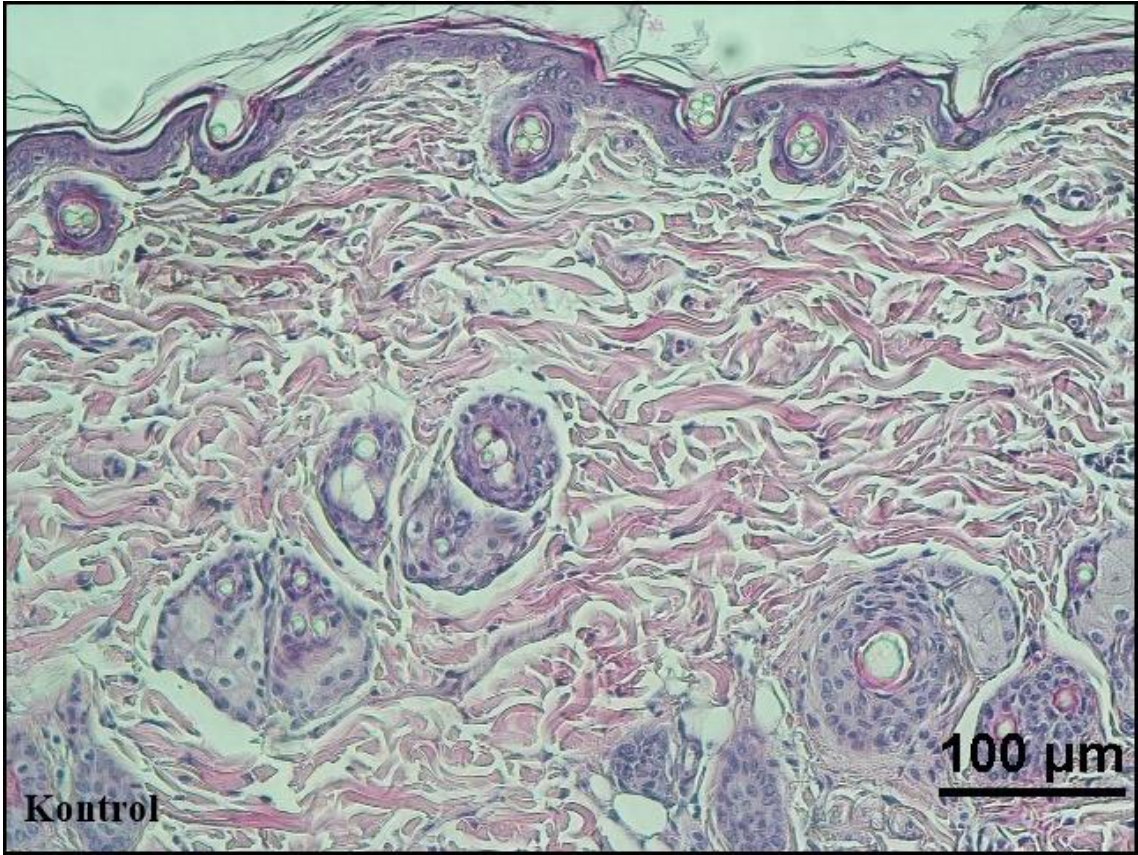


Şekil 30. Sıçan dorsal derisinde UVAB'nin uygulaması sonrası UVAB grubu ve tedavi gruplarına (UVAB+EA grubu ve UVAB+SB grubu) ait makroskobik görünüm (30.gün). UVAB uygulaması ile eritem ve yara oluşum alanı (ok). UVAB grubu (Ultraviyole A ve B) ;UVAB+EA (Ultraviyole AB + Ellajik asit) grubu; UVAB+SB (Ultraviyole AB + Silibinin) grubu

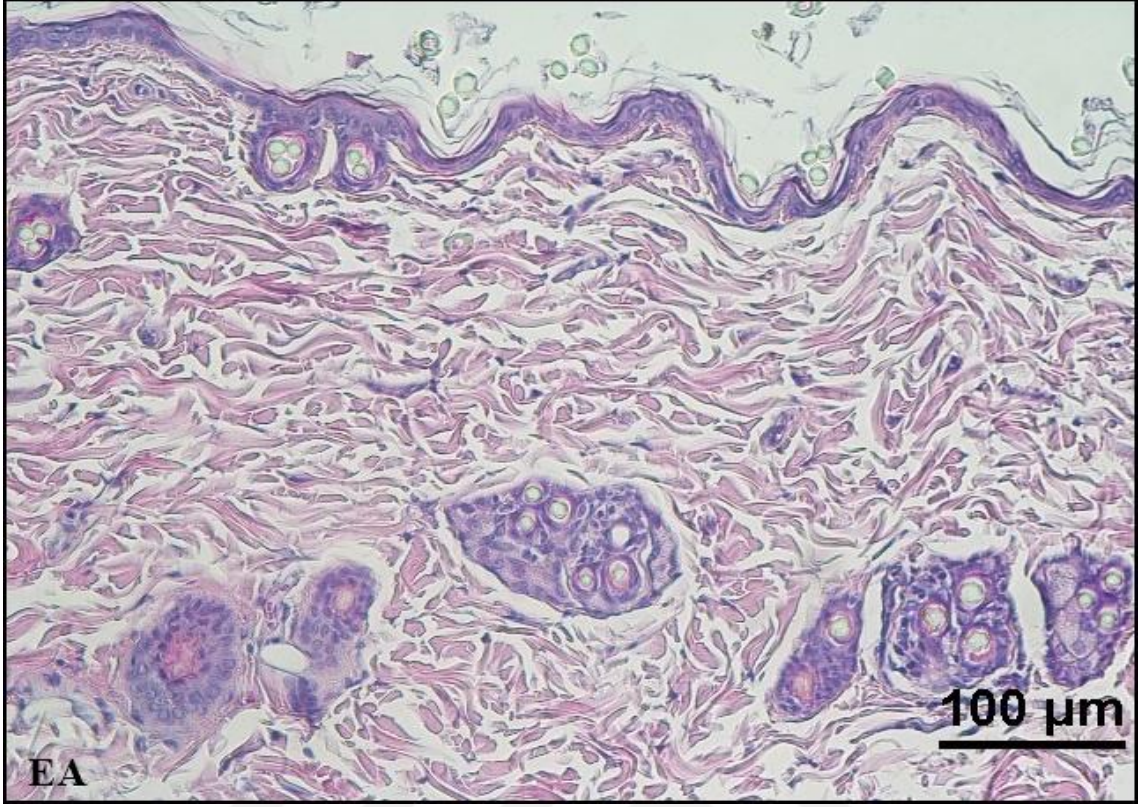
4.3. Histopatolojik Bulgular

H&E boyama bulgularına göre UVAB uygulaması yapılmayan Kontrol, EA ve SB gruplarının deri cilt dokularının histolojik incelenmesinde, dermis ve epidermis tabakalarında herhangi bir değişiklik görülmedi. Normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 31, 32 ve 33). UVAB uygulanan grupta bulunan ratların cilt dokularında, epidermiste keratinositlerde ve epitellerde proliferasyon, epitel hücrelerinde hidropik

dejenerasyon, papillar uzantılarda artış, ter bezi epitellerinde dejenerasyon, damarlarda hiperemi, epitellerde akantozis görüldü (Şekil 34). Dermiste fibrositlerin azaldığı ve fibroblastların arttığı, aktif kollajen oluştuğu görüldü (Şekil 34). Derinin elastikiyetinin azaldığı belirlendi (Şekil 34). UVAB +EA tedavi grubunda (Şekil 35) ise keratinositlerde ve epitellerde hafif proliferasyon görüldü. Dermisteki papillar uzantılarda artış ve akantozis görülmedi. UVAB grubuna kıyasla daha az hasar ve kollojen biraz daha olgunlaştığı görüldü. UVAB grubuna kıyasla daha az epidermal proliferasyon saptandı (Şekil 35). UVAB +SB tedavi grubunda (Şekil 36) ise keratinositlerde proliferasyon, papillar uzantılarda artış, akantozis görülmedi. Epidermisteki epitel hücrelerinde çok az sayıda eptellerde hidropik dejenerasyon, dermiste çok hafif yangı hücrelerine, papiller dermiste fibrositlerin azaldığı ve fibroblastların arttığı, ayrıca dermisteki kollajen yapısının aktif kollajene dönüştüğü tespit edildi. UVAB grubuna kıyasla daha az epidermal proliferasyon saptandı. UVAB grubuna kıyasla daha az hasar görüldü (Şekil 36) .



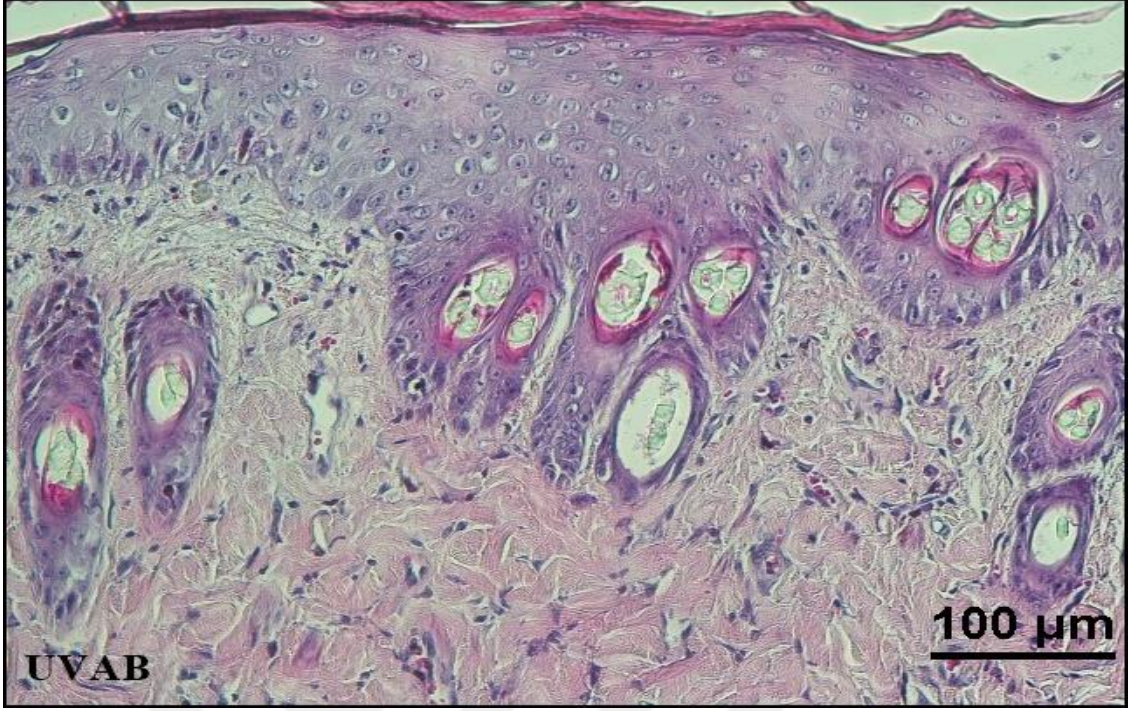
Şekil 31. Kontrol grubu, deri, dermis ve epiderminin normal histolojik görünümü, H&E.



Şekil 32. EA (Ellajik asit) grubu, deri, dermis ve epiderminin histolojik görünümü, H&E.



Şekil 33. SB (Silibinin) grubu, deri, dermis ve epiderminin histolojik görünümü, H&E.



Şekil 34. UVAB (Ultraviyole A ve B) grubu, deri, epidermiste keratinositlerde ve epitellerde proliferasyon, epitellerde hidropik dejenerasyon, dermiste, fibroblastça zengin sıkı bir kollajen, damarlarda hiperemi, H&E.



Şekil 35. UVAB+EA (Ultraviyole AB+ Ellajik asit) grubu, deri, epiderminin keratinositlerde ve epitellerde hafif proliferasyon, kıl folikül eepitellerinde çok az hücrede hidropik dejenerasyon, dermiste fibrositlerce zengin gevşek bağdoku, H&E.



Şekil 36. UVAB +SB (Ultraviyole AB+ Silibinin) grubu, deri, epidermiste keratinositlerde ve epitellerde orta düzeyde proliferasyon, dermiste, kısmen sıkı bağdoku ve çoğunluğu fibroblastlardan oluşan kollajen, H&E.

4.4. İmmunohistokimyasal (TUNEL) Bulgular

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) tekniği apoptotik hücrelerde DNA zincir kırıklarını tespit edip görüntülemek için kullanılır. Apoptozisin erken safhasında oluşan DNA zincir kırıkları, modifiye edilmiş nukleotidlerle serbest 3'-OH terminallerinin enzimatik olarak işaretlenmesi ile belirlenir (Walker ve Quirke, 2001).

UVAB irrasyonu sonucu deride oluşan apoptotik hasara karşı, EA ve SB'nin antiapoptotik etkisinin *in vivo* olarak incelediğimiz bu çalışmadan elde edilen bulgular şekiller halinde aşağıda verilmiştir.

Gruplar; K, UVAB, EA, SB, UVAB+EA ve UVAB+SB olarak adlandırılmıştır.

Kontrol grubu: Epidermiste TUNEL pozitif hücelere genel olarak rastlanmamıştır. Bazı kıl folikülü epitellerinde TUNEL pozitif reaksiyon veren hüceler

gözenmiştir (Şekil 37). Fakat bu pozitiflikler diğer gruplarla kıyaslandığında negatif olarak değerlendirilmiştir.

EA grubu: Genel olarak epidermiste ve kıl folikül epitellerinde TUNEL pozitif hücre sayısı negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 38).

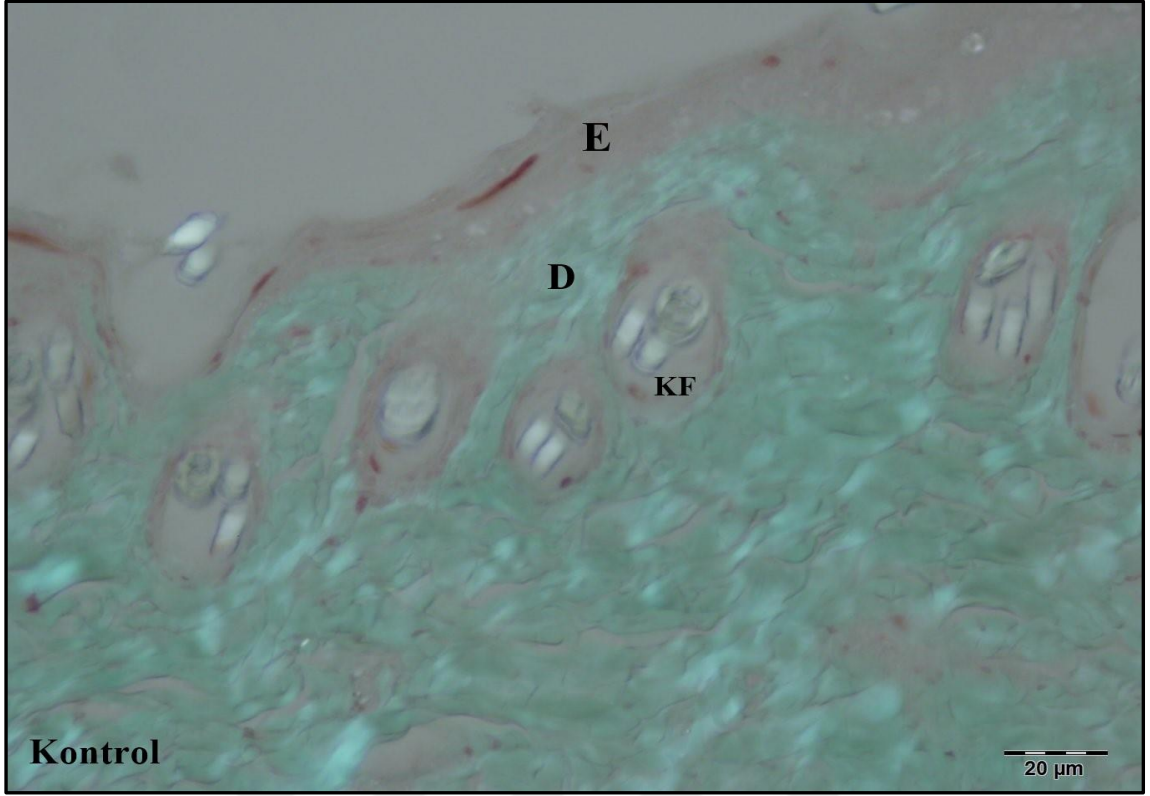
SB grubu: Kontrol grubuna benzer görünüm hâkimdir. Epidermiste ve kıl folikülü eptel hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısı negatif olarak belirlenmiştir (Şekil 39).

UVAB grubu: Epidermiste özellikle proliferen olan epitellerde şiddetli düzeyde TUNEL pozitifliklere rastlandı. Ayrıca dermiste, kıl folikül epitellerinde, fibrosit ve fibroblastlarda TUNEL pozitif reaksiyon gösteren pek çok hücreler tespit edildi. Epidermiste TUNEL pozitif hücre tedavi gruplarına (UVAB+EA ve UVAB+SB) göre daha yoğundur (Şekil 40).

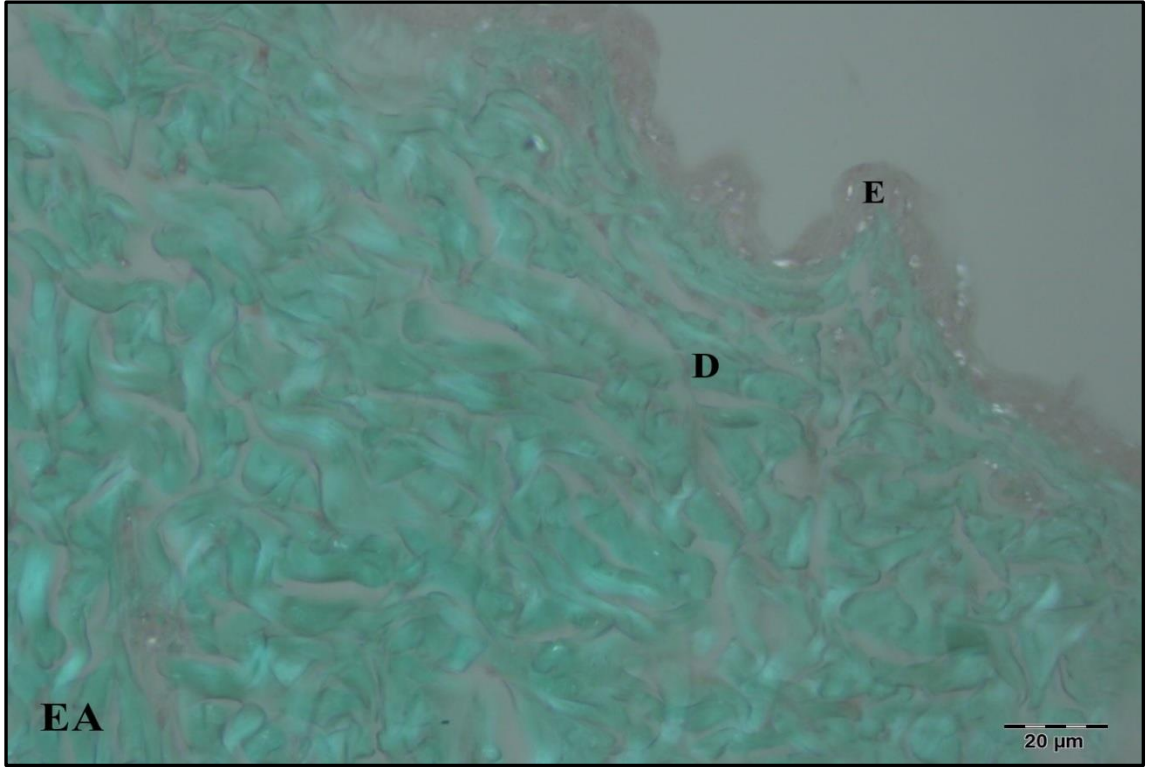
UVAB+EA grubu: Epidermiste orta düzeyde proliferen epitellerde, kıl folikül epitellerinde ve bağ doku hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyon veren hücreler belirlendi (Şekil 41).

UVAB +SB grubu: TUNEL-pozitif hücelere hafif düzeyde epidermiste; proliferen epitellerde, dermiste; kıl folikül epitellerinde ve bağ doku hücrelerinde belirlendi. Epidermiste TUNEL-pozitif hücre UVAB grubuna göre hafif düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 42).

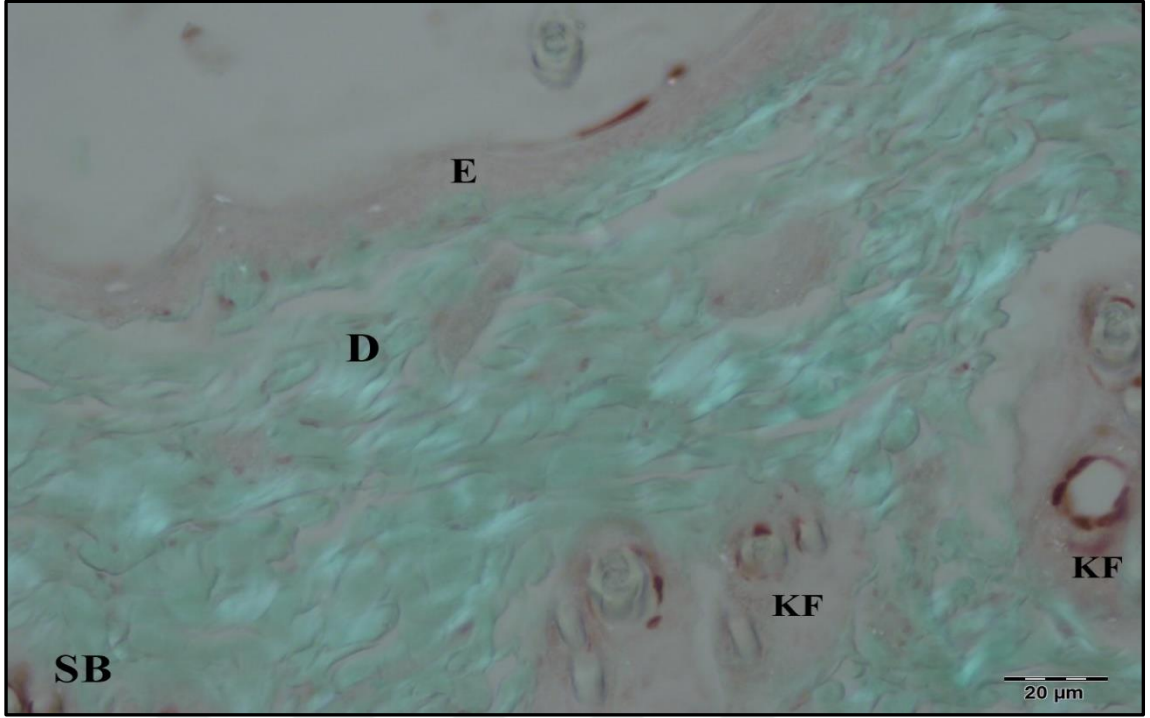
Deri dokularında histopatolojik incelenmesinde, UVAB radyasyonu hem UVAB +EA hem de UVAB +SB tedavi gruplarına göre şiddetli düzeyde apoptotik hücrelerin oluşumuna neden olduğu görülmüştür.



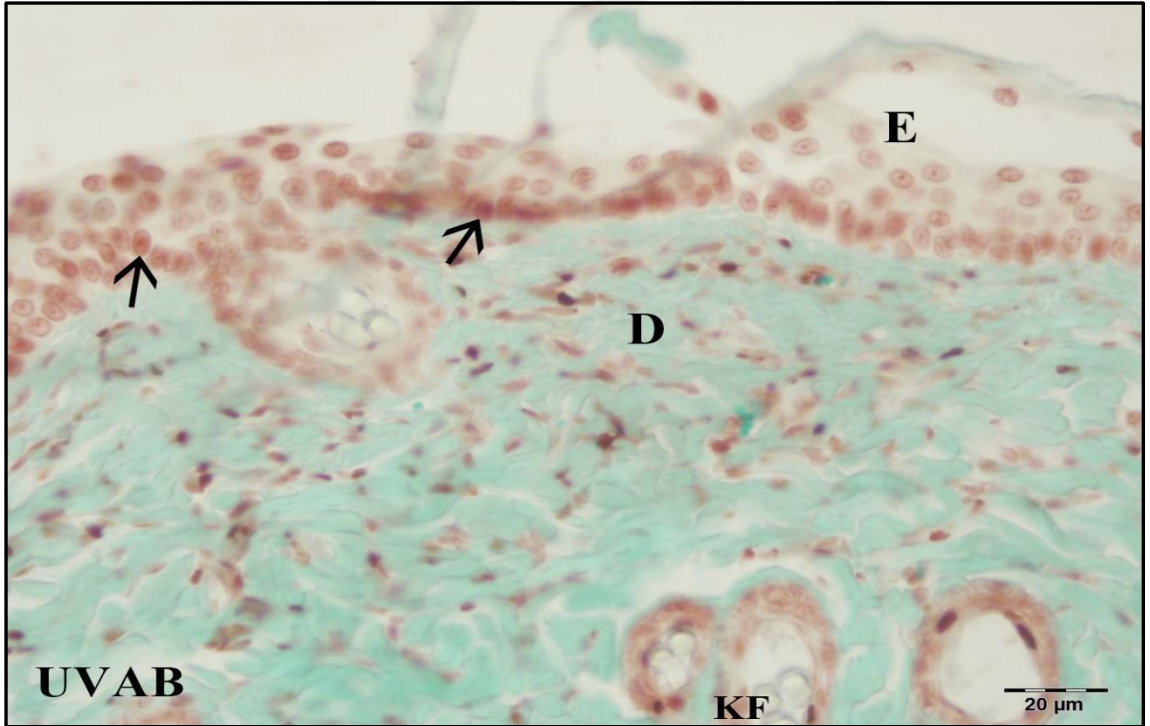
Şekil 37. Kontrol grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D), Kıl folikülü (KF). TUNEL negatif reaksiyon, TUNEL metot.



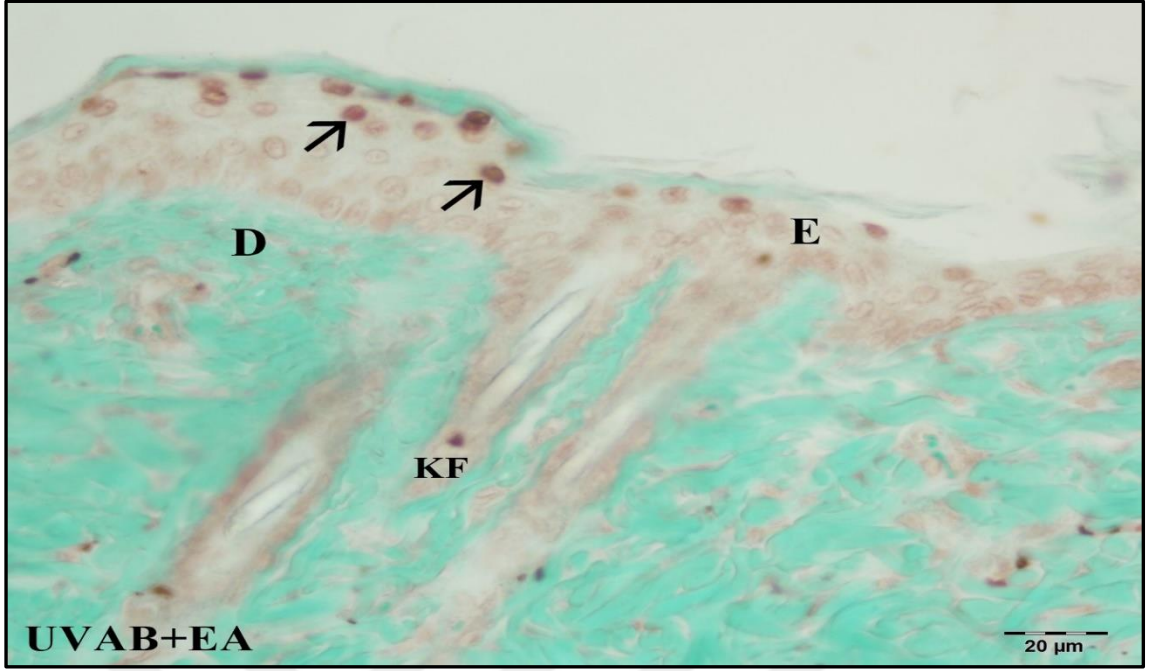
Şekil 38. EA grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D). TUNEL negatif reaksiyon, TUNEL metot.



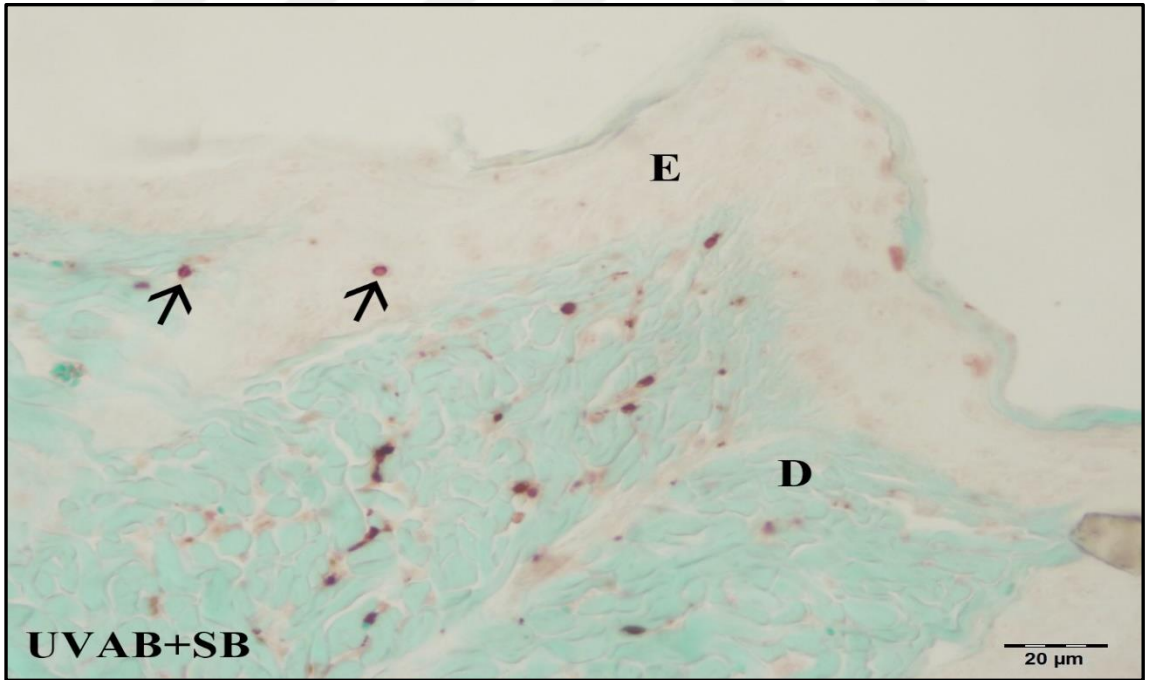
Şekil 39. SB grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D), Kıl folikülü (KF). TUNEL negatif reaksiyon, TUNEL metot.



Şekil 40. UVAB grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D), Kıl folikülü (KF). Epidermiste epitel hücrelerinde, kıl foliküllerinde ve bağ doku hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyon (ok), TUNEL metot.



Şekil 41. UVAB +EA (Ultraviyole AB + Ellajik asit) grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D), Kıl folikülü (KF). Orta düzeyde epidermiste epitel hücrelerinde (ok), kıl foliküllerinde ve bağ doku hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyon, TUNEL metot.



Şekil 42. UVAB +SB (Ultraviyole AB + Silibinin) grubunda TUNEL reaksiyonu. Epidermis (E), Dermis (D). Hafif düzeyde epidermiste epitel hücrelerinde (ok), kıl foliküllerinde ve bağ doku hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyon, TUNEL metot.

TUNEL pozitif hücre sayımının istatistik bulguları: Işık mikroskopunda incelenen kesitlerde TUNEL boyama sonuçları aşağıdaki kriterler temel alınarak derecelendirildi:

(-) İmmunopozitifliğin saptanmaması

(+) Farklı on mikroskop sahasında birkaç immunopozitifliğin saptanması

(++) Farklı on mikroskop sahasında fokal alanlar halinde ancak belirgin olarak immunopozitifliğin saptanması

(+++) Farklı on mikroskop sahasında %50'den fazla güçlü immunopozitifliğin saptanması

Epidermisteki TUNEL pozitif hücre sayıları yüzde olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 21 (Kruskall Wallis) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Buna göre, grupların TUNEL pozitif hücre sayıları şu şekildedir: UVAB > UVAB+EA > UVAB+SB > EA > SB = Kontrol (Tablo 21). UVAB ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Ancak, Kontrol, EA ve SB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$).

Tablo 20. Grupların epidermiste TUNEL pozitif boyalı hücrelerin yoğunluğu

Grup	1.hayvan	2.hayvan	3.hayvan	4.hayvan	5.hayvan	6.hayvan	7.hayvan
K	-	-	-	-	-	-	-
UVAB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EA	+	-	-	-	-	-	-
SB	-	-	-	-	-	-	Öldü
UVAB+EA	++	++	+++	++	+	++	Öldü
UVAB+SB	+	++	+	++	+	++	+

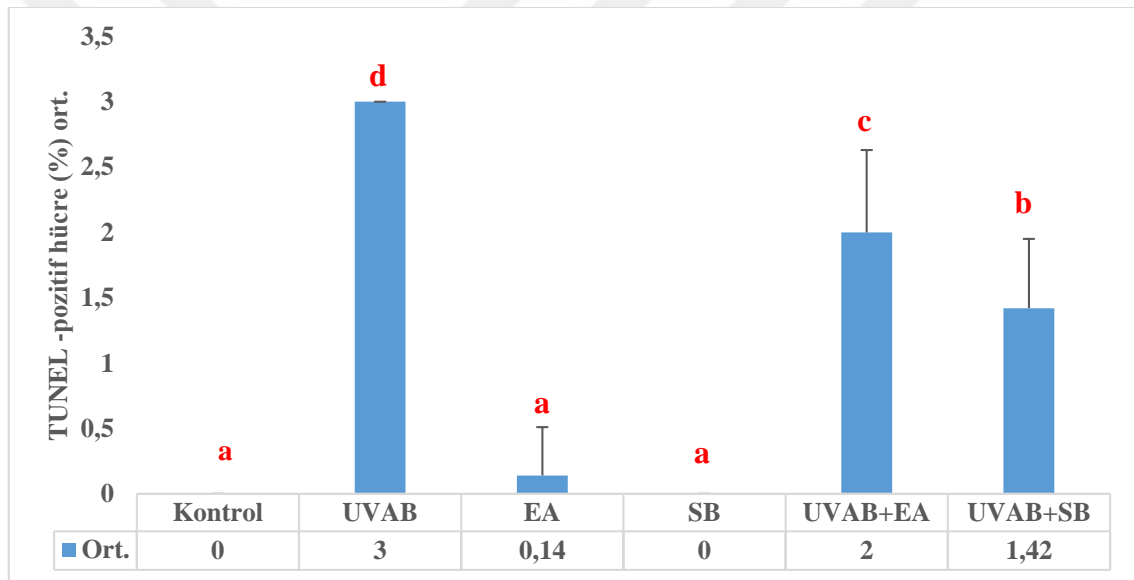
TUNEL pozitif hücre yoğunluğuna göre: (-) yok, (+) hafif, (++) orta ve (+++) şiddetli

Tablo 21. Kruskal -Wallis testi istatistik sonuçları

Grup	Ort.	Std. Sapma	Min.	Max.	Medyan
K	,00 ^a	,00	,00	,00	,00
UVAB	3,00 ^d	,00	3,00	3,00	3,00
EA	0,14 ^a	,37	,00	1,00	,00
SB	,00 ^a	,00	,00	,00	,00
UVAB+EA	2,00 ^c	,63	1,00	3,00	2,00
UVAB+SB	1,42 ^d	,53	1,00	2,00	1,00

a,b,c,d: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

Gruplar arası farklılıklar için yapılan Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre Gruplar arasındaki farkın önemli olduğu bulundu.



Şekil 43. Ellajik asit ve silibinin maddelerinin UVAB uygulanmış sıçan sırt epidermisindeki DNA fragmentasyonu üzerine etkisinin TUNEL yöntemi ile gösterilmesi. Her sütun TUNEL pozitif hücre sayısına ait ortalama değerleri ifade etmektedir. a,b,c,d: Gruplar arası farkı göstermektedir. Farklı harfi alan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

UVAB grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında UVAB grubunda epidermiste TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p < 0.05$).

UVAB uygulanmayan Kontrol grubu, EA ve SB verilen gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbiriyle aynı anlamda olduğu saptandı.

UVAB+EA ve UVAB+SB tedavi gruplarında epidermiste TUNEL pozitif hücre sayısında UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı ($p < 0.05$).

4.5. Stereolojik Bulgular

Cavalieri metodu uygulanarak dorsal sıçan sırt derilerine ait deri örnekleri tabakalarının toplam hacim oranları hesaplanmıştır. Çalışma gruplarına ait sıçan deri örnekleri tabakalarının hacimleri oranları, gruplara göre tanımlayıcı istatistik ve karşılaştırma sonuçları Tablo 22’de verilmiştir. Ayrıca çalışmamızda kesit sayısı ve kullanılan nokta sıklığının yeterli olup olmadığını gösteren HK, hacim oranları açısından gruplardaki bireylere ait biyolojik çeşitliliği gösteren DK ile toplam hacim oran değerleri aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 23).

Tablo 22. Kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının hacim oranlarının stereolojik olarak hesaplanması ve grupların birbiriyle karşılaştırılması

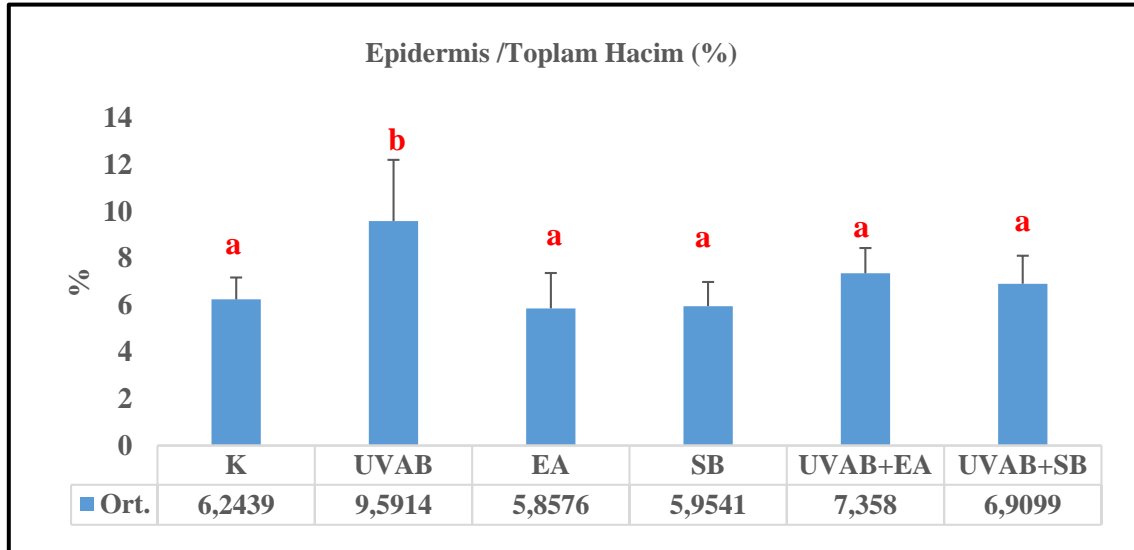
	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Max.	<i>p</i>
Epidermis/Toplam Hacim (%)	K	6,17	6,24 ^a	0,93	5,21	7,65	0,01
	UVAB	8,84	9,59 ^b	2,61	5,94	13,97	
	EA	5,68	5,85 ^a	1,51	3,78	7,91	
	SB	5,79	5,95 ^a	1,03	4,60	7,58	
	UVAB+EA	7,02	7,35 ^a	1,07	6,51	9,51	
	UVAB+SB	7,23	6,90 ^a	1,19	5,18	8,09	
Dermis /Toplam Hacim (%)	K	65,21	64,60	3,29	58,54	68,80	0,19
	UVAB	66,00	65,76	2,34	61,40	68,68	
	EA	66,25	64,61	6,76	55,22	74,09	
	SB	67,77	66,13	5,40	55,28	69,66	
	UVAB+EA	71,99	69,85	5,11	61,10	74,06	
	UVAB+SB	61,18	61,28	7,24	51,90	70,07	
Hipodermis/Toplam Hacim (%)	K	27,75	29,15	3,65	25,99	36,24	0,09
	UVAB	25,41	24,64	3,36	19,73	29,76	
	EA	27,31	29,52	7,18	22,13	40,11	
	SB	25,87	27,91	6,09	24,23	40,13	
	UVAB+EA	20,76	22,78	5,66	17,38	32,38	
	UVAB+SB	42,91	31,80	7,41	22,79	42,92	

Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + EA), UVAB+SB (Ultraviyole AB + SB). ^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

Tablo 23. Kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak hacimlerinin HK ve DK değerleri

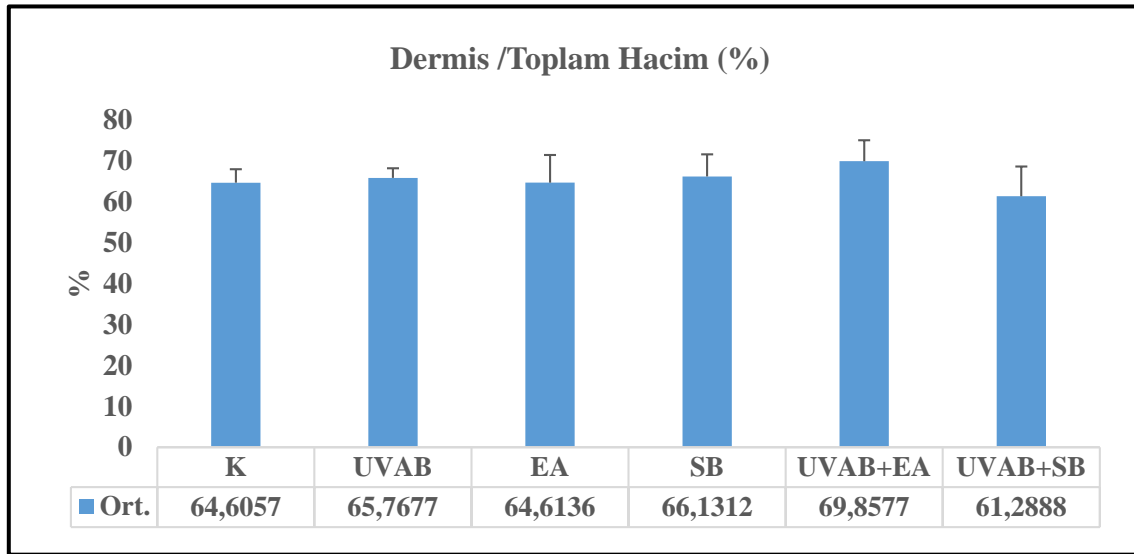
	Grup	HK	DK
Epidermis Hacmi (mm ³)	K	0,05	0,1
	UVAB	0,04	0,2
	EA	0,05	0,2
	SB	0,04	0,2
	UVAB+EA	0,04	0,2
	UVAB+SB	0,04	0,1
Dermis Hacmi (mm ³)	K	0,05	0,1
	UVAB	0,05	0,1
	EA	0,05	0,2
	SB	0,05	0,1
	UVAB+EA	0,05	0,2
	UVAB+SB	0,05	0,2
Hipodermis Hacmi (mm ³)	K	0,05	0,2
	UVAB	0,05	0,1
	EA	0,05	0,4
	SB	0,05	0,2
	UVAB+EA	0,06	0,3
	UVAB+SB	0,05	0,2

Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + Ellajik asit), UVAB+SB (Ultraviyole AB + Silibinin), HK (Hata katsayısı), DK (Değişim katsayısı).



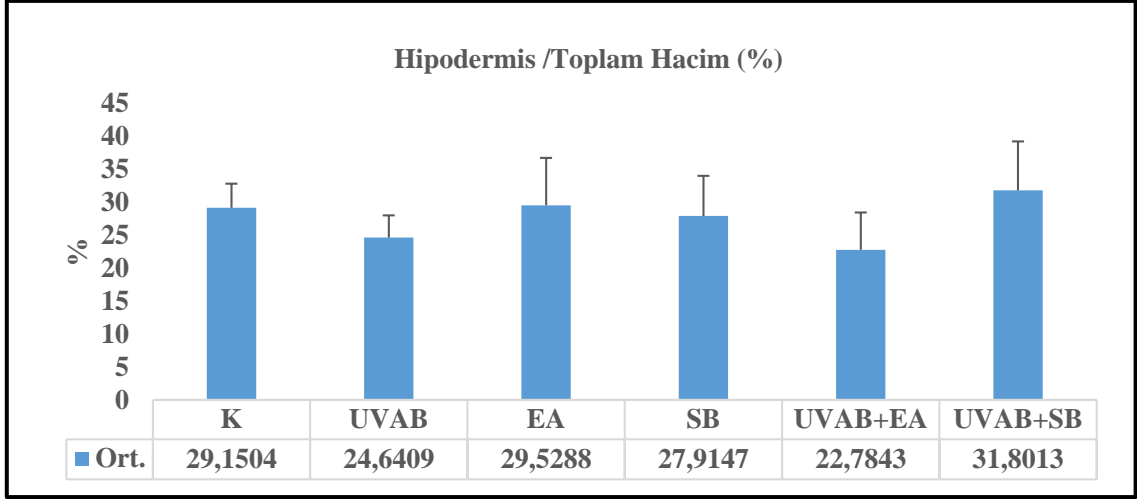
Şekil 44. Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak epidermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği. Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + EA), UVAB+SB (Ultraviyole AB + SB). ^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p<0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

Şekil 44'te UVAB grubundaki sıçanların dorsal deri epidermis kalınlıklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p<0.05$). Tedavi gruplarındaki sıçanların dorsal deri epidermis kalınlıklarında (Ultraviyole AB + EA ve UVAB+SB) ise UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı ($p<0.05$). Kontrol grubundaki sıçanların dorsal deri epidermis kalınlıklarında EA ve SB verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbirleriyle aynı anlamda olduğu görüldü.



Şekil 45. Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak dermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği. Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + EA), UVAB+SB (Ultraviyole AB + SB).

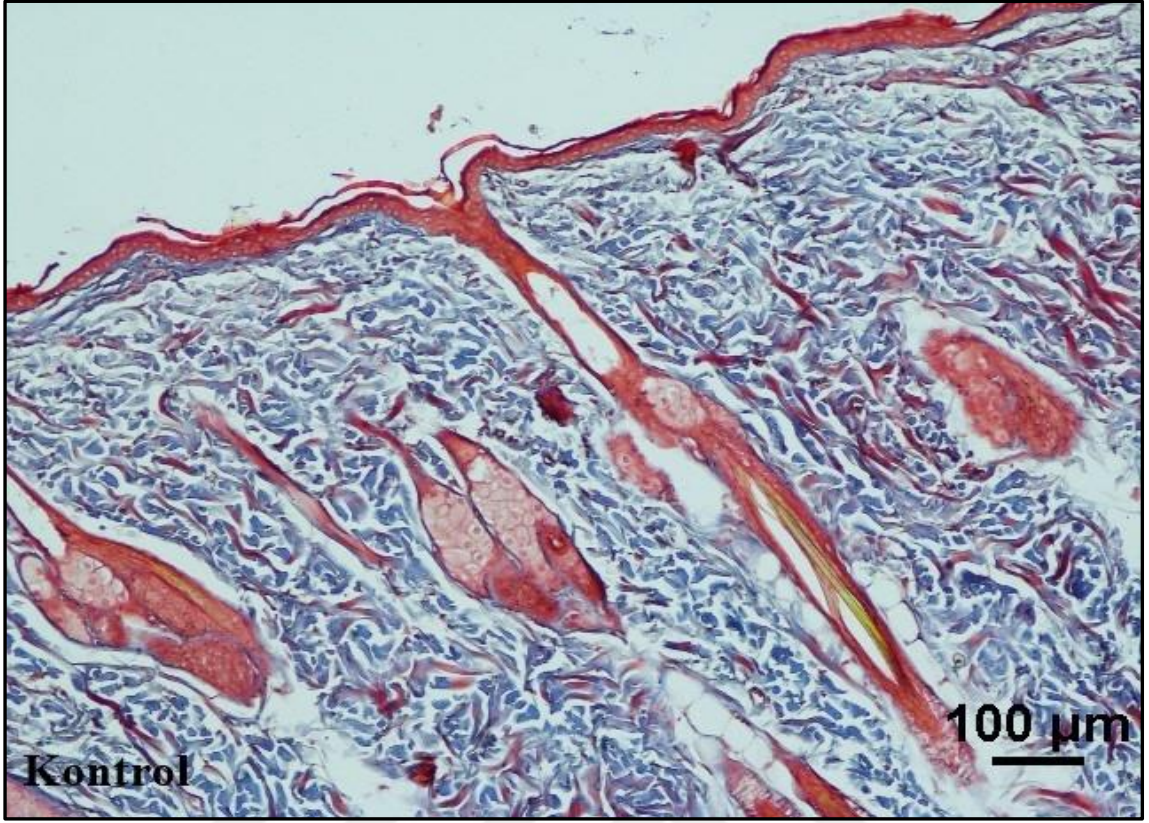
Şekil 45'te UVAB grubundaki sıçanların dorsal deri dermis kalınlıklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Tedavi gruplarındaki sıçanların dorsal deri dermis kalınlıklarında (Ultraviyole AB + EA ve UVAB+SB) ise UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Kontrol grubundaki sıçanların dorsal deri dermis kalınlıklarında EA ve SB verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).



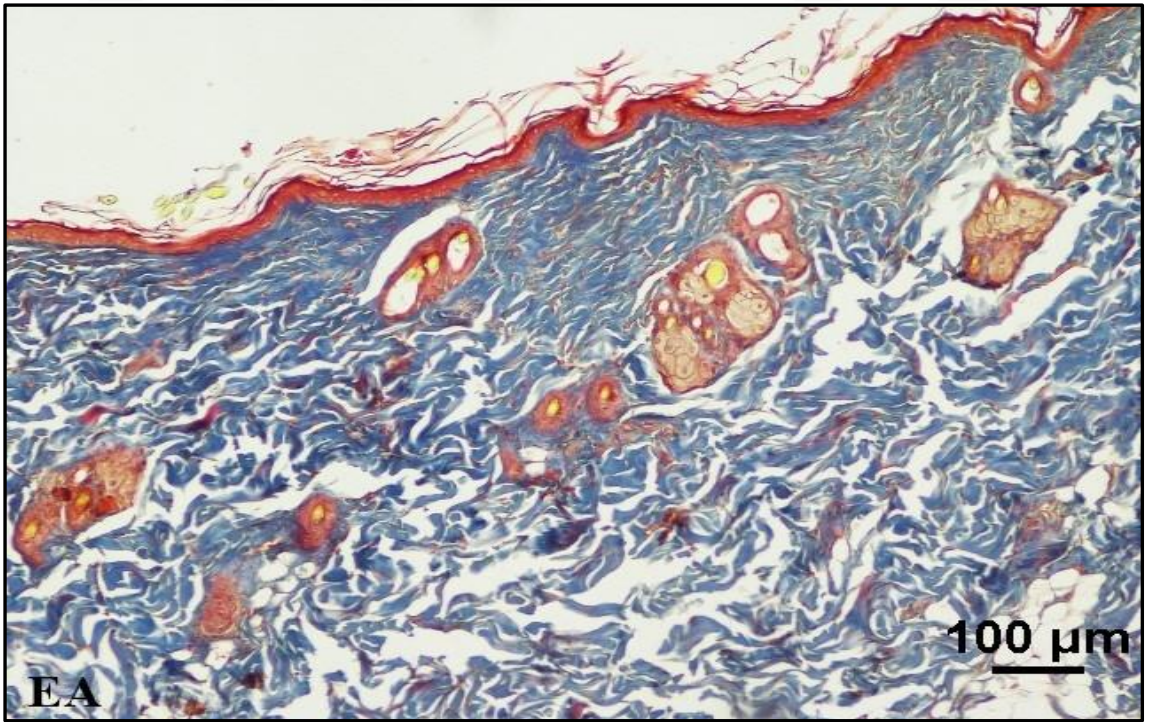
Şekil 46. Çalışma gruplarından kesit alınan örneklerdeki deri katmanlarının stereolojik olarak hipodermis hacimlerinin toplam hacimlerine % oranları grafiği. Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + EA), UVAB+SB (Ultraviyole AB + SB).

Şekil 46’da UVAB grubundaki sıçanların dorsal deri hipodermis kalınlıklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Tedavi gruplarındaki sıçanların dorsal deri hipodermis kalınlıklarında (Ultraviyole AB + EA ve UVAB+SB) UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Kontrol grubundaki sıçanların dorsal deri hipodermis kalınlıklarında EA ve SB verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

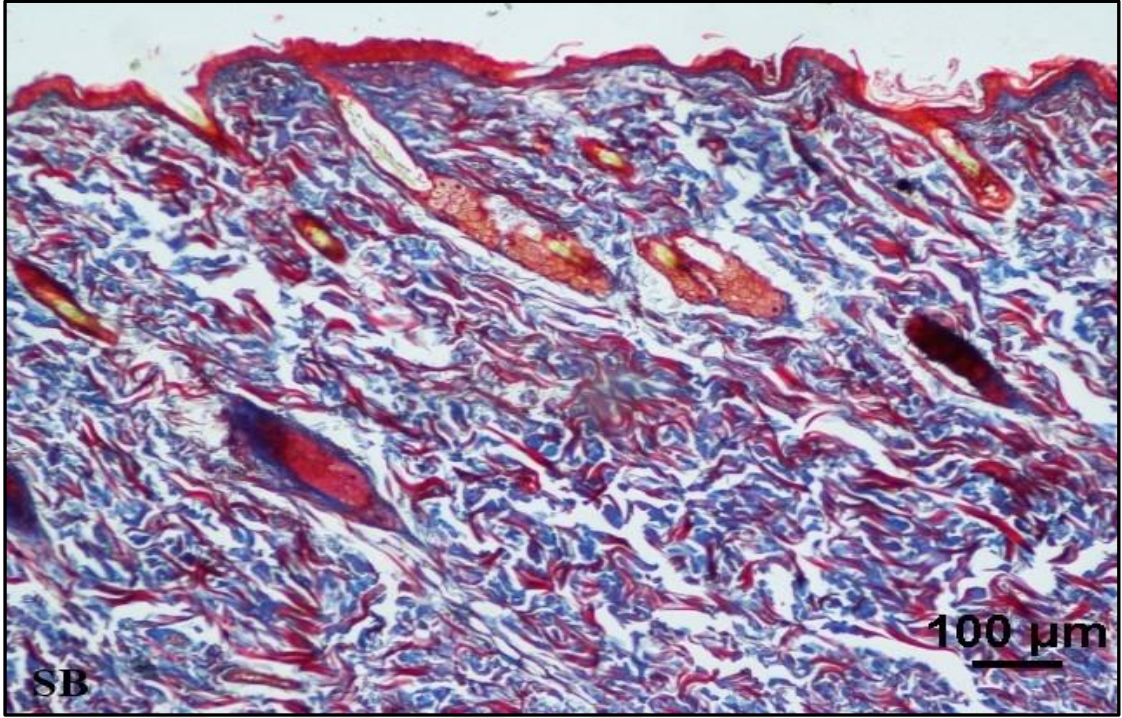
Masson trikrom boyama bulgularına göre; Şekil 47’de UVAB uygulaması yapılmayan Kontrol grubu, Şekil 48’de EA grubu ve Şekil 49’daki SB grubu sıçan sırt derisi dermis tabakasında fibrositlerden zengin gevşek bağdoku görüldü. Şekil 50’deki UVAB grubunda, gruplarına kıyasla sıçan sırt deri dermis tabakasında fibrositlerden zengin daha sıkı bağ doku görüldü. Şekil 51’deki UVAB +EA grubunda, UVAB grubuna göre daha gevşek bir bağdoku olduğu belirlendi. Şekil 52’deki UVAB +SB tedavi grubunda ise fibrosit fibroblastların bulunduğu aktif bir kollajen tespit edildi. UVAB grubuna kıyasla daha az aktif ve daha gevşek bir bağdoku olduğu belirlendi.



Şekil 47. Kontrol grubu, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom)



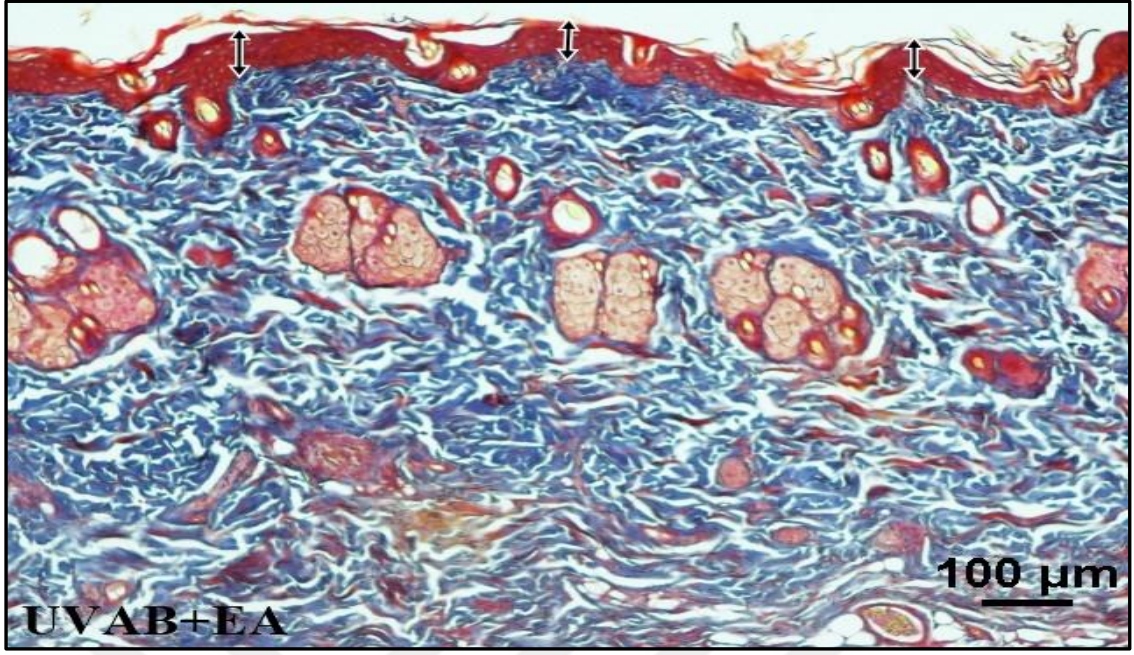
Şekil 48. EA (Ellajik asit) grubu, deri, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom)



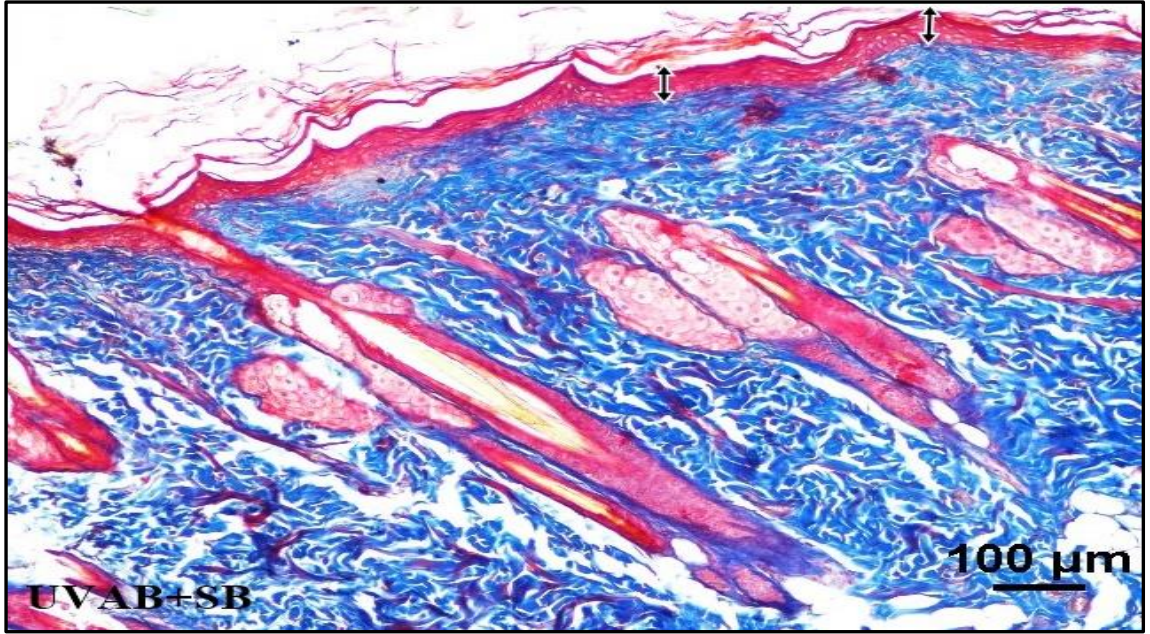
Şekil 49. SB (Silibinin) grubu, deri, dermis, fibrositlerden zengin gevşek bağ doku (Masson trikrom)



Şekil 50. UVAB (Ultraviyole A ve B) grubu, deri, dermis fibrositlerden zengin çok sıkı bağ doku (Masson trikrom), Epidermis tabakası (Ok)



Şekil 51. UVAB +EA (Ultraviyole A ve B + Ellajik asit) grubu, deri, dermis, gevşek bir bağ doku (Masson trikrom), Epidermis tabakası (Ok)



Şekil 52. UVAB +SB (Ultraviyole A ve B + Silibinin) grubu, deri, dermis fibrositlerden zengin sıkı bağ doku (Masson trikrom), Epidermis tabakası (Ok)

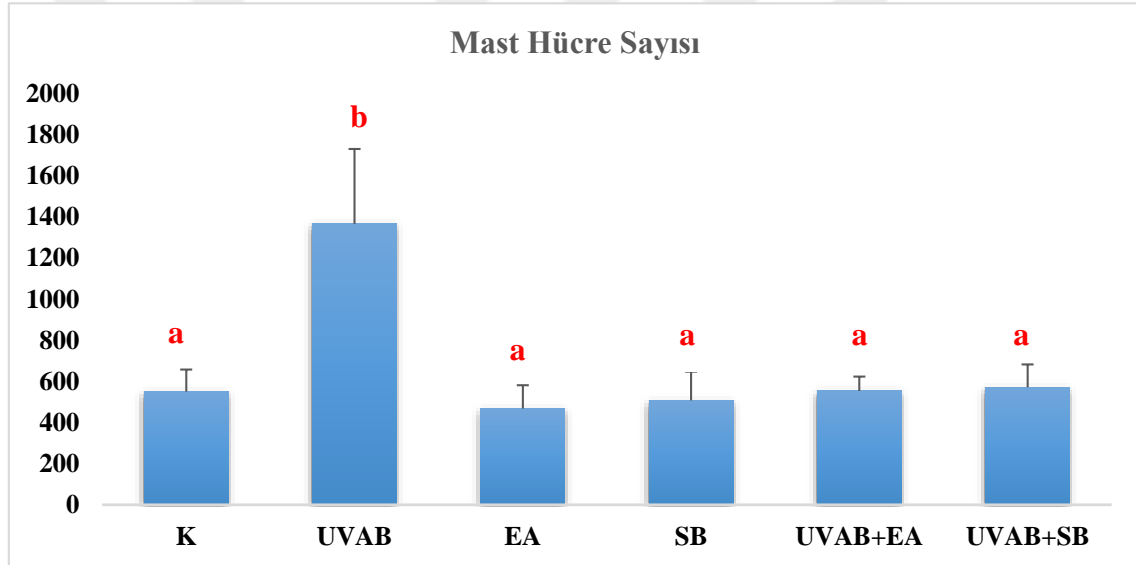
Çalışmamızda fiziksel disektör yöntemi Cavalieri metodu kullanılarak toplam dermal mast hücre sayıları hesaplandı. Gruplara ait toplam dermal mast hücre sayıları ve gruptaki bireylere ait toplam dermal mast hücre sayısı arasındaki biyolojik varyasyonu gösteren değişim katsayısı (DK) değerleri tablolar halinde verilmiştir (Tablo 24).

Gruplar; K, UVAB, EA, SB, UVAB+EA ve UVAB+SB olarak adlandırılmıştır.

Tablo 24. Çalışma grupları sıçan dorsal dermal mast hücre sayısı

Grup	Ortalama	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	DK	<i>p</i>
Kontrol	550,42 ^a	106,75	602,00	422,00	674,00	0,15	0,03
UV	1365,57 ^b	364,16	1466,00	614,00	1797,00	0,1	
EA	468,00 ^a	113,15	442,00	355,00	688,00	0,2	
SB	507,33 ^a	140,40	464,50	411,00	784,00	0,2	
UV+EA	553,50 ^a	69,40	581,50	424,00	605,00	0,11	
UV+SB	571,42 ^a	110,75	562,00	407,00	718,00	0,18	

Kontrol (K), UVAB (Ultraviyole A ve B), EA (Ellajik Asit), SB (Silibinin), UVAB+EA (Ultraviyole AB + Ellajik asit), UVAB+SB (Ultraviyole AB + Silibinin), DK (Değişim katsayısı). ^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.



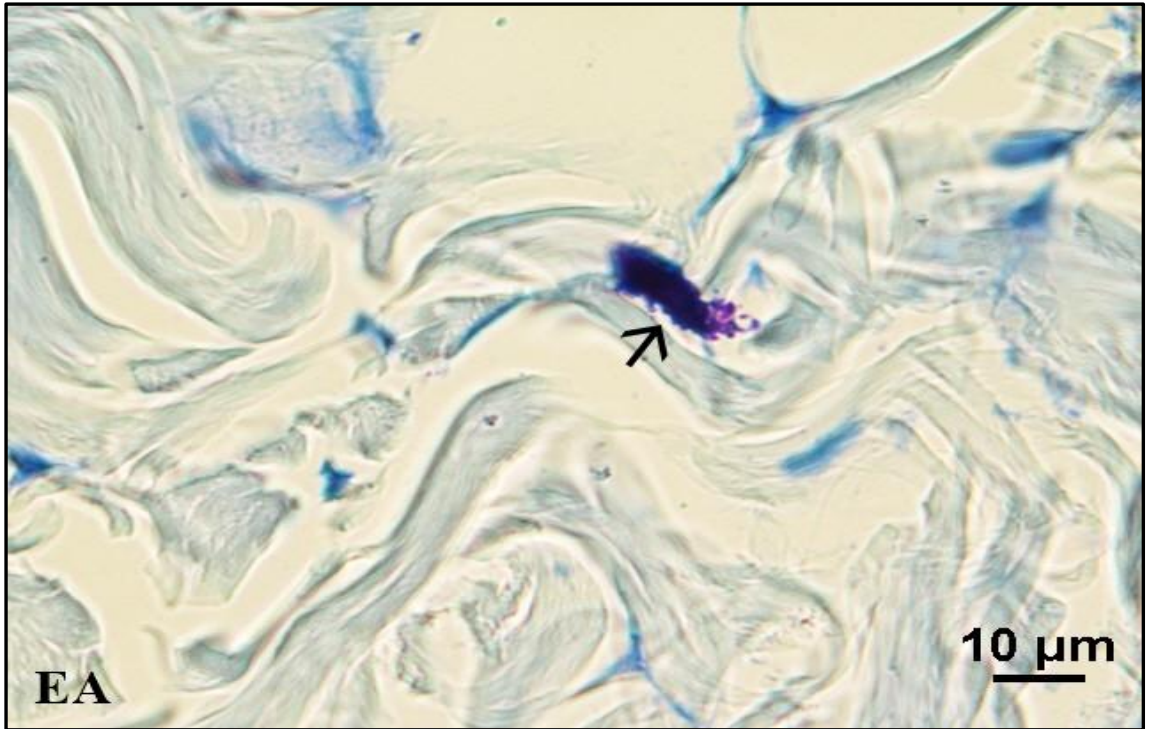
Şekil 53. Tüm çalışma gruplarına ait dermal mast hücre sayısı

^{a,b}; Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

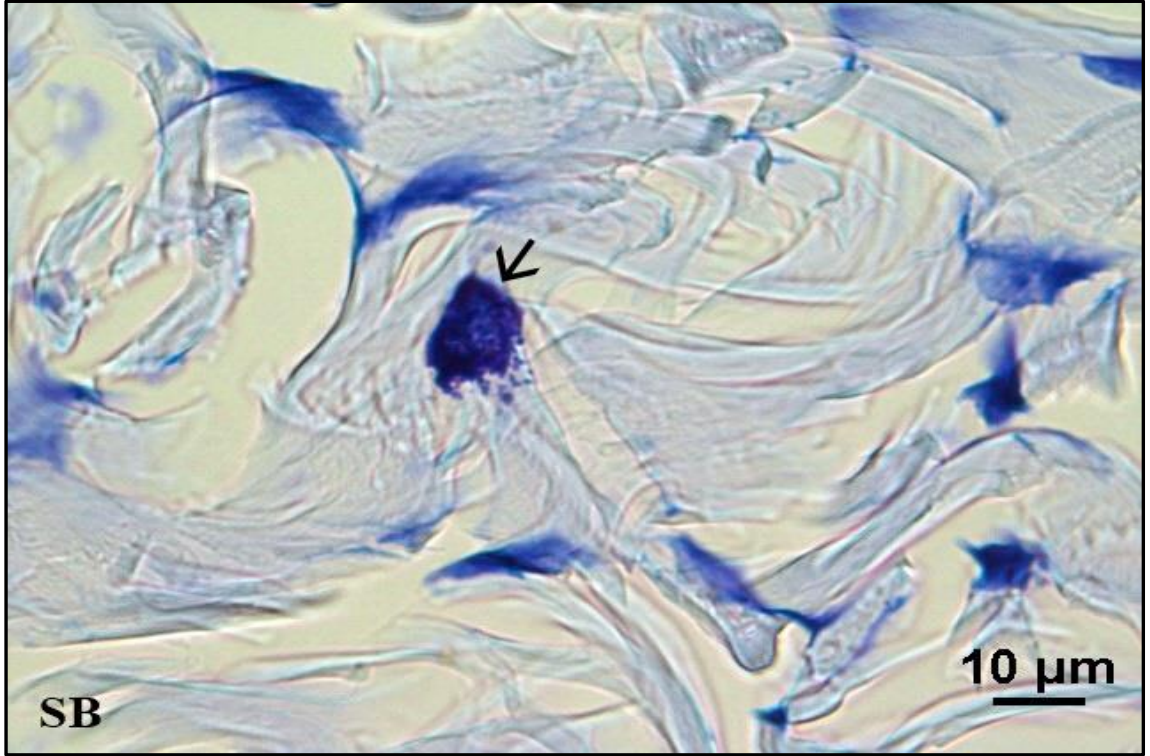
UVAB grubuna ait sıçanların dermal mast hücre sayısında tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken diğer gruplarda önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 57). Tedavi gruplarındaki (UVAB + EA ve UVAB+SB) dermal mast hücre sayısında UVAB grubuna kıyasla belirgin bir düşüş gözlemlendi. Kontrol grubu (Şekil 54) dermal mast hücre sayısında EA (Şekil 55) ve SB (Şekil 56) verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbiriyle aynı anlamda olduğu saptandı.



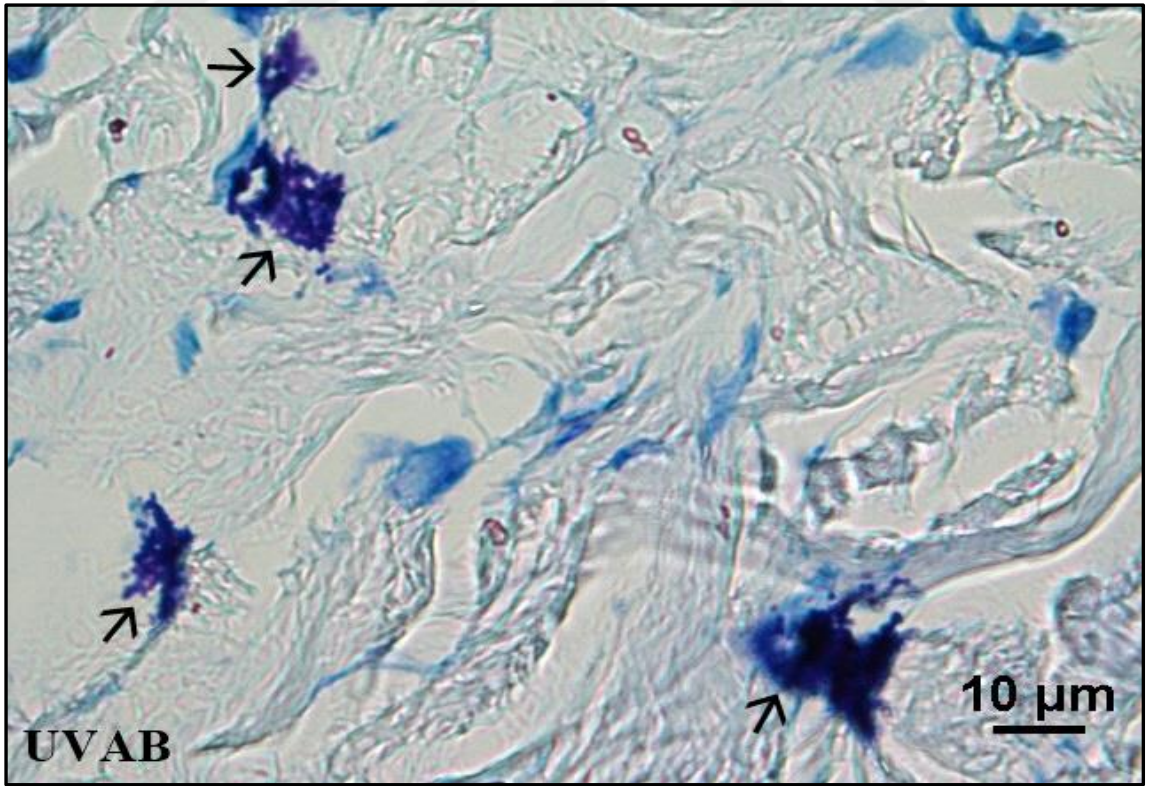
Şekil 54. Kontrol grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)



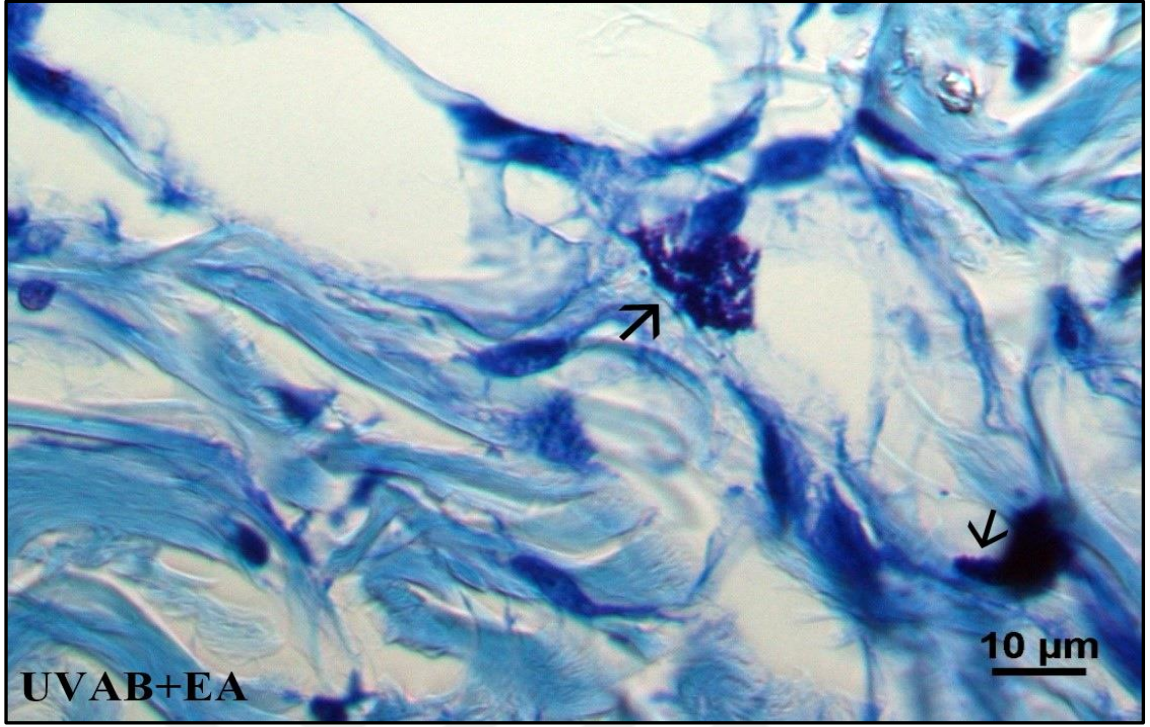
Şekil 55. EA grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi, (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)



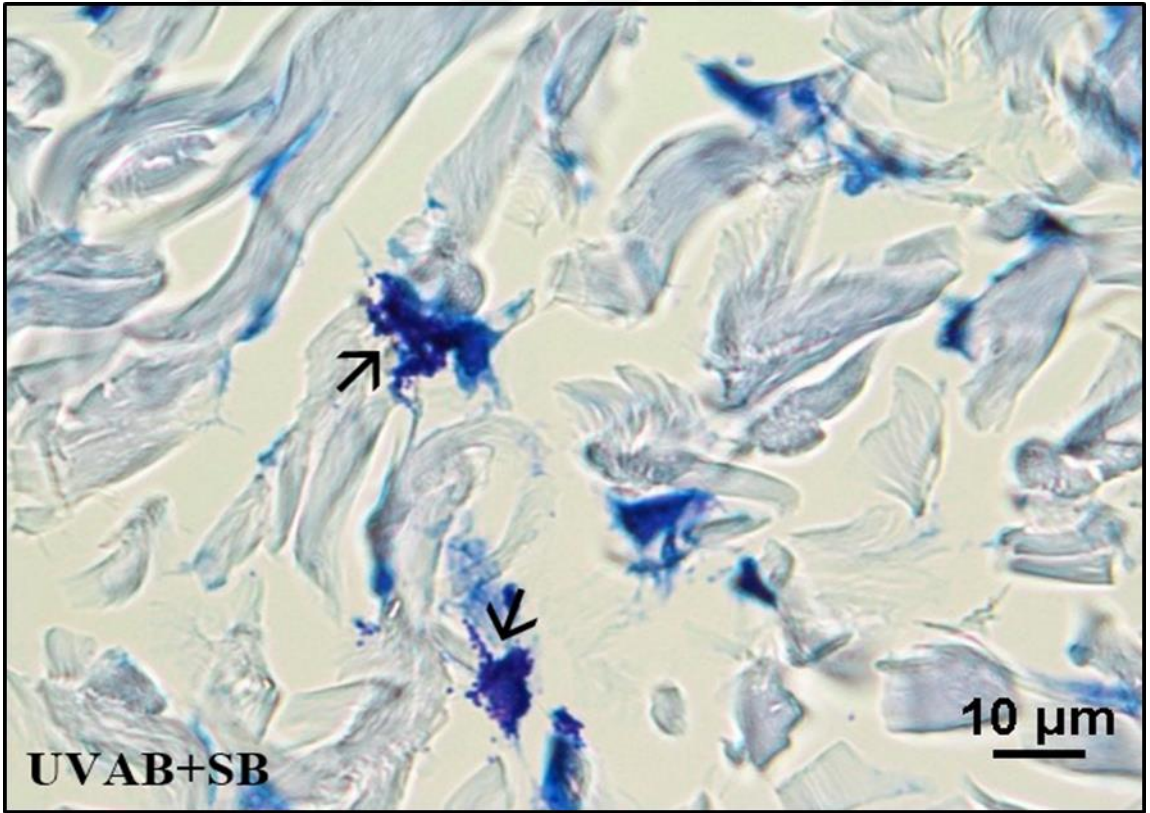
Şekil 56. SB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi, (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)



Şekil 57. UVAB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi, (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)



Şekil 58. UVAB+EA grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi, (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)



Şekil 59. UVAB+SB grubu sıçan dermal mast hücresi mikroskopik görüntüsü, Toluidin mavisi, (Obj.x100). Dermal mast hücresi (ok)

4.6. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analiz Bulguları

UVAB'nin deride oluşturduğu oksidatif hasarına karşı, EA ve SB'nin koruyucu etkisinin *in vivo* olarak incelediğimiz bu çalışmadan elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde kendi içinde başlıklara ayrılmış şekilde aşağıda verilmiştir. TAS sonuçları Tablo 25'de, TOS sonuçları Tablo 26'da, OSİ sonuçları ise Tablo 27'de verilmiştir.

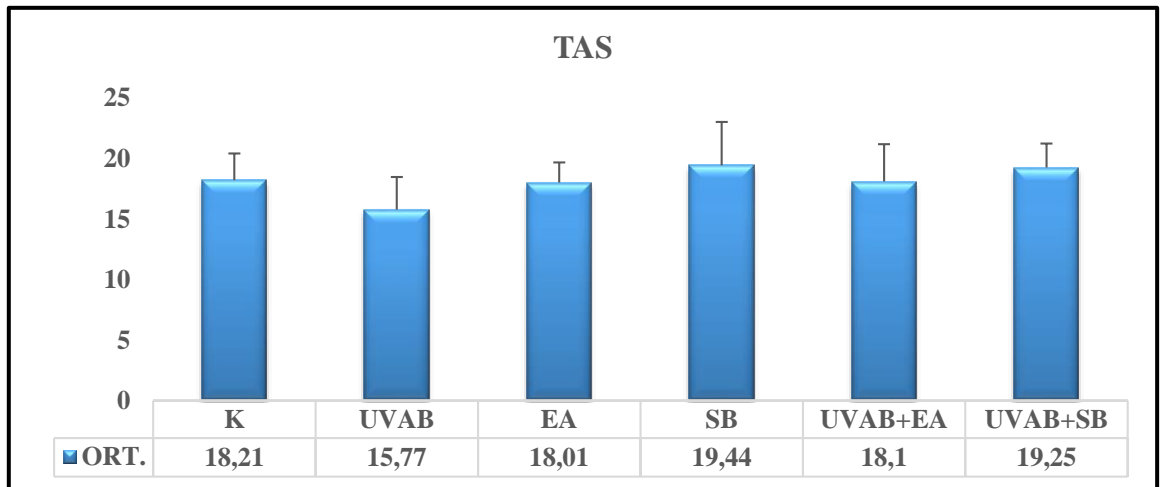
Gruplar; K, UVAB, EA, SB, UVAB+EA ve UVAB+SB olarak adlandırılmıştır.

Sıçan sırt deri dokusunda bakılan oksidatif stres belirteci olan TAS'ın istatistiksel analizi ve gruplar arasındaki karşılaştırma sonuçları Tablo 25'te, TOS'un istatistiksel analizi ve gruplar arasındaki karşılaştırma sonuçları Tablo 26'da ve OSİ'nin istatistiksel analizi ve gruplar arasındaki karşılaştırma sonuçları Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 25. Deri dokusunda ölçülen TAS sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

Gruplar	Ortalama	STD. Sapma	Min.	Max.	Medyan	<i>p</i>
Kontrol	18,21	2,20	15,04	21,27	18,58	0,32
UVAB	15,77	2,70	12,46	18,69	14,59	
EA	18,01	1,67	16,84	21,55	17,34	
SB	19,44	3,58	16,44	25,93	17,76	
UVAB+EA	18,10	3,08	14,03	21,49	18,10	
UVAB+SB	19,25	1,99	16,22	21,61	19,81	

$p > 0.05$ olduğundan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur.



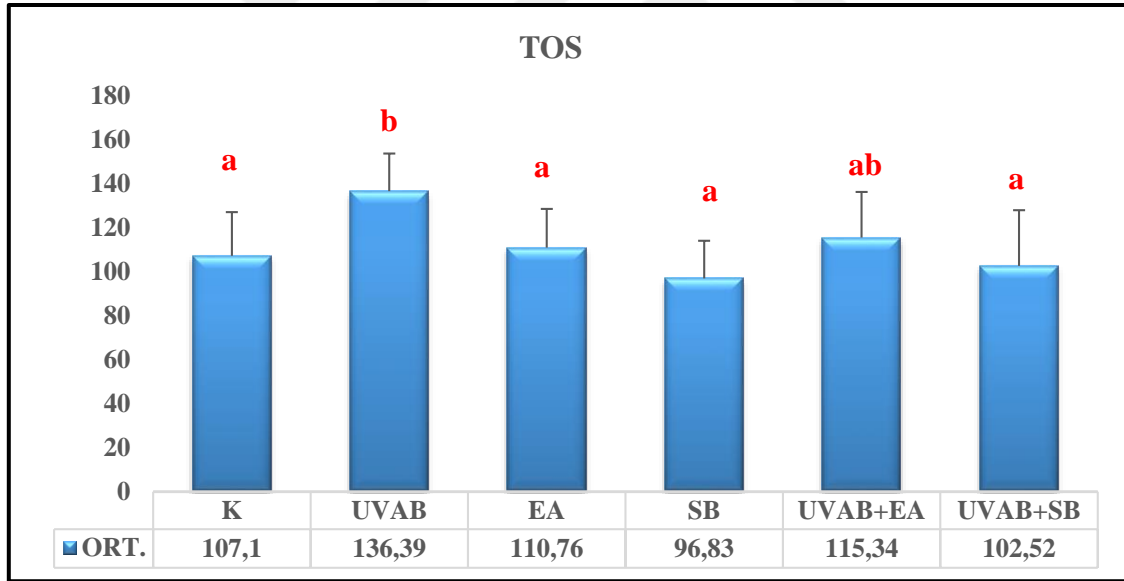
Şekil 60. Deri dokusu TAS değerlerinin grafiği

UVAB'nin uygulandığı grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında TAS seviyelerinde bir düşüş olduğu, ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde olmadığı saptandı ($p>0.05$). UVA ve B'nin uygulandığı grup, tedavi grupları (UVAB+EA ve UVAB+SB) ile kıyaslandığında TAS seviyelerinde bir artış olduğu ancak bunun da istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye çıkmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Tablo 26. Deri dokusunda ölçülen TOS sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

Grup	Ortalama	Std. Sapma	Min.	Max.	Medyan	<i>p</i>
Kontrol	107,10 ^a	19,78	74,76	136,70	102,52	0,01
UVAB	136,39 ^b	17,10	115,34	164,47	134,56	
EA	110,76 ^a	17,63	74,76	126,02	115,34	
SB	96,83 ^a	17,06	74,76	119,61	97,18	
UV+EA	115,34 ^{ab}	20,70	85,44	147,38	117,47	
UV+SB	102,52 ^a	25,27	72,62	153,79	96,12	

^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ olduğundan farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.



Şekil 61. Deri dokusu TOS değerlerinin grafiği. ^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

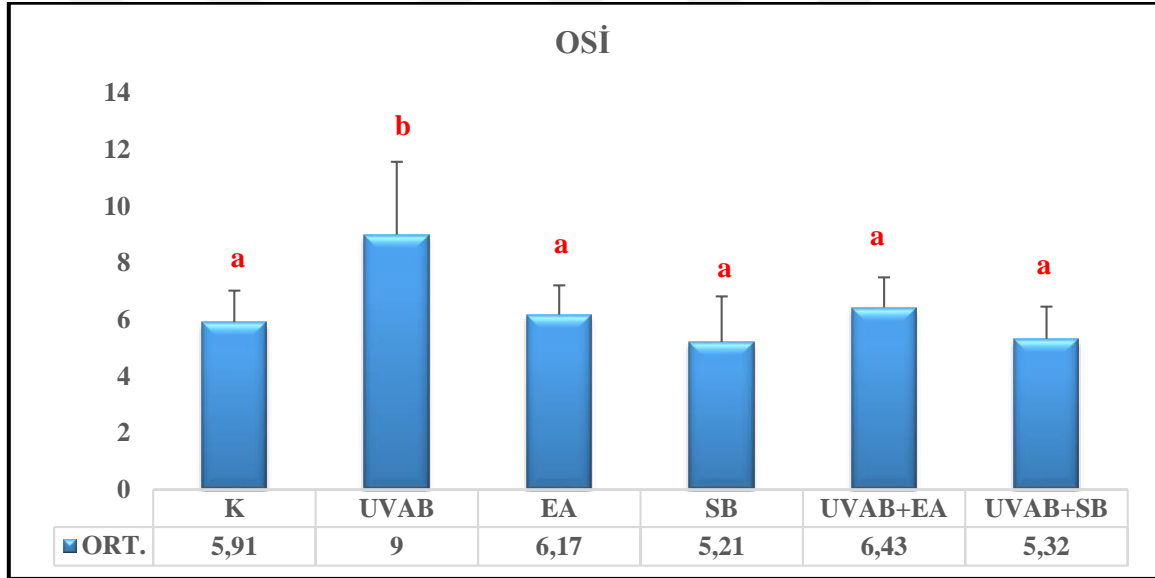
UVAB'nin uygulandığı grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında TOS seviyelerinde bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). UVAB'nin uygulandığı grup, tedavi grupları (UVAB+EA ve UVAB+SB) ile kıyaslandığında TOS seviyelerinin UVAB+SB grubu ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$); UVAB+EA grubu ile kıyaslandığında ise TOS seviyelerinin

istatistiksel olarak birbiriyle aynı anlamda olduğu ve tedavi gruplarındaki TOS seviyelerinde bir düşüş olduğu saptandı.

Tablo 27. Deri dokusunda ölçülen OSİ, sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

Grup	Mean	Std. Sapma	Min.	Max.	Medyan	<i>p</i>
Kontrol	5,91 ^a	1,11	4,82	7,93	5,86	0,02
UVAB	9,00 ^b	2,57	6,19	13,20	10,03	
EA	6,17 ^a	1,04	4,32	7,27	6,49	
SB	5,21 ^a	1,61	2,88	7,27	5,51	
UV+EA	6,43 ^a	1,06	5,38	7,77	6,31	
UV+SB	5,32 ^a	1,14	4,03	7,12	4,83	

^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.



Şekil 62. Deri dokusu OSİ değerlerinin grafiği. ^{a,b}: Gruplar arası farkı göstermektedir. $p < 0.05$ farklı harfi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

UVAB'nin uygulandığı grup, kontrol grubu, EA grubu, SB grubu ve tedavi grupları (UVAB+EA ve UVAB+SB) ile kıyaslandığında OSİ seviyelerinde bir artış olduğu gözlemlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde küresel ısınmanın etkisiyle güneş ışınları ile temas süreleri uzamıştır. Yanlış güneşlenme alışkanlıkları, ozon tabakasının incelmeye ve delinmesi ile UV ışınlarının güneş yanığı, deri yaşlanması, immünsüpresyon ve cilt kanseri oluşumları gibi zararlı etkilerinde artışlar görülmüştür. İnsanlar için bu zararlı etkilerden en önemlisi, vücudun immünolojik mekanizmalarını etkileyerek genlerde oluşturdukları mutasyonlar ile deri kanserlerine sebep olmalarıdır (Akkaya ve Erturan, 2004). Çalışmamızda ellajik asit ve silibininin UVAB uygulanmış sıçanların dorsal sırt deri dokusu üzerindeki koruyucu etkisi, söz konusu dokuya ait TAS, TOS, OSİ değerleri ölçülerek ve stereolojik yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Buna ilaveten deri dokusunda EA ve SB'nin antiapoptotik etkisi de immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Bulgular aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir.

Güçlü antioksidan özelliğe sahip maddelerin kilo vermeye yardımcı oldukları daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Ramezanipour ve ark., 2014; Doo ve Kim, 2017). Çalışmamızda Kontrol grubunun vücut ağırlık değişim yüzdesinde ise (10., 20. ve 30. gün) , EA ve SB verilen gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptandı ($p < 0.05$). Buna göre antioksidan maddeler olan ellajik asit ve silibinin verilen gruplardaki hayvanlarda kilo kaybı bulgularımız literatürle uyumludur.

Derinin UV maruziyetinin epidermiste kalınlığa neden olduğu bilinmektedir (Svobodová ve Vostalova, 2010; Jeon ve ark., 2009; Gonzales-Castañeda ve Gonzales, 2008; Winter ve ark., 2001; Takema ve Imokawa, 1998; Ishii ve ark.,1997). Çalışmada doku takip öncesi alınan deri örnekleri kalınlıklarında UVAB uygulanmayan kontrol grubu ile UVAB uygulanan grup karşılaştırıldığında, makroskobik kalınlık bulgularında UVAB grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gözlenmiştir ($p<0.05$). UVB'nin epidermal kalınlık üzerine etkisinin araştırılmasıyla ilgili olarak son zamanlarda bitkisel ajanlarla yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Kim ve ark. (2010), tüysüz farelerdeki epidermal kalınlığın UVB maruziyeti ile arttığını ancak 2-test bitkisel bileşen karışımının dorsal olarak uygulanmasının kalınlığı azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca farelerde, soya fasulyesinden elde edilen isoflavon ekstraktının (Huang ve ark., 2010a), kahverengi şekerden elde edilen şeker olmayan fraksiyonunun (Sumiyoshi ve

ark., 2009), zeytin yaprağı ekstraktının ve oleuropeinin (Kimura ve Sumiyoshi, 2009) UVB kaynaklı epidermal kalınlaşmayı azalttığı bildirilmiştir. Çalışmada UVAB+EA ve UVAB+SB tedavi gruplarında yer alan sıçanların histolojik doku takibinden önce alınan deri örnekleri kalınlıklarında UVAB grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı. Buna göre bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi.

Çalışmada bulunan stereolojik (hacim oranı) bulguları değerlendirildiğinde UVAB grubunda epidermis hacim oranında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Kontrol grubunda epidermis normal yapıda gözlenmiştir. UVAB grubunda ise metabolizma hızına ve keratinizasyona yönelik epidermal hacim yoğunluğu artışı söz konusuydu. Bu bulgu literatürle de uyumluluk göstermektedir (Gonzalez ve ark., 2015). UVAB+EA ve UVAB+SB gruplarında ise diğer moleküler ve biyokimyasal bulgularla uyuşan tedavinin olumlu yönde ilerlediğine dair değişiklikler gözlemlendi. Bu sonuç, ölçtüğümüz diğer parametrelerle de uyduğundan, EA ve SB'nin epidermal kalınlaşmayı UVAB grubuna göre önlemesinin tedavi yönünde bir etki olduğunu düşünmekteyiz. Ulaşabildiğimiz literatüre göre UVAB'nin oluşturduğu deri hasarında EA ve SB'nin epidermal kalınlığı azalttığı stereolojik metotlarla ilk defa bu çalışmada tesbit edilmiştir.

Mast hücreleri, vücudun bağ dokusunda yaygın bir şekilde bulunan hücrelerdir. UV radyasyonuna maruz kalan deride mast hücre sayısı artar (Iddamalgoda ve ark., 2008). Gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada, vücudun güneşe en fazla maruz kalan kısmı olan elin üst tarafında dermal mast hücre yaygınlığının artması ile elastin içeriği arasında bulunan anlamlı ilişki, foto hasarın mast hücre yaygınlığını arttırdığını düşündürmektedir (Grimbaldeston ve ark., 2006). Literatüre bakıldığında UV maruziyetinin mast hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. UVB ile muamele edilen deride, kan damarları, yağ ve ter bezleri, kıl folikülleri çevresi (Mohamed ve ark. 2003), doza bağlı olarak fare derisi alt ve üst dermisi (Kligman ve Murphy, 1996) ve lenf nod mast hücre sayısında belirgin bir artış olduğu (Byrne ve ark., 2008) bildirilmiştir. Ayrıca, UVB'ye maruz bırakılan deride mast hücrelerinin, alt deride enflamasyonla, üst deride ise bağ dokunun yeniden yapılanması ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur (Kligman ve Murphy, 1996). Bu çalışma diğer çalışmalarla benzer şekilde UVAB grubundaki dermal mast hücre sayısı

kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Bitkisel kaynaklı ya da diğer ajanların, inflamasyon kaynaklı fotoyaşlanmada bir çözüm olabileceği düşünülmektedir ve bu nedenle birçok çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla, *Polypodium leucotomos* (bir tropik eğrelti bitkisi) ekstraktının oral olarak alınmasının ya da yüzeysel olarak uygulanmasının foto koruma etkisi araştırılmıştır. Buna göre, *P. leucotomos* ekstraktının, oksidatif stresi, lipid peroksidasyonunu, dermal mast hücre infiltrasyonunu, inflamatuvar sitokinleri, DNA hasarlarını ve UV ile indüklenen tümörleri inhibe ettiği (Philips ve ark., 2010), eritemi, güneş yanığı hücrelerini, siklobütan primidin dimerlerini, çoğalan epidermal hücreleri, vazodilatasyonu, triptaz pozitif mast hücre ve dermal mast hücre infiltrasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı ve langerhans hücrelerini koruduğu (Middelkamp-Hup ve ark., 2004a ve 2004b) gösterilmiştir. Bu çalışmada UVAB+EA ve UVAB+SB tedavi gruplarındaki dermal mast hücre sayısında UVAB grubuna kıyasla istatistiksel anlamda belirgin bir düşüş gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol grubu dermal mast hücre sayısında EA ve SB verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı saptandı. Bulgularımız literatürle benzerlik göstermektedir.

İnsan epidermal kök hücreleri de UVAB radyasyonuna bir yanıt olarak apoptozise uğrayabilirler ve keratinositlere göre daha duyarlı olabilirler (Mei ve Liang, 2011). UVAB radyasyonundan sonra hasarlı DNA'nın apoptozisle süratli bir şekilde uzaklaştırılması gerekmektedir. Apoptozis, UVB radyasyonunun karsinojenik etkilerine karşı koruyucu bir mekanizmadır (Laethem ve ark., 2005). UVB hasarları ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, dorsal derileri 10 kJ/m² UVB radyasyonuna maruz bırakılan WBN/ILA-Ht sıçanların epidermislerindeki güneş yanığı hücrelerinin nükleuslarının TUNEL metodu ile güçlü bir şekilde boyandığı ve bunların ince yapı düzeyinde apoptotik nükleus için karakteristik olan özellikler gösterdikleri ve TUNEL pozitif keratinositlerin yüzde değerlerindeki değişikliğin, güneş yanığı hücrelerinin sayılarındaki değişiklik ile örtüştüğü gösterilmiştir (Kuroki ve ark., 2001).

UVB'den sonra doza bağlı olarak apoptotik keratinositlerin arttığı bulunmuştur (Kane ve Maytin, 1995). UV maruziyetinden sonra keratinosit apoptozisi ve bunu takiben apoptotik cisimciklerin uzaklaştırılmasının, epidermisi güneşe maruz kalan derinin DNA hasarlarının birikiminden korunmasını sağlayan bir mekanizma olduğuna

inanılmaktadır (Hedrych-Ozimina ve ark., 2011). Bu çalışmada da UVAB grubunun epidermisindeki TUNEL pozitif hücre sayısındaki artış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarla benzer şekilde, bu hücrelerin, TUNEL metodu ile güçlü bir şekilde boyanan ve apoptotik nükleus karakteristik özellikleri gösteren hücreler olabileceği de söylenebilir.

Bitki kaynaklı ajanlar kullanılarak deride UV ile oluşturulan hasarların azaltılmasına yönelik birçok çalışmada, bu ajanların derideki TUNEL pozitif hücre sayıları üzerindeki etkileri SKH-1 tüysüz fareler, HaCat hücre hattı, Balb/c fareler, insan fibroblast kültürleri, kan lenfositleri ya da gönüllülerden alınan biyopsi örneklerinin kullanıldığı sistemlerde araştırılmıştır. Renkli meyve ve sebzelerde bulunan bir antosiyanidin olan Delphinidin, ölümsüzleştirilmiş insan HaCaT keratinosit hücrelerinin ve fare derisi hücrelerini UVB ile indüklenen apoptozisten korumaktadır (Afaq ve ark., 2007). Benzer şekilde, insan derisine OM24 losyonunun (placebo içeriğe ek olarak %4 *Camellia sinensis* yaprak ekstraktı) %10'luk karışım uygulaması, apoptotik keratinosit sayısında anlamlı bir azalmaya neden olmaktadır (Mnich ve ark., 2008). Ayrıca, diyetle alınan silibininin (Dünya'da ve Amerika'da yoğun bir şekilde besin takviyesi olarak kullanılan doğal bir flavonoid) UVB'nin neden olduğu apoptozisi ve güneş yanığı hücrelerinin oluşumunu inhibe ederek deri epidermisinde UVB ile indüklenen hasarlara karşı çeşitli yollarla koruma sağladığı bildirilmiştir (Gu ve ark., 2005). Benzer şekilde, çoğunlukla çilek, sebzeler, çay, şarap ve bitkiler gibi doğal yiyeceklerde bulunan, kuersetine benzeyen bir flavonoid olan mirsetinin konsantrasyona bağlı olarak UVB ile indüklenen keratinosit ölümünü azalttığı (Huang ve ark., 2010b) ve ballıbabagiller bitki köklerinden elde edilen bir flavon olan baikalin'in UVB kaynaklı dermal siklobütan pirimidin dimer miktarını ve apoptozisi (TUNEL pozitif hücreler) azalttığı (Zhou ve ark., 2008) rapor edilmiştir. Ek olarak, deve dikeninde (*Silybum marianum*) bulunan bir flavonoid olan silimarinin, DNA hasarları miktarını azaltarak epidermal keratinositlerinde apoptozisi azaltabileceği (Katiyar ve ark., 2011) ve red Ginseng köklerinden izole edilen total saponinlerin ve ginsenosid Rb-1'in, UVB maruziyeti ile indüklenen apoptotik, Ki-67- ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin-pozitif hücrelerdeki artışı önlediği de bildirilmiştir (Kim ve ark., 2009).

Çalışmada UVAB+ EA ve UVAB+ SB tedavi gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısı, UVAB grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Bulgularımız yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. UVAB+ EA ve UVAB+ SB verilen tedavi gruplarında apoptotik hücrelerin UVAB grubuna göre daha az olmasının nedenini oluşturan serbest radikallere karşı bu maddelerin antioksidan özelliğinden dolayı ortamda bulunan serbest radikalleri nötralize ettiği ve dolayısı ile serbest radikallerin apoptozis mekanizmasına hasar vermesini önlediğini ve apoptozis mekanizmasının UV grubuna göre daha iyi çalıştığı kanaatindeyiz.

Çalışmada Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde UVAB verilen gruplarda TAS seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum literatürle uyumluluk göstermektedir (Saeed ve Salmo, 2012; Zeren, 2016; Zorer, 2016). TAS'ın düşmesinin nedeni UVAB'nin ROS'u arttırması olabilir (Piao ve ark., 2015). EA ve SB'nin tedavi amaçlı UVAB ile birlikte verildiği gruplar sadece UVAB'nin verildiği grupla kıyaslandığında TAS seviyesinde anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir artış görülmüştür. Bu değer UVAB'nin oksidatif hasar oluşturduğu bilgisini desteklerken (İbrahim, 2015). EA ve SB'nin de antioksidan etkisini ortaya koymuştur (Ambigaipalan ve ark., 2016; Sati ve ark., 2016).

TOS bulguları değerlendirildiğinde UVAB grubuna ait TOS değeri diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede yüksektir. Bununla beraber UVAB+EA ve UVAB+SB gruplarında UVAB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüşler tespit edilmiştir. Bulgular UVAB'nin oksidan seviyesini gruplarda arttırdığını göstermektedir. Önceki bir çalışmada UVAB'nin ROS'u arttırdığı ve fotoyaşlanmaya sebep olduğu saptanmıştır (Hiramoto ve Yamate, 2015; Zeren, 2016; Zorer, 2016). Çalışmamız UVAB uygulanan gruplarda gözlemlenen TOS seviyesindeki artış, UVAB'ye bağlı artmış oksidatif strese işaret etmektedir. Antioksidan etki göstermesi beklenen EA (Rios ve ark., 2018) ve SB (Liu ve ark., 2015) maddelerinin de beklenen etkiyi oluşturdukları gözlenmiştir.

OSI ise, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenmektedir (Kösecik ve ark., 2005). Gruplara ait OSI değerleri kıyaslandığında UVAB grubunda, Kontrol grubuna göre anlamlı bir artış, UVAB+EA ve UVAB+SB gruplarında ise UVAB grubuna göre anlamlı düşüşler görülmektedir. Elde edilen OSI değerleri çalışmadaki literatür ile uyumlu olan olan TAS ve TOS değerlerini desteklemiştir (Zeren, 2016; Zorer, 2016).

Sonuç olarak çalışmada elde ettiğimiz oksidatif stres belirteçlerinin değerleri kombine UVAB'nin oluşturduğu deri hasarının tedavisinde kullandığımız EA ve SB'nin etkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç ve önerilerimiz:

1) Derinin genel histolojisinde, tüm gruplarda, en dışta epidermis, altındaki dermiste kıl folikülleri ve saçları ile yağ bezleri ayırt edilmiştir. Derin dermiste ise yağ ve kas doku yer almaktadır.

2) EA ve SB'nin kollajen ve elastik lifler üzerinde, kombine UVAB ile indüklenen değişimleri önleyebileceği, verilen doza bağlı olarak epidermal kalınlığı azaltabileceği görülmüştür.

3) EA ve SB'nin kombine UVAB'nin birlikte uygulandığı grupta, mast hücre sayısının UVAB grubuna göre azalmasının istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir.

4) EA ve SB'nin deri yüzey ve yağ bezlerinin nötral lipit ve yağ asitlerinin yoğunluklarına bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

5) EA ve SB, kombine UVAB verilen tedavi gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısında azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir.

6) Stereolojik metotlarla EA ve SB'nin kombine UVAB radyasyonuna karşı doku koruyucu özelliği ilk kez sunulan çalışmada ortaya konmuştur.

Çalışmada kullandığımız EA ve SB'nin kombine UVAB ile oluşturulan deri hasarında koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Kanseri türlerinden biri olan deri kanserini önlemede bu maddelerin kullanımının etkili olacağı kanaatindeyiz. Böylelikle etken maddesi EA, SB veya kombine EA-SB olan güneş kremleri, losyonlar ve koruyucu antioksidan tabletler kombine UVAB'den korunmak için kullanılabilir. Kombine UVAB'nin deride oluşturduğu oksidatif, apoptotik ve genotoksik etkilere karşın, EA ve SB'nin koruyucu etkisinin ilk kez belirlenmiş olması sunulan çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

İleri düzeyde biyokimyasal, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik çalışmalarla sunulan çalışma verilerimizin desteklenmesi gerekir. Ayrıca elde edilen

bulgularla, ellajik asit ve silibininin farklı dozlarının oral olarak verilmesi veya topikal olarak denenmesi ile yapılacak *in vitro* ve *in vivo* benzer çalışmaların ileri moleküler analizlerle karşılaştırılması ve ellajik asit ve silibinin biyolojik etkilerinin ileri morfometrik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- Abu-Zaiton AS. Evaluating the effect of *Silybum marianum* extract on blood glucose, liver and kidney functions in diabetic rats. *Adv Stud Biol.* 2013; 5(10): 447-54.
- Afaq F, Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, et al. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J. Investig. Dermatol.* 2007; 127: 222-32.
- Akkaya VB, Erturan İ. Güneşten Koruyucuların İmmün Fonksiyonlar Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Cosmetol.* 2004; 5(4): 167-72.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınevi, Konya, 1995.
- Akyol M, Hayta SB. Fotoimmünoloji/Photoimmunology. *Turkderm, Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi.* 2013; 47 (1):52-7.
- Ambigaipalan P, de Camargo AC, Shahidi F. Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *J Agric Food Chem.* 2016; 31: 64(34): 6584-604.
- Arda O, Göksüğü N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014; 32(1): 3-13.
- Armstrong D, Browne R. The Analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes, and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 366: 43-58.
- Aydoğan H, Gürlek A, Parlakpınar H, Aksar I, Bay-Karabulut A, Aydoğan N, Fariz A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester CAPE on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007; 60: 563-8.
- Baggerly CA, Cuomo RE, French CB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, et al. Sunlight and Vitamin D: Necessary for Public Health. *J Am Coll Nutr.* 2015; 34(4): 359-65.
- Bancroft JD, Cook HC. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application.* London: 1994. Churchill Livingstone; 457.
- Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.* 2003; 53:151-64.
- Behar-Cohen F, Baillet G, de Ayguavives T, Garcia PO, Krutmann J, Peña-García P, et al. Ultraviolet damage to the eye revisited: eye-sun protection factor (E-SPF®), a new ultraviolet protection label for eyewear. *Clin Ophthalmol.* 2014; 8:87-104.
- Bharath A, Turner R. Impact of climate change on skin cancer. *J R Soc Med.* 2009; 102(6):215-18.
- Bhattacharya S. Phytotherapeutic properties of milk thistle seeds: An overview. *J Adv Pharmacy Edu Res.* 2011;1:69-79.
- Bickers DR, Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *J Invest Dermatol.* 2006;126:2565-75.

- Bisen PS, Bundela SS, Sharma A. Ellagic acid – chemopreventive role in oral cancer. *J. Cancer Sci. Ther.* 2012; 4: 23–30.
- Bolcal C, Yıldırım V, Doğancı S, Sargin M, Aydın A, Eken A, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res.* 2007; 139: 274-79.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15: 1089-100.
- Burns DA, Breathnach SM, Cox N, Griffiths CE, editors. *Rook's Textbook of Dermatology.* 7th edition. Malden, Mass: Blackwell Science; 2004.
- Byrne SN, Limo'n-Flores AY, Ullrich SE. Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon ultraviolet irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *J Immunol.* 2008; 180: 4648-55.
- Calani L, Brighenti F, Bruni R, del Rio D. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine.* 2012; 20: 40– 6.
- Carlson BM. *Human embryology and developmental biology.* 5th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Saunders; 2014.
- Chan FK, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2014; 33: 79–106.
- Cornélio Favarin D, Martins Teixeira M, Lemos de Andrade E, et al. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2:164202.
- Cruz-Orive LM. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. *J Microsc.* 1999, 193(3):182-98.
- Deda G, Atmaca LS. Ultraviyole ve Göz. *Ret-Vit.* 2001; 10:196-201.
- Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29: 447-63.
- Deniz ÖG, Altun G, Kaplan AA, Yurt KK, von Bartheld CS, Kaplan S. A concise review of optical, physical and isotropic fractionator techniques in neuroscience studies, including recent developments. *J Neurosci Methods.* In press. 2018.
- Diffey BL. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods.* 2002; 28: 4-13.
- Doo M, Kim Y. The Consumption of Dietary Antioxidant Vitamins Modifies the Risk of Obesity among Korean Men with Short Sleep Duration. *Nutrients.* 2017; 9 (7): 780.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4): 277-85.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12):1103-11.
- Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji.* 2. Baskı. İstanbul: 2016 a. İstanbul Tıp Kitapevleri.

- Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 2. Baskı. İstanbul: 2016 b. İstanbul Tıp Kitapevleri.
- Fuchs J. Oxidative Injury in Dermatopathology. Berlin: 1992. Heidelberg: Springer-Verlag; 48-57.
- Gonzalez VC, Beheregaray AC, Peres BM, Sallis ES, Varela Junior AS, Trindade GS. Histopathological Analysis of UVB and IR Interaction in Rat Skin. *Photochem Photobiol.* 2015; 91 (4): 895-900.
- Gonzales-Castañeda C, Gonzales GF. Hypocotyls of *Lepidium meyenii* (maca), a plant of the Peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008; 24: 24-31.
- Gordeziani M, Adamia G, Khatisashvili G, Gigolashvili G. Programmed cell self-liquidation (apoptosis). *Ann Agrar Sci.* 2017; 15 (1): 148-54.
- Grimbaldeston MA, Green A, Darlington S, Robertson BO, Marshman G, Finlay-Jones JJ, et al. Susceptibility to basal cell carcinoma is associated with high dermal mast cell prevalence in non-sunexposed skin for an Australian populations. *Photochem Photobiol.* 2003; 78: 633-9.
- Grimbaldeston MA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photoch Photobio Sci.* 2006; 5: 177-83.
- Gu M, Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwall R. Dietary feeding of silibinin prevents early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1344- 49.
- Gunaseelan S, Balupillai A, Govindasamy K, et al. Linalool prevents oxidative stress activated protein kinases in single UVB-exposed human skin cells. *PLoS ONE.* 2017;12 (5): e0176699.
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. *J. Microscopy.* 1977; 111: 219-23.
- Gundersen HJG, Jensen EB, Kiêu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology -reconsidered. *J Microsc.* 1999; 193(3):199-211.
- Hedrych-Ozimina A, Behrendt K, Hao Z, Pofahl R, Ussath D, Knaup R, et al. Enhanced contact allergen- and UVB-induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1. *Cell Death Differ.* 2011; 18: 155-63.
- Hiramoto K, Yamate Y. Gp91phox-derived reactive oxygen species/urocortin 2/corticotropin-releasing hormone receptor type 2 play an important role in long-term ultraviolet A eye irradiation-induced photoaging. *Photochem Photobiol.* 2016; 92: 180–6.
- Huppert B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade; morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol.* 1999; 200: 1-18.
- Huang CC, Hsu BY, Wu NL, Tsui WH, Lin TJ, Su CC, et al. Anti-photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. *Int. J. Mol. Sci.* 2010a; 12: 4782-95.
- Huang JH, Huang CC, Fang JY, Yang C, Chan CM, Wu NL, et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicol In Vitro.* 2010b; 24: 21–8.

- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology, Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Chapter 3. New York: 2005. Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Ibrahim AT. Negative impacts of ultraviolet-A radiation on antioxidant and oxidative stress biomarkers of African catfish *Clarias gariepinus*. *Photochem Photobiol Sci*. 2015; 14(7): 1337- 45.
- Ichihashi M, Ahmed NU, Budiayanto A, Wu A, Bito T, Ueda M, et al. Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *J Dermatol Sci*. 2000; 23 (Suppl 1):45-50.
- Iddamalgoda A, Le QT, Ito K, Tanaka K, Kojima H, Kido H. Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch Dermatol Res*. 2008; 300: 69-76.
- Inal ME, Kahramant A, Kökent T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26: 536–9.
- Ishii Y, Kimura T, Itagakil S, Doil K. The skin injury induced by high energy dose of ultraviolet in hairless descendants of Mexican hairless dogs. *Histol Histopathol*. 1997; 12: 383-89.
- Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem*. 1995; 41: 1135-38.
- Jemec GBE, Wulf HC. Quality assurance in dermatology- the development of a framework. *Int J Dermatol*. 1997; 36(10):721–6.
- Jeon HY, Kim JK, Kim WG, Lee SJ. Effects of oral epigallocatechin gallate supplementation on the minimal erythema dose and UV-induced skin samage. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009; 22:137-41.
- Kamp S, Jemec GB, Kemp K, Kjeldsen CR, Stenderup K, Pakkenberg, et al. Application of stereology to dermatological research. *Exp Dermatol*. 2009; 18:1001–9.
- Kamp S, Balkert LS, Stenderup K, Rosada C, Pakkenberg B, Kemp K, Jemec GB, Dam TN. Stereological Estimation of Epidermal Volumes and Dermo-Epidermal Surface Area in Normal Skin. *Dermatology*. 2011; 223:131-9.
- Kane K, Maytin EV. Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes in murine skin is reduced by mild local hyperthermia. *J Invest Dermatol*. 1995; 104: 62-7.
- Katakwar P, Metgud R, Naik S, Mittal R. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. *J. Cancer Res. Ther*. 2016; 12: 438–46.
- Katiyar SK, Meleth S, Sharma SD. Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11 b+ cells in mouse skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84:266-71.
- Katiyar SK, Mantena SK, Meeran SM. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PLoS ONE*. 2011; 6: e21410.
- Kavak A, Gürlevik Z. Ultraviyole Işınım Kaynakları ve Dozimetri. *Turkish Dermatology & Venerology / Turkderm*. 2010; 44:58-61.

- Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 3rd edition. Philadelphia: 2012. Elsevier Saunders; 339-63.
- Kim YG, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharmacol*. 2009; 602: 148-56.
- Kim JS, Bae BH, Park HJ, Kang BS, Kim DY, Hwang SY, et al. Protective effect of herbal extracts against skin wrinkle induced by UVB irradiation in hairless mice. *J Biomed Res*. 2010; 11:151-60.
- Kim Y, He YY. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis*. 2014; 1 (2): 188–98.
- Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component Oleuropein prevent chronic Ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J. Nutr*. 2009; 139: 2079- 86.
- Kiremitçi Ü. Ultraviole ve Ultravioleden Korunma. *İstanbul Tıp Dergisi*. 2005; 2: 25-7.
- Kligman LH, Murphy GF. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-Induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol*. 1996, 63: 123-7.
- Korkmaz A, Tümkaya L. Estimation of section thickness and optical disector height with a simple calibration method. *J. Microscopy*. 1997; 187(2): 104-9.
- Köseçik M, Erel Ö, Sevinç E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005; 100 (1): 61- 4.
- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther*. 2007; 6:110–9.
- Kuroki K, Kimura T, Nakayama H, Doi K. Acute dorsal skin responses to UVB-irradiation in wistar-derived hypotrichotic wbn/ila-ht rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2001; 53:1-6.
- Labrecque L, Lamy S, Chapus A, Mihoubi S, Durocher Y, Cass B, et al. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogen*. 2005; 26: 821-6.
- Laethem AV, Claerhout S, Garmynb M, Agostinis P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 1547-53.
- Leitenberger J, Jacobe HT, Cruz PD. Photoimmunology-illuminating the immune system through photobiology. *Semin Immunopathol*. 2007; 29: 65-70.
- Lemasters JJ. *Molecular Pathology The Molecular Basis of Human Disease*. Coleman W, Tsongalis G, editors. 2nd. edition. Chapter 1. Molecular Mechanisms of Cell Death. Academic Press. 2018; 1–24.
- Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Aging Res. Rev*. 2016; 31: 36–54.
- Light DBM, Cooley DA. *Cell, Tissues, and Skin*. Philadelphia. The Human Body, How It Works PA, USA 2004. Chelsea Housemate Publishers.

- Lin J, Selim A, Shea C, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and E. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48(6):866-74.
- Liu D, Fernandez BO, Hamilton A, Lang NN, Gallagher JMC, Newby DE, et al. UVA irradiation of human skin vasodilates arterial vasculature and lowers blood pressure independently of nitric oxide synthase. *J. Investig. Dermatol.* 2014; 134(7): 1839-46.
- Liu W, Li Y, Zheng X, Zhang K, Du Z. Potent inhibitory effect of silibinin from milk thistle on skin inflammation stimuli by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Food Funct.* 2015; 12:3712-9.
- Matz H. UV light and its interaction with cutaneous receptors. *Dermatol Clin.* 2007; 25: 633-41.
- Mazonakis M, Damilakis J, Varveris H. Bladder and rectum volume estimations using CT and stereology. *Comput Med Imaging Graph.* 1998; 22,195-201.
- Mei XL, Liang S. Ultraviolet B light-induced apoptosis in human keratinocytes enriched with epidermal stem cells and normal keratinocytes. *Chin Med J (Engl).* 2011; 124: 591-8.
- Middelkamp-Hup MA, Pathak MA, Parrado C, Garcia-Caballero T, Rius- Di'az Fi, Fitzpatrick TB, et al. Orally administered Polypodium leucotomos extract decreases psoralen-UVA- induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin. *J Am Acad Dermatol.* 2004a; 50: 41-9.
- Middelkamp-Hup MA, Pathak MA, Parrado C, Goukassian D, Rius-Di'az F, Mihm MC, et al. Oral Polypodium leucotomos extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. *J Am Acad Dermatol.* 2004b; 51: 910- 8.
- Miyachi Y, Horio T, Imamura S. Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates. *Clin Exp Dermatol.* 1983; 8(3): 305-10.
- Mnich CD, Hoek KS, Virkki LV, Farkas A, Dudli C, Laine E, et al. Green tea extract reduces induction of p53 and apoptosis in UVB-irradiated human skin independent of transcriptional controls. *Exp. Dermatol.* 2008; 18: 69-77.
- Mohamed SH, Badr FM, El-Aal HA, Mohamed RW, Ahmed BS. Quantitative microscopical and histochemical study of the skin of mice under the effect of exposure to ultra violet rays type-B. *Egypt J Hosp Med.* 2003; 12: 92-100.
- Morison WL. Phototherapy and photochemotherapy of skin disease. 3rd edition. Boca Raton: 2005. Taylor&Francis Group; p.1-31.
- Moore KL, Persuad TVN. The integumentary system. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects.* 5th edition. Philadelphia, Pa: Saunders. 1998; 481-96.
- Motchnik PA, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 269-79.
- Mouton PR. Principles and Practices of Unbiased Stereology, 1st ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2002.

- Muramatsu T, Kobayashi N, Tada H, Yamaji M, Shirai T, Mori T, et al. Induction and repair of UVB induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in organ-cultured normal human skin. *Arch Dermatol Res.* 1992; 284: 232-7.
- Neves NDA, Stringheta PC, Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of Jaboticaba (*Plinia spp.*) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem.* 2018; 252: 61-71.
- Odacı E, Bahadır A, Yildirim B, Sahin B, Canan S, Bas O, Bilgic S, Kaplan S. Cavalieri prensibi kullanılarak bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleri üzerinden hacim hesaplaması ve klinik kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2005; 25: 421-8.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest.* 2015; 6(3):331-6.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ. Solutions to old problems in the quantitation of the central nervous system. *J Neurol Sci.* 1995; 129 (Suppl.): 65-7.
- Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008; 22(4):395-401.
- Piao MJ, Susara Ruwan Kumara MH, Kim KC, Kang KA, Kang HK, Lee NH, et al. Diphloretohydroxycarmalol Suppresses Ultraviolet B-Induced Matrix Metalloproteinases via Inhibition of JNK and ERK Signaling in Human Keratinocytes. *Biomol Ther (Seoul).* 2015; 23 (6): 557-63.
- Philips N, Smith J, Keller T, Gonzalez S. Predominant effects of Polypodium leucotomos on membrane integrity, lipid peroxidation, and expression of elastin and matrixmetalloproteinase-1 in ultraviolet radiation exposed fibroblasts, andkeratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2003; 32: 1-9.
- Philips N, Bynum D, Hwang H. Counteraction of skin inflammation and aging or cancer by polyphenols and flavonoids from Polypodium leucotomos and Xanthohumol. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2010; 9: 142-9.
- Poblet E, Jiménez F, Ortega F. The contribution of the arrector pili muscle and sebaceous glands to the follicular unit structure. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 51(2):217-22.
- Prost-Squarcioni C. Histology of skin and hair follicle. *Med Sci.* 2006; 22(2):131-7.
- Pustisek N, Situm M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol.* 2011; 2: 339-41.
- Ramasamy K, Agarwal. R. Multi-target therapy of cancer by Silymarin. *Cancer Lett.* 2008; 269: 352-62.
- Ramezanipour M, Jalali M, Sadrzade-Yeganeh H, Keshavarz SA, Eshraghian MR, Bagheri M, et al. The effect of weight reduction on antioxidant enzymes and their association with dietary intake of vitamins A, C and E. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58:744-9.
- Rani UP, Kesavan R, Ganugula R, et al. Ellagic acid inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and prevents atheroma formation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24: 1830-9.

- Reefman E, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Apoptosis in human skin: role in pathogenesis of various diseases and relevance for therapy. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1051: 52–63.
- Renzing J, Hansen S, Lane DP. Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J Cell Sci.* 1996; 109: 1105-12.
- Ribatti D, Ennas MG, Vacca A, Ferreli F, Nico B, Orru S, et al. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33: 420-5.
- Rios JL, Giner RM, Marín M, Recio MC. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med* (in press). 2018. DOI: 10.1055/a-0633-9492.
- Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 12th edition. Philadelphia: 2012. Lippincott Williams & Wilkins; 339-44.
- Saeed AK, Salmo N. Epidermal growth factor receptor expression in mice skin upon ultraviolet B exposure - Seborrheic Keratosis as a coincidental and unique finding. *Adv Biomed Res.* 2012; 1:59.
- Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN. Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Exp Dermatol.* 2012; 21: 241-8.
- Sati J, Mohanty BP, Garg ML, Koul A. Pro-Oxidant Role of Silibinin in DMBA/TPA Induced Skin Cancer: 1H NMR Metabolomic and Biochemical Study. *PLoS One.* 2016; 14;11(7): e0158955.
- Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A review. *J Dental Allied Sciences.* 2012;1(2): 63-6.
- Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Boligon AA, Walker CI et al. Antiinflammatory and antioxidant effects of Aloe saponaria Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *J Photochem Photobiol.* 2014;133: 47–54.
- Sprouse-Blum AS, Smith G, Sugai D, Parsa FD. Understanding endorphins and their importance in pain management. *Hawaii J Med.* 2010; 69 (3):70–1.
- Sumiyoshi M, Hayashi T, Kimura Y. Effects of the nonsugar fraction of brown sugar on chronic ultraviolet B irradiation-induced photoaging in melanin-possessing hairless mice. *J Nat Med.* 2009; 63: 130- 6.
- Svobodová A, Vostálová J. Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. *Int. J. Radiat. Biol.* 2010; 86: 999–1030.
- Şahin B, Emirzeoğlu M, Uzun A, İncesu L, Bek Y, Bilgiç, S, Kaplan, S. Unbiased estimation of the liver volume by the Cavalieri principle using magnetic resonance images. *Eur J Radiol.* 2003; 47 (2) :164-70.
- Takema Y, Imokawa G. The effects of UVA and UVB irradiation on the viscoelastic properties of hairless mouse skin in vivo. *Dermatology.* 1998; 196:397-400.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.

- Viuda-Martos M, Fernandez-L'oez J, P'erez-alvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Compr Rev Food Sci F*. 2010; 9(6): 635–54.
- West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. 1990; 296: 1–22.
- Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47 (9): 1101-09.
- Winter SD, Vink AA, Roza L, Pavel S. Solar-simulated skin adaptation and its effect on subsequent UV-induced epidermal DNA damage. *J. Investig. Dermatol*. 2001; 117: 678-82.
- Yang L. Sunshine reduces the risk of cardiovascular disease in women. *Clinical Digest*. 2011; 25 (37): 17.
- Yogesh S, Pratyush I, Prashant S, Alok Pal J. Potentials of Botanicals as Sunscreen Agents: A Review. *J Pharmacogn Phytochem*. 2018; 10 (1): 68-72.
- Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Bito T, Nakamura M, et al. The Mandatory Role of IL-10– Producing and OX40 Ligand-Expressing Mature Langerhans Cells in Local UVB-Induced Immunosuppression. *J Immunol*. 2010; 184: 5670-7.
- Young AR. Chromophores in human skin. *Phys Med Biol*. 1997; 42: 789- 802.
- Yurt K, Kivrak E, Altun G, Mohamed H, Ali F et. al. A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods in neuroscience. *J. Chem. Neuroanat*. In press. 2018.
- Zhou BR, Jin SL, Chen XE, Lin XF, Cai BX, Gao J, et al. Protective effect of the baicalin against DNA damage induced by ultraviolet B irradiation to mouse epidermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008; 24: 175-82.
- Zeren E. Albino Sıçanlarda Ultraviyole A İle İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Kafeik Asit Fenetil Ester Ve Erdostein'in Antiapoptotik, Antigenotoksik Ve Antioksidan Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal Ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2016.
- Zorer B. Albino Sıçanlarda Ultraviyole B İle İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Arı Sütünün Antiapoptotik, Antigenotoksik Ve Antioksidan Etkisinin Moleküler, Biyokimyasal Ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2016.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Mardin'in Kızıltepe ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini Musabeyli Köyü İlkokulu Zonguldak'ta, ortaokul eğitimini İbrahim Hakkı Konyalı İlköğretim Okulu İstanbul'da, lise eğitimini ise Kandilli Kız Anadolu Lisesi İstanbul'da tamamladı. Lisans eğitimini 2008 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ordu Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde, birinci yüksek lisans eğitimini ise 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında tamamladı. 2015 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ikinci yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılından beri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi



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

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

Araştırmanın Adı	Sıçanlarda Ultraviyole A ve B İle İndüklenmiş Deri Hasarında Ellajik Asit ve Silibininin Doku Koruyucu, Antiapoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Moleküler ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması	
Title of the Research	Investigation of Tissue Protective, Antiapoptotic and Antioxidant Effects of Ellagic Acid and Silibinin in Ultraviolet A and B Induced Skin Damage in Rats by Molecular and Stereological Methods	
Araştırmacı(lar) / Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator : Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Doç. Dr. Halil ÖZKOL (2. Danışman) Tıbbi Biyoloji AD. Araş. Gör. Seda KESKİN Tıbbi Histoloji-Embriyoloji AD.	
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date:	13/04/017	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date:	1/06/2018	
Proje Süresi / Total Time of Project:	14 ay	
Proje No / Project Number:	TYL-2017-6175	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):	Van YYÜ Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı	
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding:	Türk Lirası, 7.465 TL	
Karar:	Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26/07/2018 tarih ve 2018/07/01 sayılı ara kararı ile kabul edilmiştir.	
Decision:	Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 26/07/2018 (Additional decision number 2018/07/01).	
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
 ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	 ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	 ÜYE Prof. Dr. Suphi DENİZ
 ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	 ÜYE Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	 ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
 ÜYE Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Oruc ALLAHVERDİYEV	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Cansel Yılmaz DEMİR
 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Haacer ŞAKİN AYDINYURT	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Şükrü ONALAN	 ÜYE Vet. Hek. Kerem OĞRAK
 ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	 ÜYE Zir. Muh. Kenan YILDIRIMOĞLU	

EK 2. Tez İntihal Raporu

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 3/08/2018	
Tez Başlığı / Konusu: Sıçanlarda Ultraviyole A ve B İle İndüklenmiş Deri Hasarında Ellajik Asit Ve Silibininin Doku Koruyucu, Antiapoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Moleküler ve Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması	
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 89 sayfalık kısmına ilişkin, 3/08/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 16 (on altı) dır. Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir: - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)	
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksininin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim.	
Seda KESKİN 3/08/2018 Tarih ve İmza	
Adı Soyadı: SEDA KESKİN Öğrenci No: o159302021 Anabilim Dalı: Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji ABD. Programı: Tıp Statüsü: Y. Lisans	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ (Unvan, Ad Soyad, İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Semih DEDE Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Unvan, Ad Soyad, İmza)