

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**“ALBİNO RATLARDA ULTRAVİYOLE - C İLE İNDÜKLENMİŞ  
DERİ HASARI MODELİNDE ANTOSİYANİNİN ETKİSİ”**

**Sinan SORAL**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2010**



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**“ALBİNO RATLARDA ULTRAVİYOLE - C İLE İNDÜKLENMİŞ  
DERİ HASARI MODELİNDE ANTOSİYANİNİN ETKİSİ”**


**Sinan SORAL**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2010**

Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'in danışmanlığında, Sinan SORAL'ın hazırladığı "Albino Ratlarda Ultraviyole-C İle İndüklenmiş Deri Hasarı Modelinde Antosiyaninin Etkisi" konulu bu çalışma 21.06.2010 tarihinde aşağıdaki juri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Yaşın TÖLÜCE

  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ

**Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.**

**Prof. Dr. Mehmet CİCİ**  
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.**  
Proje No: 917

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün veya başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ.....	I.
ABSTRACT.....	II.
TEŞEKKÜR.....	III.
ÖNSÖZ.....	IV.
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V.
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI.
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	VII.
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Ultraviyole Radyasyon.....	6
2.1.1. Ultraviyole nedir?.....	6
2.1.2. Ultraviyole'nin zararlı etkileri nelerdir? .....	8
2.1.2.1. UV'nin deri üzerine etkileri.....	8
2.1.2.2. UV'nin göz üzerine etkileri.....	11
2.1.2.3. UV'nin bağışıklık üzerine etkileri.....	11
2.1.3. UV'nin yararlı etkileri nelerdir? .....	11
2.2. Serbest Radikaller.....	12
2.2.1. Serbest radikal nedir? .....	12
2.2.2. Serbest radikaller nasıl oluşur? .....	12
2.2.3. Serbest radikallerin etkileri nelerdir? .....	15
2.2.3.1. Serbest radikallerin membran lipidlerine etkileri.....	16
2.2.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri.....	17
2.2.3.3. Serbest radikallerin karbohidratlara etkileri.....	17
2.2.3.4. Serbest radikallerin nükleik asitlere etkileri.....	17
2.3. Antioksidanlar.....	18
2.3.1. Antioksidan nedir? .....	18
2.3.2. Antioksidanlar nasıl etki ederler? .....	18
2.3.3. Antioksidan vitaminler.....	19
2.3.3.1. Vitamin A.....	19
2.3.3.2. Vitamin C.....	20
2.3.3.3. Vitamin E.....	21
2.3.4. Glutatyon .....	22
2.3.5. Lipid peroksidasyonu.....	24
2.3.6. Protein karbonil.....	25
2.4. Apoptozis .....	26
2.4.1. Apoptotik hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler.....	29
2.4.2. Deri ve Apoptozis.....	29
2.5. Hibiscus sabdariffa.....	31
2.6. Antosiyanin.....	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	36
3.1. Deney Hayvanları.....	36
3.1.1. Deney hayvanlarının temini.....	36

3.1.2. Deney hayvanlarının gruplara ayrılması.....	36
3.1.3. Deney hayvanlarının tıraşlanması.....	37
3.1.4. Deney hayvanlarının beslenmesi.....	37
3.2. Ekstraktın Hazırlanması.....	38
3.3. Antosiyanin miktarının hesaplanması.....	39
3.4. Ultraviyole-C lambası.....	39
3.5. Deneysel uygulamalar.....	40
3.6. Solüsyonların hazırlanması.....	41
3.7. Kan serumlarının ayrılması ve analizlerin yapılması.....	43
3.8. Çalışma için gerekli malzeme ve kimyasallar.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	49
4.1. Araştırma bulguları.....	49
4.1.1. Klinik sonuçlar.....	49
4.1.1.1. Ağırlık değişim takibi.....	50
4.1.1.2. Deney sonuna kadar kazanılan net ağırlık ve yüzdesi.....	51
4.1.2. Antioksidan Parametreler.....	52
4.1.2.1. Serum vitamin A sonuçları.....	52
4.1.2.2. Serum vitamin C sonuçları.....	53
4.1.2.3. Serum vitamin E sonuçları.....	54
4.1.2.4. Serum MDA sonuçları.....	55
4.1.2.5. Serum GSH sonuçları.....	56
4.1.2.6. Deri MDA sonuçları.....	57
4.1.2.7. Deri GSH sonuçları.....	58
4.1.2.8. Beyin dokusu Apoptozis görüntüleri.....	59
4.2. Tartışma.....	60
4.2.1. Vitamin A.....	60
4.2.2. Vitamin C.....	61
4.2.3. Vitamin E.....	61
4.2.4. Serum MDA.....	62
4.2.5. Deri MDA.....	62
4.2.6. Serum GSH.....	63
4.2.7. Deri GSH.....	64
4.2.8. Apoptozis.....	64
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	80
EKLER.....	81
ÖZET.....	90
SUMMARY.....	94

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ALBİNO RATLARDA ULTRAVİYOLE C İLE İNDÜKLENMİŞ DERİ HASARI MODELİNDE ANTOSİYANİNİN ETKİSİ

Sinan SORAL

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ  
Yıl: 2010, Sayfa: 96.

Bu araştırmada sıçanlarda ultraviyole C'nin (UV-C) neden olduğu indüklenmiş deri hasarı modelinde *Hibiscus sabdariffa* bitkisi ekstraktında bulunan antosiyaninin etkisi incelenmiştir. *Hibiscus sabdariffa* bitkisi ekstraktında bulunan antosiyaninin miktarı hesaplanarak üç farklı dozu içme suları ile verildi. Deney hayvanlarının kan serumunda A, C ve E vitaminlerinin MDA, GSH'nin ve deri dokusunda MDA, GSH'nin seviyeleri çalışılmıştır. Ayrıca beyin dokusunda apoptozise bakılmıştır. Kontrol grubu 6 diğer gruplarda 7 tane sıçan olacak şekilde kontrol, UV ve UV + 2,5mg/kg/gün antosiyanin, UV +5mg/kg/gün antosiyanin ve UV +10mg/kg/gün antosiyanin olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Bu gruplar ebatları 80x80x100 cm olan UV-C kabini içinde 40 gün boyunca günde dört saat UV-C ışığına maruz bırakıldı. 40. gün bütün sıçanlar anestezi edilerek deri beyin dokuları ve Abdomen ve toraks kesilerek açıldıktan sonra kalpten kan alındı. Alınan kanın bir kısmı 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıştırıldı. Kan serumlarında vitamin A, C ve E, GSH ve MDA seviyeleri tespit edildi. Yapılan analizler sonucu kontrol grubuna göre vitamin A seviyesinde UV ve UV+10 mg antosiyanin grubunda görülen artış ve Kontrol grubuna göre UV+2.5 ve UV+5 mg antosiyanin grubunda görülen azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Vitamin C seviyesinde kontrol grubuna göre uygulama gruplarında genel bir azalma görülmekle birlikte bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grupların serum vitamin E seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında düşüş gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grupların serum MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüş gözlenmiştir. UV gruplarındaki düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grupların serum GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV ve UV+5 grubunda azalma ve UV+2,5 grubunda artış gözlemlendi fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki artış gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grupların deri MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV, UV+2,5, UV+10 gruplarında artış UV+5 grubunda ise azalış görülmüştür. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grupların deri GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre bütün gruplarda bir azalma görülmüştür. UV grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunurken UV+2,5, UV+5 ve UV+10 gruplarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarında azalma görülmüştür. Bu azalmalardan UV+2,5 ve UV+5 grupları istatistiksel olarak anlamlı UV+10 grubu ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Beyin dokusunda DNA ladder kit ile apoptozis görüntülerine bakıldığında ise koruyuculuğu en iyi dozun UV+5 mg/gün/kg olduğu görülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Ultraviyole C, Antosiyanin, Antioksidanlar, Apoptozis

## ABSTRACT

### Master Thesis

## THE EFFECT OF ANTHOCYANIN IN ULTRAVIOLET C INDUCED SKIN DAMAGE MODEL IN ALBINO RATS

Sinan SORAL

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Year: 2010, Page 96.

In this study, the effect of antosiyanin of *Hibiscus sabdariffa* extracts was evaluated in albino rats exposed to ultraviolet C. *H. sabdariffa* plants calix containing various amounts antosiyaninin was given as drinking water to the rats. In the blood serum, levels of vitamin A, C and E, and skin tissue levels of MDA, GSH were studied. Moreover, apoptosis was examined in brain tissue. Control group contained 6 and the other groups contained 7 rats. These groups were designed as UV exposed rats (UV); UV + 2,5mg/kg/day antosiyanin, 5mg/kg/day antosiyanin, 10mg/kg/day antosiyanin and control. All the experimental rats were disected and blood, skin and brain tissues were sampled under anesthesia on the 40<sup>th</sup> day. The blood sample was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes. Vitamin A, C, E and GSH, MDA levels were determined in the blood sera. The vitamin A levels in the rats were found high in the UV and UV +10 mg anthocyanin group and The vitamin A was found low in the UV +2.5 mg and UV +5 mg anthocyanin group as compared to the control group. Vitamin C levels were found low as compared to all groups, however, this decrease was not found statistically important. Also, vitamin E was found low in all groups, however, this was not statistically significant. MDA levels were found low in all groups when comparison was made to the control group. The reduction in UV and UV +10 groups were found statistically significant. GSH level was found low in UV and UV+5 group, and that of UV +2.5 group was found high as compared to the control group. Changes in MDA levels of in UV, UV+2.5, UV+10 increased but, it decreased in UV +5. These changes were not statistically significant. Skin GSH levels were decreased in all groups, these were stasticially significant in UV+2,5, UV+5 and UV+10 groups. UV+5 group caused apoptosis in brain tissue, which UV damage was ended by the induction of apoptosis.

**KEY WORDS:** Ultraviyolet C, Anthocyanin, Antioxidant, Apoptosis



## ÖNSÖZ

Son yıllarda sıcak bölgelerde tatil yapılmasının, güneşlenme alışkanlığının ve dışarıda yapılan sporların artması, endüstride kullanılan ve teknoloji ile hayatımızın her alanına girebilen ultraviyole (UV) yayan çeşitli cihazların artması ile insanlar yoğun olarak UV'ye maruz kalmaktadır. UV'ye maruz kalmanın artması ile birlikte UV'nin zararlı etkileri de son yıllarda artış göstermektedir. UV ışınları 100-400 nm dalga boyundaki ışınlar olup başlıca üç spektruma ayrılmaktadır. UV ışınları serbest radikal oluşumuna sebep olarak vücudumuza zarar vermektedir.

Serbest oksijen radikalleri dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküller yapılar olarak tanımlanır. Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir.

Serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfı da antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ya da ortamdan uzaklaştırarak, bu zararlı etkilerine karşı gelmektedir. Aralarında ön planda karotenoidler, vitamin C, vitamin E, ve polifenollerin sayılabileceği bu antioksidanlar, sebze ve meyvelerde bol miktarlarda bulunmaktadır.

Bitkilerden elde edilen antioksidanlar son yıllarda yoğun bilimsel araştırmalara konu olan ve buna paralel olarak da giderek artan bir kullanım potansiyeline sahip doğal bileşiklerin başında gelmektedir. Bu çalışmada zengin bir antioksidan içeriğe sahip olan Hibiscus sabdariffa bitkisi kalikslerinden elde edilen flavanoid olan antosiyanin kullanılmıştır.

Bu çalışmayı seçmemin amacı hem yüksek lisansımı yaptığım alan gereği biyokimyasal ve moleküler parametrelere bakmak hem de bir biyolog olarak insanoğlunun çevreyi acımasızca kirletmesi sonucu gelecekte bizi bekleyen tehlikeleri tekrar gündeme getirmektir.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca bilgilerinden faydalanma imkanı bulduğum danışmanlarım Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'e ve Yard. Doç. Dr. Yasin TÖLÖCE' ye teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. İsmail KOYUNCU'ya, Uzman Eyyüp YAŐAR'a ve Yüksek Lisans arkadaşlarım Fuat KARAKUŐ'a, Semih SAYIN'a ve Aslı YÖRÖKOĐLU'na manevi destekte bulunan Arş. Gör. Arif PARMAKSIZ'a ve Biyoloji Bölümü'ndeki tüm akademik personele saygı ile teşekkür ediyorum. Ayrıca destekleri ile her zaman yanımda olan aileme ve projemi kabul edip destek sağladığı için HÖBAK'a, zamanlarımı ayırarak tez savunmamda bulunacak olan tez jürime ve tüm katılımcılara şimdiden teşekkür ederim.

*Annem ve Babama...*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa  
No

Şekil 2.1.	Antioksidan-serbest radikal dengesi.....	14
Şekil 2.2.	Vitamin A.....	21
Şekil 2.3.	Vitamin C.....	22
Şekil 2.4.	$\alpha$ -tokoferolün yapısı.....	23
Şekil 2.5.	Glutasyon'un Molekül Yapısı.....	24
Şekil 2.6.	Flavinum molekülünün yapısı.....	34
Şekil 3.1.	UV-C Kabini.....	40
Şekil 4.1.	Deney süresi boyunca gruptaki ağırlık değişimi.....	51
Şekil 4.2.	Deney sonuna kadar kazanılan ağırlık yüzdesi.....	52
Şekil 4.3.	Serum vitamin A seviyesi.....	53
Şekil 4.4.	Serum vitamin C seviyesi.....	54
Şekil 4.5.	Serum vitamin E seviyesi.....	55
Şekil 4.6.	Serum MDA miktarı.....	56
Şekil 4.7.	Serum GSH miktarı.....	57
Şekil 4.8.	Deri MDA miktarı.....	58
Şekil 4.9.	Deri GSH miktarı.....	59
Şekil 4.10.	Apoptozis görüntüleri.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa  
No

Çizelge 3.1.	Deney hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yemin içeriği.....	38
Çizelge 3.2.	Hibiscus ekstraksiyon miktarı ve total antosiyanin içeriği.....	39
Çizelge 3.3.	Stok solüsyondan çalışma standart solüsyonunun hazırlanması.....	46
Çizelge 3.4.	MDA standart serisinin hazırlanması.....	46
Çizelge 3.5.	GSH analizi için çalışma solüsyonu hazırlama .....	47
Çizelge 3.6.	GSH standart serisinin hazırlanması.....	47
Çizelge 4.1.	Deney süresi boyunca gruptaki ağırlık değişimi .....	51
Çizelge 4.2.	Deney sonuna kadar kazanılan net ağırlık ve yüzdesi.....	52
Çizelge 4.3.	Serum vitamin A seviyesi .....	53
Çizelge 4.4.	Serum vitamin C seviyesi .....	54
Çizelge 4.5.	Serum vitamin E seviyesi .....	55
Çizelge 4.6..	Serum MDA miktarı .....	56
Çizelge 4.7.	Serum GSH miktarı.....	57
Çizelge 4.8.	Deri MDA miktarı.....	58
Çizelge 4.9.	Deri GSH miktarı.....	59

## SİMGELER DİZİNİ

UV	: Ultraviyole
UVR	: Ultraviyole Radyasyonu
UV-A	: Ultraviyole-A
UV-B	: Ultraviyole-B
UV-C	: Ultraviyole-C
HSE	: Hibiscus sabdariffa ekstraktı
Nm	: Nanometre
MDA	: Malonaldehit
GSH	: Glutasyon
LOO	: Lipitperoksil radikali
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redükte formu
LPO	: Lipid peroksidasyonu
UV	: Ultraviyole
UVR	: Ultraviyole Radyasyonu
UV-A	: Ultraviyole-A

## 1. GİRİŞ

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

Canlılar için vazgeçilmez yaşam kaynaklarından biri olan güneşin elektromanyetik izgede (spektrum) 1 nm dalga boyunun altındaki dalga türü X-Ray (iyonize), 200-290 nm arası ultraviyole-C (UV-C), 290-320 nm arası ultraviyole-B (UV-B), 320-400 nm arası ultraviyole-A (UV-A), 400-800 nm arası görünür ışınlar, 800-100.000 nm arası infrared, 100.000 nm'den büyük radyo dalgaları ve mikrodalgalarıdır. Ultraviyole radyasyon (UVR), tüm hayatımız boyunca devamlı olarak maruz kaldığımız bir tür görünmez iyonize olmayan radyasyon şeklidir. Ultraviyole (UV), solar radyasyonun doğal düşük yoğunluklu bir bileşenidir (Howard, 1990; Duthie ve ark. 1999; Afag, ve Mukhtar, 2001; Afaq ve ark. 2002; Arabacı ve ark. 2003).

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

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

UV-C yaşam için en tehlikeli olanıdır. Deriye aşırı bir şekilde zarar vermektedir. Güneşten gelen UV-C atmosferde bulunan moleküler oksijen ve ozon tarafından tamamına yakını absorbe edilmektedir. Fakat insanın çevreyi kirletmesi sonucu atmosferde olan deformasyon nedeniyle yaşam için oldukça zararlı olan UV-C yeryüzünü tehdit etmektedir (Clydesdale ve ark. 2001; De Gruijl, 2002).

UV-C'nin tamamına yakını, normal şartlarda, atmosferin stratosfer tabakasında moleküler oksijen ve ozon tarafında absorbe edilir (Robert, 1997).

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

UV'ye uzun süre maruz kalan deride serbest oksijen türevleri oluşmaktadır. Bu türevler DNA, protein, yağlar ve şeker moleküllerinde oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu oksidatif hasarın sonucunda hücre metabolizması, morfolojisi ve ultra yapısında zararlı değişikliklere neden olmaktadır. UV'den dolayı oluşan serbest radikaller hücre düzenlenme yoluyla interaksiyona girerek hücrenel farklılaşma, çoğalma ve apoptozis mekanizmasını etkilemektedir. Hücrede meydana gelen bu değişiklikler de foto yaşlanmayı ve deri kanseri oluşumunu tetiklemektedir (Svobodová ve ark. 2003).

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

Son yıllarda çeşitli tehlikeli hastalıkların solar radyasyona bağlı olarak geliştiği ve bu tehlikenin gittikçe büyüdüğü gözlenmektedir. Memeli derisinin UV'ye uzun süre maruz kalması sonucunda eritema, edema, güneş yanığı, hücrenel deformasyon,

hiperplazi, immün süpresyonu, DNA hasarı, foto yaşlanma ve melanogenezis oluşmaktadır. Bu olgular da direkt veya indirekt olarak deri kanseri oluşumuna sebep olmaktadır (Goihman-Yahr, 1996; Afag ve Mukhtar, 2001; Tebbe, 2001). UV-A'ya maruz kalma sonucu, derinin kollajenin yapısında çok sayıda çapraz bağ oluşumu, çözünürlüğünde azalma, denatürasyon gibi değişiklikler olur. Sonuçta, deride elastoz, ince ve kalın kırışıklıklar, kuruluk, gevşeme, kabalaşma, kılcal damar kümeleri, düzensiz pigmentasyon, yer yer sarımsı renk, çok sayıda iyi ya da kötü huylu tümörler görülür (Robert, 1997).

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

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

Çevresel faktörlerden en önemlileri doğal ya da yapay UV ışınlarıdır. Bu ışınlara uzun süreli ve tekrarlayıcı biçimde maruz kalma sonucu, derinin yapı ve işlevlerinde bozulma ve yaşlanma gelişir (Wintrobe, M., and Thorn, G., 1976). Günlük besin tüketimindeki antosiyaninlerin, insan kan plazmasındaki antioksidan savunma statüsünü geliştirdiği gösterilmiştir (Cao ve Prior, 1999).

UV ışınlarının derimize çarpması sonucu serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine zarar veren moleküllerdir. Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser reaksiyonlarını



engelleyen moleküllerdir. Eğer serbest radikaller nötralize edilmez ise vücutta ciddi hasarlara neden olabilir.

Modern gıda bilimi, UVR irritasyonlarının oluşturduğu deri bozukluk riskini azaltmada özel besin katkılarının rolüyle yakından ilgilenmektedir. Doğal antioksidanlar UVR'nin neden olduğu deri hasarını önlemede kullanılmaktadır. Çünkü bazı antioksidanların kollajen sentezini artırarak ve matriks metaloproteinazları koruyarak kırışıklık oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Cho ve ark. 2007). Derideki plazma membran komponentleri ve makromoleküllerin oksidatif fotohasarı ile oksidatif stres sonucu olarak reaktif oksijen türevlerinin oluşumdaki artış antioksidan savunma mekanizmasını bastırmaktadır (Cho ve ark. 2007). Çalışmamızda insanların bitki çayı olarak tükettikleri Kerkede bitkisinin (*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)) ihtiva ettiği yüksek antosiyaninin insan antioksidan kapasitesini artıracığını düşünüyoruz.

Antosiyaninler, antioksidan, yağların etkisini önleyici, iltihap kurutucu, kasılma önleyici, serumda kolestrolü düşürücü ve bazı kanser tiplerinde tedavi edici olarak kullanılır (Hendry ve Houghton, 1996).

Normal şartlarda atmosferde bulunan ozon tabakası ve moleküler oksijen tarafından emilen UVC'nin, son yıllarda ozon tabakasındaki incelmeler ya da delinmelerden sonucu yeryüzüne ulaşması ile canlı hayatını tehdit etmeye başladığı rapor edilmiştir.

Belli sırt bölgeleri tıraşlanmış deney hayvanları, kurulan UV kabininde UVC lambası altında, günde dört saat kırk gün boyunca iyonize olmayan radyasyona maruz bırakılmıştır.

UVC'nin serbest radikal oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Deney hayvanlarında, UVC ile oluşması beklenen serbest radikallere karşı *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin kaliks ekstraktında bulunan antosiyaninin üç farklı dozunun etkisi araştırılmıştır.

Deney sonucunda deney hayvanlarının kan serumlarında Vit-A, C, E, MDA, GSH, deri dokusunda ise MDA, GSH seviyeleri ölçülecektir. Ayrıca beyin dokusu apoptozis görüntülerine bakıldı.

Çalışma da aşağıdaki verilere ulaşılması amaçlanmıştır;

UV’C’nin oluşturduğu serbest radikallere karşı serumda vitamin A,C,E, GSH ve MDA miktarı, deri dokusunda GSH ve MDA miktarına ayrıca beyin dokusunda apoptozise bakılması amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Ultraviyole Radyasyon

#### 2.1.1. Ultraviyole nedir?

Ultraviyole (UV) radyasyon, yeryüzüne erişen güneş enerjisinin bir parçasıdır. Yeryüzüne ulaşan güneş radyasyonunun yaklaşık % 5'ini oluşturur ve dalga boyları 100-400 nm arasındadır. Aralığın; % 95-98'i UVA, % 2-5' i UVB'dir, UVC yeryüzüne ulaşmadan stratosferik ozon tabakasında emilir. Eğer normalin üzerinde bir miktarda UV dünyaya erişirse, en kısa dalga boylu UV radyasyon çok fazla oranlarda biyolojik zarar verici olabilir, (Karaduman, 1999). UV ışınları 100–400 nm dalga boyundaki ışınlar olup başlıca üç spektruma ayrılmaktadır.

UV A (320- 400nm): En düşük enerjili ve daha az tehlikeli UV ışınıdır. UVA ışınları doza bağlı olarak eritem, bronzlaşma, yaşlanma ve kanser oluşumuna neden olmaktadır, ancak bu etkilerin ortaya çıkması için UVB ışınlarının 1000 katı kadar ışın dozuna gerek vardır.

UVA maruz kaldıktan sonra singlet oksijen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hidroksil serbest radikalleri üretilir. Bunlar Hücrel proteinlere lipidlere ve sakkaridlerde hasara yol açar. UVA ile incinen endotelial hücreler nekrozise karşı daha meyimli olmaktadır. Bu nedenle dermal kan damarları hasara uğrar. UVA; DNA'da yapısal hasara uğratacak , immün sisteme zarar verecek ve kansere yol açabilecek yapılar oluşturur. Bu zararların %67'sini malign melanoma oluşturur (Trautinger, 2001; Afag ve Mukhtar, 2001; Clydesdale ve ark., 2001; Afag ve Mukhtar, 2002).

UV B (290- 320 nm): İnsan ve diğer yaşam formları için en zararlı olanıdır. İleri derecede bronzlaşma, yanık ve yaşlanmadan sorumludur. Deri kanseri ve

katarakta yol açar. Bitkilerin gelişimini yavaşlatır ve doğal yaşam ve diğer hayvanların yaşamını etkiler (Hawk, 1992; Ekici ve Acar, 2003; Karaduman, 2009).

UV B'nin etkisi temelde derinin epidermal bazal hücre tabakasıdır. UVB; pirimidin fotoüretiminin formasyonları, uroconic asitin trans-cis- izomerizasyonu, ornitin dekarboksilasyonun indüklenmesini, DNA sentezinin stimülasyonu, deride serbest radikal oluşumu, hücre döngüsünün durdurulması, fotoyaşlanma ve fotokarsinogenezis gibi direk veya indirekt olarak zararlı biyolojik oluşumlara yol açmaktadır. Derideki antioksidanların önemli ölçüde azalması derinin güneş ışığına maruz kalmaktan oluşan serbest radikallere karşı kendini koruma sistemine zarar vermektedir. UVB deri kanseri (squamous and basal cell carcinoma) oluşturmaktan ve DNA hasarından sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca derinin immün savunma sistemini zayıflattığı düşünülmektedir. (Clydesdale ve ark., 2001; Trautinger, 2001; Afag ve Mukhtar, 2002; De Gruijl, 2002).

UVB radyasyonu yanıcı ışın olarak adlandırılır ve UV ışığının %4 -5'ini oluşturur fakat solar ışıktan daha etkili taneciklere sahiptir. UVB güneş yanığı oluşturmada UVA' dan 1000 kat daha etkilidir. UVB; UVA'dan daha genotoksiktir.

UV C (200- 290 nm): Ozon tabakası tarafından tutulduğu için, normal atmosfer şartlarında yeryüzüne ulaşamayan ışındır. Son yıllarda ozon tabakasında oluşan incelmeler ve delikler nedeni ile yeryüzüne doğrudan ulaştığı için önemi artmıştır. Havanın mikropsuzlaştırılması gibi uygulama amacıyla da kullanılmaktadır. Güçlü karsinojendir. Konjunktiva ve kornea için irkilticidir (Gül, 2001).

UVC yaşam için bütün türlerden en tehlikeli olanıdır. Çok kısa süre maruz kalmaktan bile deri için oldukça tehlikelidir. Neyse ki güneşten gelen UVC radyasyonunun tamamına yakını moleküler oksijen ve yeryüzünün atmosferindeki ozon tarafından absorbe edilmektedir. Yeryüzüne 290 nm dalga boyundan daha kısa dalga boylu solar radyasyonu ulaşmamaktadır (De Gruijl, 2002; Clydesdale ve ark., 2001).

1970 ve 1987 yılları arasında koruyucu ozon tabakasındaki önemli hasardan dolayı ultraviyole radyasyonu artık yeryüzüne ulaşmaktadır (Duthie ve ark., 1999).

### **2.1.2. Ultraviyole'nin zararlı etkileri nelerdir?**

Güneş ışığı içinde yer alan ultraviyole (UV) radyasyonu, kısa dalga boylu ve yüksek enerjili olması sebebiyle canlılar üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır (WHO, 1979; WHO, 1994). Ozon tabakasının incilmesi ile yeryüzüne ulaşan UV radyasyonunun özellikle deri kanseri, katarakt ve bağışıklık yetmezliği gibi hastalıkları artıracığı tahmin edilmektedir (Stolarski, 1988; Yel ve Güven, 1990).

#### **2.1.2.1. UV'nin deri üzerine etkileri**

Deride UV ısınlarını absorbe eden pek çok madde bulunduğu düşünülse de DNA ve ürokanik asit bugüne kadar saptanmış iki önemli maddedir (Morrison, 1985). Ürokanik asit, UV'nin 270 nm civarındaki ışınlarını yoğun olarak absorbe etme özelliği nedeniyle ilgi odağı olmuştur. UV ışınları trans-ürokanik asit tarafından absorbe edildiğinde singlet oksijen açığa çıkar. Singlet oksijen oldukça reaktif bir oksijendir ve hücre membranlarına saldırarak daha fazla reaktif oksijen oluşumuna yol açar (Kanjilal ve Ananthaswamy, 1996).

Ultraviyole'nin deri üzerine etkileri akut ve kronik olmak üzere iki grupta incelenir.

UV'nin ani etkileri: UV'nin ilk etkileri arasında güneş yanığı, bronzlaşma, hiperplazi, immunosupresyon, D vitamini sentezi ve fotoonkoliz bulunmaktadır. Güneş yanığı iltihaplanması, ultraviyole ışınlarının ilk ve en bilinen ani deri tepkisidir. Özellikle açık tenli kişilerde, eritem, ısı artışı, ağrı ve ödem gibi iltihaplanma klasik belirtileri biçiminde ortaya çıkar. Eritem oluşumundan UVB ışınları sorumludur. Eritem, güneş ışınlarına maruz kalmadan sonraki birkaç saat içinde başlar. 6-24 saatte en üst seviyeye ulaşır, birkaç günde yerini soyulma ve bronzlaşmaya bırakır. Güneş ışınlarının DNA ve proteinler tarafından emilmesi

moleküler ve hücresele yıkıma yol açar (Karaduman, 1999). UV'nin bir diğere etkisi de hücrelerin anormal çoğalmasdır (Tuğlacı, 1973). Ultraviyole ışınlarının uyardığı inflamasyon uyarılma eşiğı arttığında derinin stratum korneum, epidermis, dermis tabakalarında kalınlaşmaya neden olur. Hiperplazi, akut UV ile karşılaşmayı izleyerek hem DNA, RNA ve protein sentezinin artması hem de epidermal, daha az olarak da hücre çoğalması aktivitesinin artması sonucudur (Karaduman, 1999).

UV ışınları epidermal Langerhans hücrelerinin sayıları ve görevlerini etkileyerek onların antikor üretme yeteneklerini azaltır. Bu bozukluk T hücrelerinin gelişimini uyararak geç tipte aşırı duyarlılığın baskılanmasına yol açar, tümör gelişmesini engelleyemez. UV ışınları keratinosit hücrelerinin (Langerhans hücre (LH) işlevlerinin düzenlenmesini sağlar) işlevlerini de bozarak bunların LH hücreleri üzerindeki düzenleyici özelliğini olumsuz etkilerler. Bağışıklığın baskılanmasında UV absorbe eden, ürokonik asid önemli rol oynar (Berkow, 1997).

UV'nin Geç ( Kronik ) Etkileri: Deri yaşlanması iç ya da çevresel etmenlere bağlı olarak ortaya çıkar. Çevresel etkilerden en büyük paya sahip olanı doğal ya da yapay ultraviyole ışınlardır. Bu ışınlara uzun süreli ya da tekrar tekrar maruz kalmak, derinin yapısını giderek bozarak fotoyaşlanmaya neden olur, ayrıca derinin kalınlaşmasına neden olmaktadır (Wintrobe, 1976). Vücudun güneş ile temas eden bölümlerinde yaş ilerledikçe ortaya çıkan bozukluklardan ultraviyole ışınları sorumludur. Epidermal değişikliklerden UVB, dermisdeki (derinin orta katmanı) değişikliklere hem UVB, hem de UVA neden olur. Fotonların hücresele DNA' ya doğrudan etkisi, UVA ve UVB ışınlarının ortaya çıkardığı serbest radikaller, reaktif oksijen ürünlerinin dolaylı etkisi olduğu düşünülmektedir. Bütün bu değişiklikler fotoyaşlanma ile sonuçlanır (Karaduman, 1999). Fotoyaşlanma sonucunda deride deformasyon, nemsizlik, sarkma, kabalaşma, kılcal damar toplanması, zamansız pigmentasyon, deride sarımsı renk, tümörler görülür (Berkow, 1976).

UV'nin kronik etkilerinden birisi de cilt kanserinin ana sebeplerindendir. Çok fazla güneş ışığı altında kalmak kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Güneş yanığı bir sağlık belirtisi olmadığı gibi 18 yaşından önceki birkaç ciddi güneş yanığı

daha sonraki yaşam sürecinde cilt kanserinin gelişme şansını önemli ölçüde arttırır. Güneş ışınlarının çok yoğun bulunduğu bölgelerde yaşayan kimselerde bazal ve skuamoel kanser vakaları büyük artış göstermektedir (Wintrobe, 1976). Doğal ya da yapay ultraviyole ışınları ile uzun süreli temas sonucu insanlarda ve deney hayvanlarında deri kanseri oluştuğu deneylerle kanıtlanmıştır. 280-320nm UVB ışınları kanser oluşturur. Uzun dalga boylu UVA (320-400nm) ışınları UVB ışınlarıyla birleştiğinde kanser riski artar. UV radyasyonu ışınımıyla uzun süre temasta kalmanın DNA yapısında değişikliğe yol açtığı gözlenmiştir. UVB ve UVC'nin DNA yapısında mutasyon, hücre yıkımı ve transformasyona neden olmaktadır. Ayrıca UV tümör dengeleyici gen (p53 geni) mutasyonu da olmaktadır (Setlow ve ark., 1993). Diğer taraftan UV ışınları, bağışıklık sistemini Langerhans hücre işlevlerini bozarak baskılar. Bütün bu etkiler hücre çoğalmasını bozarak tümör gelişimine neden olur (Madronich ve Gruijl, 1993). Ayrıca artan UV-B insanların bağışıklık sistemini zayıflatır ve bu da vücutlarımızı enfeksiyon hastalıklarına karşı çok daha hassas hale getirmektedir.

Ultraviyole ışınları etkisi ile bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli karsinom gibi melanom olmayan deri kanserleri en çok yüzde gelişir. Melanom olmayan deri kanserlerinin gelişiminde alınan toplam doz önemlidir. Melanom gelişiminde ise uzun süreli temastan çok, yinelenen ve deride yanık oluşturacak şiddette UV ışınlarına maruz kalma önemlidir (Skolnick, 1991).

Bazal ve skuamoz hücreli karsinomların, yani melanom olmayan deri kanserlerinin teşhisi zordur. Bu tip kanserlere yakalanma riski ırka bağlıdır, ayrıca sarışınlarda çok fazladır. Yüz, el, boyun gibi güneş ışığına fazla maruz kalan yerlerde daha çok görülür. Melanom olmayan kanserler, melanom olana göre daha çok yaygındır ama ölüme yol açmaz, ayrıca tedavisi daha kolaydır. 1970'den itibaren Amerika'da yapılan araştırmalara göre, %4'lük bir kanser artışı gözlenmiştir. Sarışınlarda fazla ben olması bu tip kanserin riskini arttırır. Sarı veya kıvıllı saçlı, mavi gözlü insanlarda görülme olasılığı daha fazladır (The Global UV Project, 2002).

### 2.1.2.2. UV'nin göz üzerine etkileri

Güneşin yakıcı ışınları gözlere de zarar verebilir. Deliller uzun süreli güneş ışınlarına maruz kalmanın görmeyi azaltan ve sürekli körlüğün başlıca nedeni olan, gözbebeklerini örten kataraktı başlattığını göstermektedir. Ozon tabakasındaki %10'luk sürekli azalma sonucunda küresel olarak her yıl yaklaşık iki milyon yeni katarakt vakasının ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir. Acı veren, fakat genellikle geçici görüş kaybı olan kar körlüğüne de UV ışınları neden olmaktadır (Zigman, 1998).

Zigman, afak hayvan gözlerini UV-A' ya maruz bıraktığında triptofan fotoürün seviyelerinin arttığını, triptofan flöresansının azaldığını ve böylece vitreus hümörün doğrudan etkilendiğini buldu.

Veno ve Chakrabarti, insan vitreusunu UV'ye maruz bırakarak kinurenin flöresansında artış ve triptofan flöresansında azalma tespit etmiş ve böylece UV-B'ye maruz kalma sonucu vitreus jelinin likefaksiyonun arttığını bildirmişlerdir (Zigman, 1993).

### 2.1.2.3. UV'nin bağışıklık üzerine etkileri

Günümüzde yapılan araştırmalara göre, artan ultraviyole radyasyonuna maruz kalan vücudun bağışıklık sisteminin, hastalıklara karşı direnci zayıflamaktadır. Aşırı ultraviyole ışınlarına maruz kalan ekvator bölgelerindeki insanlarda herpes, simplere ve leishmaiasis gibi hastalıklarda artma gözlenmektedir (Onat ve ark., 2004).

### 2.1.3. UV'nin yararlı etkileri nelerdir?

UV radyasyonunun insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi vitamin D3 sentezidir. UVB ışınları, orta miktarlarda epidermal dehidrokolesterolü, provitamin D3'e dönüştürmektedir. Provitamin D3 günler içinde çoğalarak plazma D vitamini bağlayıcı protein ile dolaşıma katılmaktadır (Karaduman, 1999).



## 2.2. Serbest Radikaller

### 2.2.1. Serbest radikal nedir?

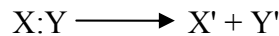
Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (Abdollahi ve ark., 2003; Abdollahi ve ark., 2004). Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (Akkuş, 1995).

### 2.2.2. Serbest radikaller nasıl oluşur?

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Cross, 1987). Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir. Yani içinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır, hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir ((Hurst ve ark., 1997; Jornot ve ark., 1998; Mills ve ark., 1998).

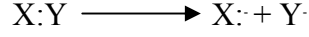
Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler:

**1. Homolitik bölünme:** Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronların birisinin kalması şeklindeki bölünme.

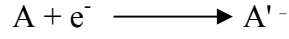


**2. Heterolitik Bölünme:** Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesidir. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan

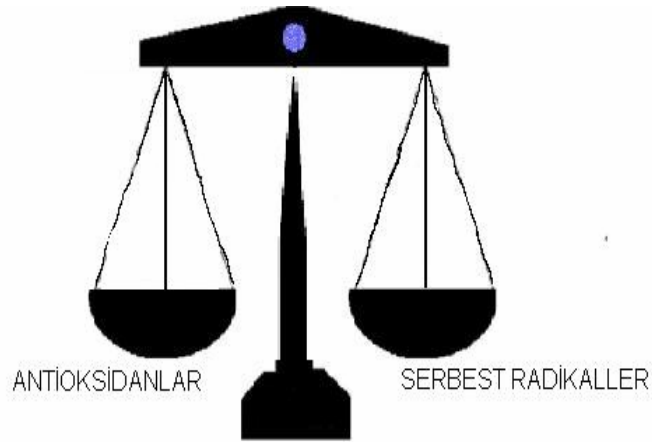
her iki elektronlar atomlardan birisinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



### 3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi:



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  metallerinde ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Halliwell, 1991; Akkuş, 1995).



Şekil 2.1. Antioksidan-serbest radikal dengesi

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir. Endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirme süreci içerisindedir. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halindedir (Şekil 2.1.) (Halliwell, 1996; Akkuş, 1995).

Serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmasındaki önemli moleküllerdir. Ancak, serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Tamer ve ark., 2000). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar (Bruckdorfer, 1987; Salım, 1993).

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Bunların yaklaşık  $10^{-5}$  saniye gibi ömürleri vardır ve son derece reaktiftirler. Yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Çünkü eşleşmemiş elektronların, bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşme ya da bir elektron transferi reaksiyonu ile eşleşerek kararlı hale gelme eğilimleri vardır. Bu sebeple serbest radikaller, elektron alıcı (oksitleyici) ya da elektron verici (redükleyici) özelliklere sahiptirler (Halliwell, 1989).

Serbest radikal moleküller; organizmadaki birçok olağan hücre sel tepkimenin (enerji üretimi, lipitlerin ve proteinlerin paçalanması ile inflamatuvar süreçler bunlar arasında yer alır) yan ürünü şeklinde sürekli oluşmaktadır. Hücrelerin çoğunluğu, olağan koşullar altında kendilerini serbest radikallerin hasar verici etkilerine karşı koruyacak hücre içi ve hücre dışı kimyasal mekanizmalarla donatılmışlardır. Radikal moleküller, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlıdır. Örneğin; fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal üretimidir. Serbest radikaller apoptozisin tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak görev yaparlar. Bu şekilde; aşırı hücre poliferasyonunu önleyerek homeostaziste yer alırlar. Antioksidan savunmanın çökmesi de apoptozisi tetiklemektedir. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Hücreler arası

haberleşmede görev alırlar. Hücrenin büyümesini sağlayan olayları düzenlerler. Sitolozde ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artar. Radyasyon, oksijen toksisitesi, postiskemik reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, enflamasyonlar yanı sıra yaşlanma ile ilgili hastalıklardan katarakt, ateroskleroz, karsinogenez, diyabet ve nörolojik hastalıklar serbest oksijen radikalleri üretimini arttırır (Halliwell, 1989; Halliwell, 1991; Erden, 1992; Uysal, 1998).

Serbest oksijen radikalleri, hücrenin önemli komponentleri olan lipit, karbohidrat, protein ve DNA'yı oksitleyerek biyolojik sistemlerde ağır hücre zedelenmelerine neden olurlar (Halliwell, 1989; Halliwell ve Aruoma, 1991; Halliwell, 1991;).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır.

1. Oksijenin kendisi ( $O_2$ )
2. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ )
3. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
4. Geçiş metallerinin iyonları ( $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$  vb. )
5. Hidroksil radikali (OH)

### 2.2.3. Serbest radikallerin etkileri nelerdir?

Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom p450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Araştırmacılar, insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama

10.000 serbest radikalın hücumuna uğradığını belirtmektedirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleustaki genetik kodu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asite (DNA) etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler (Akkuş, 1995; Dünder ve Aslan, 2000).

### 2.2.3.1. Serbest radikallerin membran lipidlerine etkileri

Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (Halliwell, 1989). Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton kopararak "Lipid peroksidasyon" olarak bilinen reaksiyonun başlamasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin bir çok komponentiyle reaksiyona girerek hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (Köse ve Doğan, 1992).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (Köse ve Doğan, 1992). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Köse ve Doğan, 1992).

### 2.2.3.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan aminoasitler (örneğin enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalanlardır. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır. Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (İşlekel ve ark., 2000).

### 2.2.3.3. Serbest radikallerin karbohidratlara etkileri

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzalaldehitler meydana gelir. Okzalaldehitler, DNA, RNA, ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (Akkuş, 1995). Karbohidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (Winrow, ve ark., 1993; Aybey, ve ark., 1996). Bir mukopolisakkarit olan hyalüronoik asit gözün vitreusunda bol miktarda bulunur. Hyalüronoik asidin oksidasyonu katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Akkuş, 1995).

### 2.2.3.4. Serbest radikallerin nükleik asitlere etkileri

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makro molekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA)

temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girerek değişikliklere yol açar (Akkuş, 1995). Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Özekin ve Değer, 2001).

### 2.3. Antioksidanlar

#### 2.3.1. Antioksidan nedir?

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ veya kısaca ‘antioksidanlar’ olarak bilinen; serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfıdır (Ames ve ark., 1993; Müftüoğlu, 2003). Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Akkuş, 1995):

##### a) Endojen (Doğal) Antioksidanlar:

-Enzimler: Katalaz, Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz

-Enzim olmayanlar:  $\beta$ -karoten, E vitamini, Askorbik asit, sistein, albumin, bilirubin, hemoglobin v.s.

b)Eksojen antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).

#### 2.3.2. Antioksidanlar nasıl etki ederler?

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

-**Toplayıcı (scavenging) etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.

Antioksidan enzimler, trakeo-bronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler.

**-Bastırıcı (quencher) etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Akkuş, 1995).

**-Onarıcı (repair) etki:** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (Benzer ve Ozan, 2003).

**-Zincir kırıcı (chain breaking) etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler ( Akkuş, 1995).

### 2.3.3. Antioksidan Vitaminler

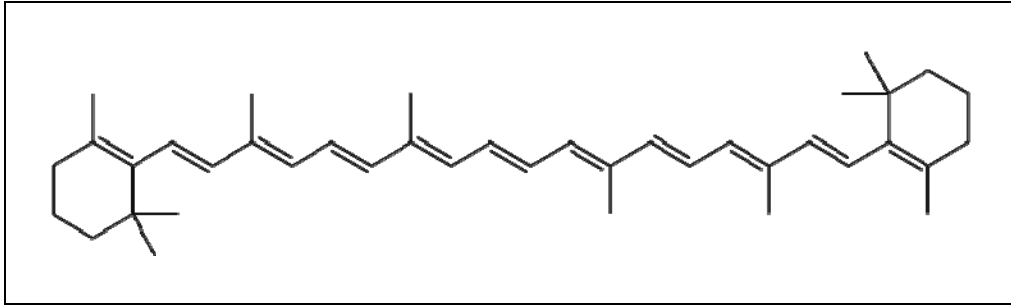
Canlı organizmalarda enzimatik antioksidanların yanı sıra vitaminler de serbest radikallerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında önemlidir. Vitaminler non-enzimatik antioksidanlar kısmında yer alır (Carr ve Frei, 1999; Kojo, 2004). Beta-karoten, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi antioksidantların serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önlediğini *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (genetikbilimi, 2007). Derideki majör antioksidan L-Askorbik asittir (Shindo ve ark., 1994). 1999 yılında yapılan bir çalışmada aktinik keratoz ve bazal hücreli karsinomu olan hastalarda askorbik asit, alfa tokoferol ve glutatyonun plazma seviyelerinin oldukça azalmış olduğu saptanmıştır (Vural ve ark., 1999).

#### 2.3.3.1. Vitamin A

Vitamin A, karotenoid türevidir. En önemli vitamin A öncüsü karotenoid beta-karotendir. Beta-karoten son derece güçlü bir tekli O<sub>2</sub> temizleyicidir. Ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle reaksiyon vererek, flavinler ve



porfirinler gibi üçlü uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama gibi mekanizmalarla oksidatif hasara karşı koruyucu işlev yapar. Lipitte çözünür özellikte olup zincir kırıcı bir antioksidan olarak etki gösterir (Halliwell, 1984). Karotenoidlerin diğer antioksidanlarla da etkileşimi vardır. Örneğin, karotenoidler Vitamin E radikalini (tokoferoksil) ortadan kaldırırken vitamin C de karotenoid radikalini uzaklaştırır (Arai ve ark., 1995; Repetto ve ark., 1999).  $\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direk olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tespit edilmiştir (Akkuş, 1995). Yapılan birçok çalışmada UV teması sonrasında plazma ve deride karotenoid düzeylerinin azaldığı gösterilmiş ve beta karoten desteğinin faydalı olacağı görüşü doğmuştur. E vitamini ve karotenoidin kombine edilerek verilmesi de UV ile indüklenen eritem gelişimini belirgin olarak azaltmaktadır (Ribaya-Mercado ve ark., 1995; Stahl ve ark., 2000).

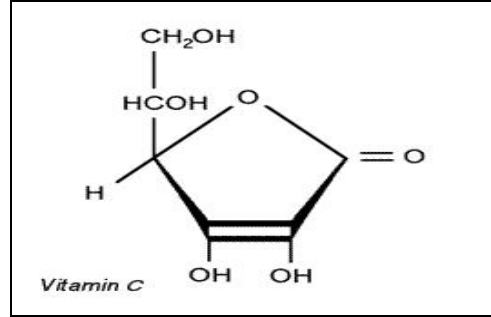


Şekil: 2.2. Vitamin A (Wikipedia, 2009).

### 2.3.3.2. Vitamin C

Suda çözünen bir vitamin olan C-vitamini vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve süperoksit, hidrogen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir. C-vitamini lipid peroksidasyonunu başlatmadan peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur (Frel,1994). Vitamin C (L-askorbik asit) akciğerler ve göz lensi gibi su içeriği yüksek organ ve dokularda bulunan önemli ve güçlü bir antioksidan sistemi oluşturur. Başlıca antioksidan ortakları arasında vitamin E ve karotenoidler bulunur (Carr ve Frei, 1999; Kojo, 2004). Askorbik asit, antioksidan

özelliklerinin yanı sıra, kollajen sentezi için de önemli bir vitamindir (Szent-Gyorgyi, 1928; Murad ve ark., 1981; Shindo ve ark., 1994; Phillips ve ark., 1994; Colven ve ark., 1996; Vural ve ark., 1999; Schneider ve ark., 2006). Deneysel çalışmalar göstermiştir ki C ve E vitaminleri antioksidan koruma sırasında etkileşim göstermekte ve lipid membranda C vitamini, E vitaminini oksidasyondan korumaktadır (Leung ve ark., 1981). Yüksek dozlarda E ve C vitamini kombinasyonu oral olarak verildiğinde UV ile tetiklenen eritem eşiği yükselerek güneş yanığı önlenmektedir. Ancak her iki vitaminin tek başına böyle bir etkisi yoktur (Fuchs ve Kern, 1998).



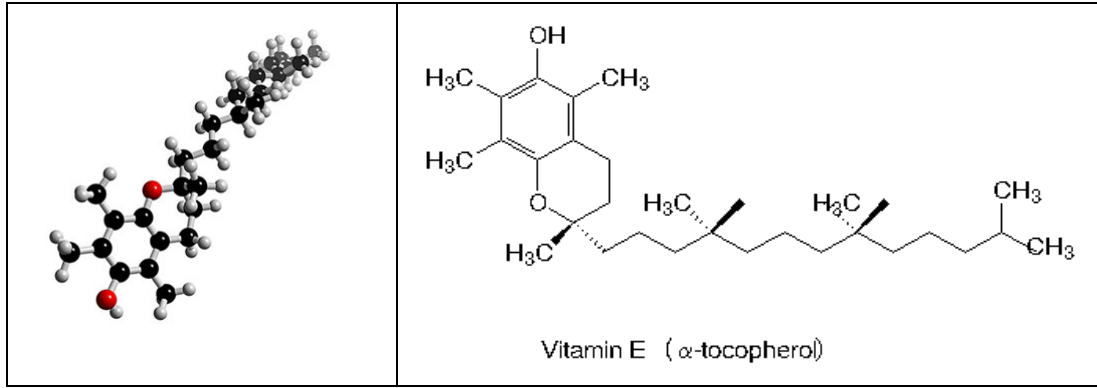
Şekil.2.3.Vitamin C (Orthomoleculer, 2009)

### 2.3.3.3. Vitamin E

E vitamini tokoferol yapısında olup  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  olmak üzere 4 farklı tipin karışımı şeklinde bulunabilir ve yağda çözünür. Vitamin E'nin en aktif formu olan  $\alpha$ -tokoferol çok kuvvetli bir antioksidandır ve hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden korur. Vitamin E  $O_2^-$ ,  $HO^-$ , singlet  $\cdot O_2$ , lipid peroksil (LOO) radikallerini ve diğer radikallere bir elektron vererek zararsız formların dönüşümünü sağlar. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir (Burton ve Ingold, 1989; Pryor, 2000). Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Burton ve Ingold, 1989). Vitamin E ısıya, alkalilere, asitlere ve ışığa dayanıklıdır, fakat ultraviyole ışınlar karşısında kolayca bozulur (Aras ve ark., 1976). Oksitlenince biyolojik etkisini kaybeder, oksijensiz ısıya  $200^\circ C$ 'ye kadar dayanır (Ersoy ve ark., 1979).

Oral yolla alınan tokoferol genellikle iyi absorbe edilir (Korner ve Voom, 1978). Alın ve yanak gibi UV'ye maruz kalan bölgelerde, güneş görmeyen bölgelere göre 20 kat daha fazla miktarda bulunur (Thiele ve ark., 1998). Fare derisinde UV ile indüklenen lipid peroksidasyon, sıçan derisinde UV ile indüklenen fotokarsinogenez ve immünsupresyon üzerine etkileri bu çalışmalardan bazılarıdır (Lopez-Torres ve ark., 1998; Trevithick ve ark., 1992).

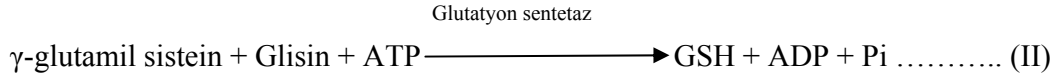
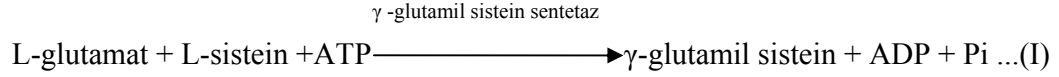
Fotokoruyucu etkilerine ek olarak  $\alpha$ - tokoferol melanogenez ve eritem gelişimini de azaltır (Ichihashi ve ark., 1999). UV maruziyeti ile tokoferoksil radikalleri oluşur ki bu ürün diğer antioksidanları tüketmektedir (Kagan ve ark., 1992). Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla tokoferol esterleri (asetat, süksinat vb) kullanılmaktadır (Kagan ve ark., 1992; Jurkiewicz ve ark., 1995).



Şekil:2.4.  $\alpha$ -tokoferolün yapısı (Hammaddeler, 2009; Stampfer ve Rimm, 1995).

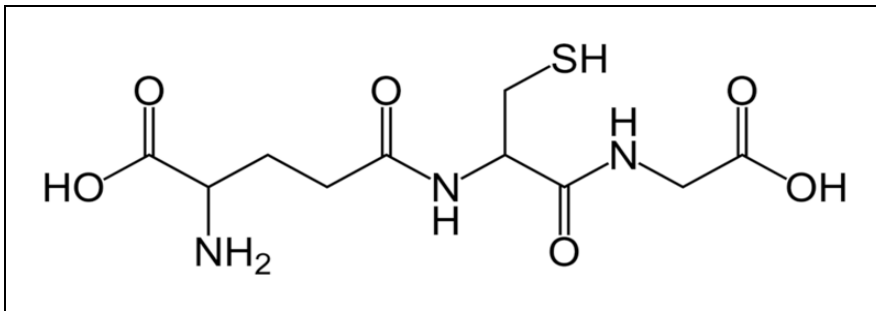
#### 2.3.3.4. Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Vücuttaki GSH'nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Champe, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).



Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).

En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da  $\text{O}_2$ 'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin elimine edilmesinde de GSH'ın oksitlenebilirliğinden faydalanılır (Calberg ve Mannervik, 1985; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999).



Şekil:2.5. Glutasyon'un Molekül Yapısı ([hawaii.mana.com/products/glutathione.shtml](http://hawaii.mana.com/products/glutathione.shtml))  
Erişim tarihi 19/03/10)

### 2.3.3.5. Lipid Peroksidasyonu

Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden birçok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan .OH radikalının membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Thomas ve Aust, 1986; Davies ve Goldberg, 1987; Akkuş, 1995).

Lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran yada polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan ( $\text{CH}_2$ ) bir hidrojen (H) atomunun çıkartılması ile başlar. Böylece tek elektron içeren H.'nin uzaklaştırılması sonucu karbon merkezli  $\cdot\text{CH}$ - lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H. parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur (Gutteridge, 1995; Georgieva, 2005).

Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir.

MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin

hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler (Comporti, 1985; Marnett, 1999; Halliwell ve Chirico, 1993; Goulart ve ark., 2005).

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder (Gutteridge 1995).

LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir.

Bunlar kısaca (Long ve Bislskl, 1980).

- 1- Membran üzerindeki yağ asiti miktarında azalma meydana gelir
- 2- Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri enzimleri inhibe eder.
- 3- Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipid ilişkisini bozar
- 4- Membranın yapı taşlarından olan lipidlerin akışkanlığını bozar
- 5- Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.

### 2.3.3.6. Protein karbonillenmesi

Reaktif oksijen türevleri (ROS), direkt olarak proteinler üzerine etki ederek oksidize aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin etkisi ile de ileri glikasyon son ürünlerine ve ileri lipoksidasyon son ürünlere dönüşürler (Miyata ve ark., 1999). ROS, tirozin aminoasidini direkt olarak okside ederek ditirozin yapısını oluşturarak protein yapısında agregasyona ve fragmentasyona yol açarlar. Bu karşılıklı bağlar ile oluşan ürüne “ileri oksidasyon protein ürünleri” adı

verilir. Karbonhidratların ve askorbatın otooksidasyonu sonucu glioksal, arabinoz, glikolaldehid, 3-deoksiglukozon ve dehidroaskorbat gibi karbonil grubu içeren ara bileşikler meydana gelir (Inagi ve Miyara, 1999). Reaktif karbonil bileşikleri non enzimatik olarak proteinlerin amino gruplarına bağlanarak schiff-base ürünleri oluşturur. Bu reversibl form daha sonra daha stabil olan ve Amadori ürünleri adı verilen forma dönüşür.

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (Shacter, 2000). Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitesindeki artış olarak sıralanabilir (Davies ve ark., 1999; Shacter, 2000). Protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin  $\alpha$ -karbon atomlarından OH (hidroksil) radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır (Swallow, 1960; Garrison ve ark., 1962; Schuessler ve Schilling, 1984). Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi mark'erlerinin *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır (Stadtman, 1988; Stadtman ve Levine, 2003,).

#### 2.4. Apoptozis

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Mak, 1993).

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

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

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

Apoptoz, eski Yunanca “apo” (ayrı) ve “ptosis” (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack’ın önerisiyle “apoptoz” olarak adlandırılmıştır (Cummings ve ark., 1997).

Her hücre, doğar, büyür, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan, 2003; Hıkım ve ark., 1995). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (Mcphie ve ark.,



2003). Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezisde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, 1994).

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

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

Bu mekanizma stres etkenlerine bağlı olarak gelişen hücre ölümlerinin engellenmesinde önemli görünmektedir. Bu etkenler ultraviyole (UV) irradyasyonu gibi dış kaynaklı etkenler olabileceği gibi metabolik bozukluklara bağlı olarak biriken metabolitler de olabilir.

UV irradyasyonu, oksijen radikallerinin üretimini artırarak hücre membranının hasarlanmasına ve DNA kırıklarının oluşmasına neden olarak hücrenin ölümüne ya da kanser hücresine dönüşmesine zemin hazırlayabilmektedir (Kulms ve Schwarz, 2002). UV uygulanması sonucunda stres enzimleri arasında yer alan c-Jun N-terminal kinazlar (JNK'ler) aktive olmaktadır (Adler ve ark., 1995). JNK'lerin, apoptoz metabolizmasında son derece önemli rol oynadığı bilinen kaspazların,

özellikle kaspaz-3'ün aktive olmasını sağlayarak apoptozun gelişiminde rol oynadığına dair raporlar yayımlanmıştır (Berglund ve ark., 2004).

#### 2.4.1. Apoptotik hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler

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

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

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

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

#### 2.4.2. Deri ve Apoptozis

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.5. *Hibiscus sabdariffa*

Serbest radikaller bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler. Antioksidan özellikteki maddeler peroksit, hidroperoksit veya lipid peroksit gibi serbest radikalleri süpürerek hasara neden olan oksidatif mekanizmayı inhibe ederler. Bu nedenle antioksidan maddeler hastalıklardan korunmada önemli rol üstlenirler. Yapılan araştırmalar antioksidan kullanımının kronik hastalıklara yakalanma olasılığını azalttığını göstermiştir.

Antioksidan özelliğe sahip bitkilerin kullanımı ve antioksidan madde içeriği açısından zengin bir beslenme alışkanlığı hastalıklara karşı koruyucu etki sağlamaktadır. Antioksidan özellikteki bitkileri ya da besinleri düzenli olarak tüketen kişilerin kansere ve diğer kronik hastalıklara yakalanma riski azalmaktadır. Güçlü antioksidan özellik gösteren bitkiler içerisinde yüksek oranda polifenolik bileşikler taşırlar (Bitkigen, 2008).

Bitkisel ürünlere dayalı beslenmenin kronik hastalık, özellikle kanser riskini azaltabildiğine dair çok sayıda *in vivo*, *in vitro* ve klinik deneme verileri vardır. Sağlık otoriteleri tahıl, taze sebze ve meyveler bakımından zengin, hayvansal et ve yağ oranının azaltıldığı diyetleri önermektedir.

Malvaceae familyasına ait olan *Hibiscus sabdariff* günlük şurup ve çoğunlukla meşrubat yapımında kullanılırdı. Kaliksleri meşrubat yapımında ve halk ilaçlarında kullanılmış ve idrar sökücü, mide ağrısı giderici, cinsel güç artırıcı, antiseptik, kanamayı durdurucu, kolagog (safra söktürücü), sindirimi kolaylaştırıcı, sedatif, laksetif, antimikrobiyal, olarak çok iyi olduğu idda edilmektedir veya humma yaralarını, kalp rahatsızlıklarını, ve hipertansiyonu iyileştirdiği iddia edilmektedir (Perry, 1980).

*H. sabdariffa* kaliks ekstarktını farmoklojik etkileri araştırılmıştır. HSE kolestrol ile beslenmiş tavşan ve ratlarda serum lipitlerini inhibe ettiği ve antiatherosclerotic aktivite gösterdiği bildirilmiştir (El- Saadany ve ark., 1991; Chen ve ark., 2003). Buna ek olarak HSE lipid peroksidasyonuna karşı insan eritrositlerini korumaktadır (Suboh ve ark., 2004).

Kendiliğinden (spontane) oluşmuş yüksek tansiyonu olan ratlarda kan basıncını düşürmektedir (Onyenekwe ve ark., 1999; Odigie ve ark., 2003).

Bunun yanı sıra serbest radikal süpürücüdür, ratlarda tert-butyl hydroperoxide ile indüklenmiş birincil hepatocytelerde antisitotoksik ve F344 ratlarında metilazoksümetanol asetat ve heterocyclic amine karşı antimitojenik etki göstermiştir (Duh and Yen, 1997; Tseng ve ark., 1997; Chewonarin ve ark., 1999). Ayrıca fare dersinde tümör artışını ve insan lösemi hücrelerinde apoptozisi başlatıcı oluşumları inhibe etmektedir (Tseng ve ark., 1998; Tseng ve ark., 2000).

Hibiscus kaliksleri Rosella ve karkede olarakta bilinir. Hibiscus içeriğinde bulunan vitamin E ve vitamin C, polifenoloik asitler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi antioksidanların geleneksel tıpta hipertansiyon, iltihap kurutucu ve kanseri önlediği gözlenmiştir (Wang ve ark., 2000).

*H. sabdariffa* kalikslerinde izole edilen aktif bazı bileşiklerin ve onların farmokolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. Protocatechuic acid; Ratlarda tert-butyl hydroperoxide ve lipopolisakkaritlerin indüklediği karaciğer hasarına karşı koruyan fenolik bileşiktir. (Tseng ve ark., 1996; Tseng ve ark., 1997; Liu ve ark., 2002; Lin ve ark., 2003). Fenolik bileşiklerin önemli bir grubunda antosiyaninler oluşur.

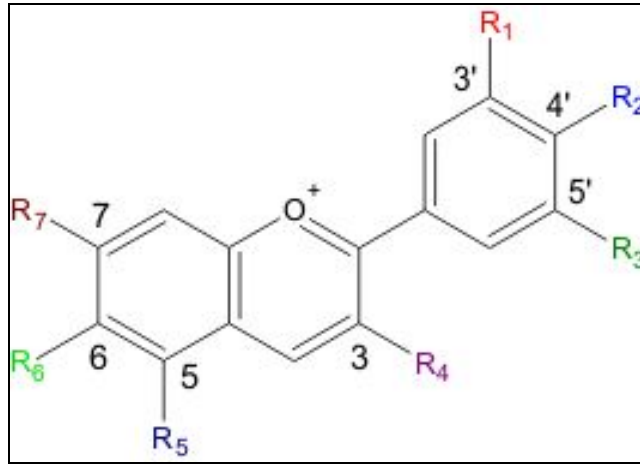
Rosellada bulunan kırmızı renkli ve antioksidan kapasitesi yüksek olan Antosiyanin; ratlarda tert-butyl hydroperoxide ve parasetamol ile indüklenmiş karaciğer lezyonlarında azaltıcı etki göstermiştir (Wang ve ark., 2000; Tsai ve ark., 2002; Ali ve ark., 2003).

## 2.6. Antosiyanin

Antosiyaninler; meyve, sebze ve çiçeklerin kendilerine özgü, pembe, kırmızı, viole, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renklerini veren, suda çözünebilir nitelikli doğal renk maddeleridir.

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleridir ve flavonoid grubuna dahildirler. Doğada antosiyaninler serbest halde bulunmazlar ve daima bir veya birkaç şeker molekülü ile esterleşmiş halde yani antosiyaninler halinde bulunurlar.

Antosiyaninlerin yapısının temelini, 2-fenilbenzopirilium (flavilyum katyonu) oluşturmaktadır (Francis, 1999; Wrolstad, 2000; Cemeroğlu ve ark., 2001; Demirağ ve Uysal, 2001).



Şekil 2.6. Flavilyum iyonu, antosiyaninlerin temel yapıtaşı

R1 ve R2 gruplarına farklı grupların bağlanmasıyla farklı antosiyanidinler oluşur. Başlıca antosiyanidinler; pelargonidin, siyanidin, delphinidin, peonidin ve malvidindir. Bunlar arasında en yaygın bulunanı siyanidindir (Wrolstad, 2000; Cemeroğlu ve ark., 2001; Saldamlı ve Sağlam, 1998).

Antosiyaninler doğada yaygın olarak bulunan renk maddeleridir. Renk özelliklerinin yanısıra sağlık açısından yararlı olmaları nedeniyle antosiyaninlere

olan ilgi son zamanlarda artmıştır. Antosiyaninler bazı renkli gıdaların antioksidan özelliklerine önemli katkıda bulunmaktadır (Espin ve ark., 2000; Demirağ ve Uysal, 2001; Giusti ve Wrolstad, 2003; Einbond ve ark., 2003).

Antosiyaninler doğal pigmentler arasında en iyi bilinenlerdendir. Ağırlıklı olarak bitki ve onların ürünlerinde bulunurlar. Antosiyaninler, daha çok, çiçeklerde, meyvelerde, bitkilerin yapraklarındaki hücrelerde glikozitler halinde bulunurlar (Hendry ve Houghton, 1996).

Suda çözünen antosiyanin, hücrelerin vaküollerinde yer alır. Vaküol suyunun asit ya da baz olmasına göre kırmızıdan maviye dönerler. Derişik mineral asitle kaynatılarak antosiyanidin ve karbonhidrata hidrolizlenirler. Antosiyaninlere, bitkilerde antosiyanidinlerin heterozitleri biçiminde rastlanır. Antosiyanidinler, antosiyanin aglükonlarının genel adıdır (Keskin, 1981).

Fenil alaninden türevlenen fenolik bileşiklerden olan flavonoitler, bitkilerin meyve, tohum, çiçek, yaprak, gövdelerinde bulunan renkli maddelerdir. Bitkilerin yaşamlarında birçok mekanizmada iş gören flavonoitler aynı zamanda birçok ülkenin geleneksel halk tıbbında kullandığı preparatların içerisinde bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

Bu pigmentler; antioksidan, yağların etkisini önleyici, iltihap kurutucu, kasılma önleyici, serumda kolesterolü düşürücü ve bazı kanser tiplerinde tedavi edici olarak kullanılırlar (Hendry ve Houghton, 1996).

Antosiyaninlerin bu özelliklerinden başka, antikarsinojenik aktivite gösterdikleri, hücre büyümesini engelleyici etki gösterdikleri ve değişik meyve ile sebzelerden elde edilen antosiyaninler üzerinde yapılan çalışmalar, iyi bir gıda boyası olmalarının yanında güçlü bir antioksidan olarak da kullanılabileceğini göstermiştir (Tamura ve Yamagami, 1994).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

##### 3.1.1. Deney hayvanlarının temini

Çalışmalar, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları ünitesinde yetiştirilip üretilen *Sprague Dawley* tipi laboratuvar sıçanları ile yapıldı. Çalışmada ortalama ağırlıkları  $296 \pm 5$  gram olan 34 adet erkek sıçanlar kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi, suları Afrika bamyası (Kerkede) (*Hibiscus sabdariffa*) ekstraktının farklı dozları ilave edilerek verildi. Sıçanlar ultraviyoleye maruz bırakılmadan önce, 20 gün boyunca yeni ortama adapte olmaları sağlandı.

##### 3.1.2. Deney hayvanlarının gruplara ayrılması

Çalışmada ortalama ağırlıkları sırasıyla; kontrol grubu  $296 \pm 5$  g, UV grubu  $296 \pm 5$  g, UV+2,5 mg/kg/gün antosiyanin grubu  $296 \pm 5$  g, UV+5 mg/kg/gün antosiyanin grubu  $296 \pm 5$  g ve UV+10 mg/kg/gün antosiyanin grubu  $296 \pm 5$  g olmak üzere erkek sıçanlar kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi, su ise adaptasyon süreci boyunca ve bölümde yapılan daha önceki çalışmalarda deney hayvanlarının ( $n=6+1$ ) günlük su tüketimleri temel alınarak günlük 350 ml su serbest olarak verildi. Kontrol ve UV grubuna sadece su verilirken diğer üç gruba 350 ml su+ sırasıyla 2.5 mg, 5 mg, 10 mg antosiyanin içeren *Hibiscus sabdariffa* ekstraktı eklenerek verildi. Sıçanlar çalışma öncesi, 20 gün yeni kafeslerindeki ortama adapte olmaları sağlandı. Havalandırma tertibatı bulunan, sıcaklığı  $22^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmaya çalışılan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanacak şekilde deney ortamı oluşturuldu. Kontrol grubu 6 diğer guruplar ise 7 sıçan olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla; 1. grup: Kontrol, 2. grup: 40 gün boyunca günde 4 saat UV-C ışığı uygulanan Hasta (UV) grubu; 3. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 2.5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup; 4. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup; 5. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı



uygulanan ve içme sularına 10 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup olmak üzere düzenlendi.

### 3.1.3. Deney hayvanlarının tıraşlanması

Deney hayvanları hafif anestezi altında sinbo marka traş makinası ile sırt bölgelerinde yaklaşık 15cm<sup>2</sup>'lik bölge traş edildi. Tıraşlama işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce ve çalışmanın 20. gününde olmak üzere çalışma boyunca iki kez traş edildi. Uygulama gruplarının yanında kontrol grubu da olası standart sapmayı bertaraf etmek için aynı muameleye maruz bırakılmıştır.

### 3.1.4. Deney hayvanlarının beslenmesi

Deney hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yem Gaziantep İpek Yem Fabrikasından temin edildi. İpek Yem Fabrikasından temin edilen yemin bileşiminde bulunan yemin katkı maddeleri, Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yemin içeriği

Yem İçeriği	Yüzdesi
Kuru madde (% en az)	88
Ham protein (% en az)	24
Kalsiyum (% en az-en çok)	1,0-2,5
Fosfor (% en az)	0,90
Ham selüloz (% en çok)	7
Sodyum (% en az-en çok)	0,5-1,0
Ham kül (% en çok)	8
Lizin (% en az)	1,00
Metabolik enerji (kcal/kg, en az)	2650
Metionin (% en az)	0,60
HCl'de çözünmeyen kül (% en çok)	1
Sistin (% en az)	0,40

### 3.2. Ekstraktın Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Afrika bamyası (kerkede) (*Hibiscus sabdariffa*) bitkisinin çiçeklerinden kaliks (çanak) kısımları toz haline getirildi. Toz haline getirildikten sonra 200 g alınarak üzerine 750 ml distile su 500 ml etanol ve 500 ml metanol eklenerek 24 saat 40 °C'de tutulduktan sonra filtre kağıdı (Whatman No:1) yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen Süzüntü, önce iki saat derin dondurucuda bekletildi ve daha sonra Liyofilize cihazı (Tel Star Cryodos) yardımıyla, kullanılan metanol ve etanolün tamamı ve suyun bir kısmı uzaklaştırılarak bir miktar su içerisinde çözülmüş bitki ekstraktları elde edildi. Elde edilen ekstraktlardan, iki adet 25ml'lik beherde 1'er ml alındı. Birinci beherdeki ekstraktın pH'sı 1'e, ikinci beherdeki ekstraktın pH'sı ise 4.5'e ayarlandı. Daha sonra pH=1 ve pH=4,5 olan ekstraktlardan 1'er ml semimikro küvete alınarak spektrofotometrede 520'nm de ve 700'nm deki absorbansları okunarak litrede bulunan antosiyanin miktarı hesaplanmıştır. Çalışma süresince ekstraksiyon antosiyaninin dış faktörlerden etkilenme durumuna karşı taze olarak üç defa yapılmıştır. Her ekstrakt hazırlandıktan sonra tekrar pH'ları ayarlanıp absorbansları ölçülerek yukarıdaki işlemlere göre antosiyanin miktarı belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Hibiskus ekstraksiyon miktarı ve total antosiyanin içeriği

Hibiskus (gram)	nH <sub>2</sub> O (ml)	Metanol (ml)	Etanol (ml)	Toplam Ekstrakt	Antosiyanin mg/L
50	300	250	250	580	231
150	700	250	250	600	138
200	750	500	500	1200	1133

Afrika bamyası (kerkede) (*Hibiscus sabdariffa*) (Malvaceae) bitkisinin çiçekleri Şanlıurfa'daki aktarlardan alınarak, teşhisi Harran Üniversitesi FEF biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Esat ÇETİN tarafından yapıldıktan sonra bitkinin çiçeklerinin kaliks kısmı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu.

### 3.3. Antosiyanin miktarının hesaplanması

Afrika bamyası (kerkede) (*Hibiscus sabdariffa*) ekstraktı elde edildikten sonra antosiyaninin en iyi absorbans verdiği iki farklı dalga boyunda ölçülüp hesaplanmıştır. Ekstrakt'taki antosiyanin miktarı cyanidin-3-glucoside cinsinden aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (mg/L) (Wrolstad'a göre 1976.).

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}$ ;

$MW$  (moleküler ağırlık) = 449.2 g/mol cyanidin-3-glucosid için (cyd-3-glu);

$DF$  = Seyreltme Faktörü (1:60);

$l$  = mikro semiküvetin kalınlığı cm;

$\epsilon$  (= 26900 molar ekstinksiyon katsayısı, in L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> de , cyd-3-glu için;

$10^3$  = g dan mg'a dönüştürme faktörü.

### 3.4. Ultraviyole-C lambası

Sıçanlar, ebatları 80x80x100 cm olan teraryumun içerisine UV, bölmelere konularak yetiştirilmiştir (Şekil 3.1.). Teraryumun kapağına hayvanlardan 50 cm uzaklıkta 90 cm uzunluğunda gücü 30 Watt olan "Mazda TG" ultraviyole lambası yerleştirilmiş ve hayvanlar bu kaynaktan yayılan UV ile 40 gün süre ile ışınlanmıştır. Lambadan yayılan UV'nin şiddetinin pik değerinin 254 nm dalga boyunda olduğu spektrofotometre ile ölçülmüştür. UV lambasından yayılan ışığın, cm<sup>2</sup>'ye düşen enerjisinin bir saniye için değeri 0.0014 joule/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.



Şekil 3.1. Ebatları 80x80x100 cm UV-C kabini

### 3.5. Deneysel Uygulamalar

Sıçanlar, kontrol 6 diğer gruplar 7'şer adet olmak üzere 5 gruba ayrıldılar. Sıçanlara UV-C uygulamak için ebatları 80x80x100 cm olan kapalı kabin hazırlandı. Işın verildiği süre boyunca dışarıya herhangi bir zarar verilmemesi için siyah renkli ve kalın bir perde kullanıldı. Ratların deney süresince içinde kalacakları 43x31x18 cm ebatlarında kafesler hazırlandı. 34 rat hassas terazide tartılıp ağırlıklarına göre gruplara ayrıldı.

**1.Grup;** Kontrol grubu (n=6): 6 adet erkek sıçandan oluşan bu grup deney süresince diğer gruplarla aynı ortamda tutuldular. Gruplar arasında oluşabilecek ek faktörler ortadan kaldırmak amacıyla bu gruba eşit yem ve su verildi.

**2.Grup;** Hasta (UV) grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince sadece su ve yem verildi. 40 gün süresince her gün 4'er saat UV-C ışınına maruz bırakıldılar.

**3.Grup;** 2.5mg/kg/gün Antosiyanin grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince her gün 350 mililitre su verildi. İçme sularına 2.5 mg antosiyanin içeren Hibiskus (*hibiscus sabdariffa*) ekstraktı eklendi. Bu grup da 40 gün boyunca her gün 4'er saat UV-C ışınına maruz bırakıldı.

**4.Grup;** 5mg/kg/gün Antosiyanin grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince her gün 350 mililitre su verildi. İçme sularına 5 mg antosiyanin içeren Hibiskus (*hibiscus sabdariffa*) ekstraktı eklendi. Bu grup da 40 gün boyunca her gün 4'er saat UV-C ışınına maruz bırakıldı.

**5.Grup;** 10mg/kg/gün Antosiyanin grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince her gün 350 mililitre su verildi. İçme sularına 10 mg antosiyanin içeren Hibiskus (*hibiscus sabdariffa*) ekstraktı eklendi. Bu grup da 40 gün boyunca her gün 4'er saat UV-C ışınına maruz bırakıldı.

### 3.6. Solüsyonların Hazırlanışı

#### Vitamin A:

200 µL serum, 200 µl etanol (BHT=Butillenmiş Hidroksi Toluen) (0.002 mg BHT 100 ml etanolde çözüldü). 600 µl n-Hekzan karıştırılarak solüsyon ölçüm için hazırlandı.

#### Vitamin C:

a) % 6 Perklorik asit: 9.1 ml % 66 Perklorik asit alınarak 100 ml saf suyla tamamlandı.

b) Reaksiyon solüsyonu:

1- 50.75 ml % 98.51 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınarak 100 ml saf suyla tamamlandı.

2- DNPH çözeltisi: 2.2 g. DNPH' ye (2,4-Dinitrofenilhidrazin) 100 ml %50'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek DNPH çözeltisi hazırlandı.

3- CuSO<sub>4</sub>: 0.6 g. CuSO<sub>4</sub> e 100 ml distile su eklendi.

- 4- Tiyoüre: 5 g. Tiyoüre 100 ml distile su ile tamamlandı.
- 5- Tiyoüre (0.5 ml ) + CuSO<sub>4</sub> ( 0.5 ml ) + DNPH (10 ml ) alınarak reaksiyon solüsyonu hazırlandı.
- c) % 65 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 65.98 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ml saf su ile tamamlandı.

**Vitamin E:**

- a) Çalışma standardı: 1 mg E vitamininin üzerine 100 ml saf su ilave edildi.
- b) TPTZ: 120 mg TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) üzerine 100 ml n- propanol ilave edildi.
- c) FeCl<sub>3</sub>: 120 mg FeCl<sub>3</sub> üzerine 100 ml mutlak etanol ilave edildi.

**MDA:**

- a) Stok MDA: 2,47 µl MDA alınarak 997,53 µl bidistile saf suda seyreltildi.
- b) TBA Çözeltisi: 8 mg TBA 1 ml metanolde çözüldü.
- c) TCA ( % 20 ): 20 g TCA 100 ml distile suda eritildi.

**GSH:**

- a) Stok GSH (1 mM): 3.073 mg indirgenmiş GSH 10 ml saf suda çözüldü.
- b) GSH buffer: 13.8 gram (0.1 mol) sodyum fosfat, 1.461 g (0.005 mol) EDTA 1L saf suya tamamlanır pH 8.0.
- c) OPA (O-Phthaldialdehyde): 25 mg OPA (Sigma) 25 ml metanolde çözülür.

**APOPTOZİS:**

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

Mikroalga fırında kaynayıp biraz soğuduktan sonra jel tankına dökülüp hazırlandı.

### 3.7. Kan Serumlarının Ayrılması ve Analizlerin Yapılması

DeneySEL sürecin son gününde sıçanlar eter ile anestezi edilerek kalplerinden 5 ml enjektörle kan alındı. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konuldu. Kanlar 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serum kısmı ependorf tüplerine alınarak derin dondurucuya konuldu.

**Vitamin A analizi:** Hazırlanan solüsyondan 1 ml alındı. 10 dk vortekste karıştırıldı. 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Mikroplate (SpectraMax M5) cihazında 453 ve 325 nm de 2 kez okuma yapıldı.

**Vitamin C analizi:** Boş bir ependorf tüpüne 125 µl serum ve 125 µl % 6'lık perklorik asitten alındı. 15 dk beklendikten sonra 2500 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra yine boş bir ependorf tüpüne süpernatant kısımdan 500 µl ve hazırladığımız reaksiyon solüsyonundan 150 µl konuldu. 90 °C sıcak su banyosunda 20 dakika bekletildi. Buz banyosuna alındı. Üzerine 750 µl %65'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika beklendi ve mikroplate cihazında 520 nm de okuma yapıldı.

**Vitamin E analizi:** Boş bir ependorf tüpüne 250 µl serum, 250 µl mutlak etanol ve 250 µl xylene konuldu. Toplam 750 µl olan karışım 30 sn vortekslendi. 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra yine boş bir ependorf tüpüne süpernatant kısımdan 0.5 ml alındı. Üzerine 0.5 ml TPTZ ilave edildi. Mikroplate cihazında 460 nm de birinci okuma yapıldı. Okumadan sonra üzerine 0.1 ml FeCl<sub>3</sub> ilave edildikten sonra 600 nm de ikinci okuma yapıldı. Ayrıca analiz için kör ve standart tüpler hazırlandı. Kör tüpe 250 µl mutlak etanol, 250 µl distile su ve 250 µl xylene; Standart tüpe, 250 µl çalışma standardı, 250 µl distile su ve 250 µl xylene ilave edildikten sonra 30 sn vorteksle karıştırılarak bu aşamadan sonraki tüm uygulamalar yukarıdaki işlemlere uygun olarak yapıldı.

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

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

#### **MDA analizi**

**Birinci çalışma solüsyonu (W<sub>1</sub>):** 4.05 M konsantrasyonlu orijinal stok malondialdehit (MDA, Sigma) solüsyonundan 2,47 µl alınarak 997,53 µl bidistile saf suda direkt ışık temasından korunarak seyreltildi.

**İkinci çalışma solüsyonu (W<sub>2</sub>):** Birinci çalışma solüsyonundan 10 µl alınıp 990 µl bidistile saf su ilave edilerek vortekslendi.

**Üçüncü çalışma solüsyonu (W<sub>3</sub>):** İkinci çalışma solüsyonundan 10 µl alınarak üzerine 990 µl bidistile saf su eklendi.



Çizelge 3.3. Stok solüsyondan çalışma standart solüsyonunun hazırlanması

Standartlar	MDA ( $\mu$ l)	n(H <sub>2</sub> O) ( $\mu$ l)	Konsantrasyon (nmol)
W <sub>1</sub>	2.47	997.53	10.000
W <sub>2</sub>	10	990	100
W <sub>3</sub>	10	990	1

Çizelge 3.4. MDA standart serisinin hazırlanması

Standart No	n(H <sub>2</sub> O) ( $\mu$ l)	W <sub>3</sub> ( $\mu$ l)	Konsantrasyon (nmol)
0	100	-	0.0
1	90	10	0.1
2	80	20	0.2
3	60	40	0.4
4	20	80	0.8
5	-	100	1.0

Çalışma (W<sub>3</sub>) standardı (Çizelge 3.3) hazırlandıktan sonra standart serisi için tüpler hazırlanarak daha önce hazırlanıp dondurulmuş doku süpernatantları çıkartılarak buz kabında erimeleri sağlandı. Bundan sonra standart serisindeki (Çizelge 3.4) her bir tüpe ve örnek tüplerine sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Örnek ve standartların her birinden 100'er  $\mu$ l alınarak üzerlerine sırasıyla aşağıdaki solüsyonlar ilave edildikten sonra 20 saniye vorteksenerek + 97 °C'deki benmaride 60 dakika inkübe edildi.

- Örnek ve standartların her birinden.....100  $\mu$ l
- Perklorik asit( 0,1125 N).....300  $\mu$ l
- TBA (8 mg TBA 1 ml metanolde çözüldü).....300  $\mu$ l

2. Benmariden çıkarılan tüpler bir süre soğutulduktan sonra -20 °C' de 20 dakika tutulmuştur. Buradan alınan tüplerin her birisine aşağıdaki solüsyonlar eklenmiştir.

- Metanol.....600  $\mu$ l
- Trikloro asetik Asit (%20).....200  $\mu$ l

3. Bu ilavelerden sonra tüpler 10 saniye vortekslenerek 13.000 x g'de 6 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra süpernatant yaklaşık 1000 µl alınıp mikrotplate (Jasco FP-6300), eksitasyon 525 nm ve emisyon 560 nm'de absorbans değerleri okundu.
5. Distile su ile kalibrasyonu (auto zero) yapıldıktan sonra konsantrasyonları bilinen standartlar sırasıyla okunarak, madde miktarı (x) ve absorbans (y) olacak şekilde lineer bir standart grafiği oluşturuldu. Excel programı kullanılarak oluşan standart eğrisi grafiğinin denklemi bulundu. Buradan madde miktarını temsil eden x yalnız bırakılarak okunan absorbanslar tek tek denklemde yerine konularak gerçek madde miktarı nmol cinsinden tespit edildi.

### GSH analizi

**Stok solüsyonu:** 3.073 mg indirgenmiş GSH (Sigma) 10 ml saf suda çözülerek 1 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı.

**Çalışma solüsyonu:** Stok solüsyondan 100 µl alındı. Üzerine 900 µl saf su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu çalışma solüsyonu hazırlandı.

Çizelge 3.5. GSH analizi için çalışma solüsyonu hazırlama

Standart	1 mM stok GSH(µl)	nH <sub>2</sub> O (µl)	Konsantrasyon (µM)
W <sub>1</sub>	100	900	100 µM (100 nmol)

Çizelge 3.6. GSH standart serisinin hazırlanması

Standart No	nH <sub>2</sub> O (µl)	W <sub>1</sub> (µl)	Konsantrasyon(nmol)	Diğer solüsyonlar
0	100	0	0	900
1	99	1	0.1	900
2	98	2	0.2	900
3	96	4	0.4	900
4	92	8	0.8	900
5	84	16	1.6	900
6	68	32	3.2	900

Standartlar artan konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra analiz edilecek numuneler -80 °C'den çıkarılıp eritildikten sonra buz kabına alındı. Homojenize edilen doku örneklerinin üzerine toplam hacmin 1/10'u olacak şekilde %60'lık perklorik asit ilave edilerek 6000 rpm/10 dakika santrifüj edilerek GSH analizi için

süpernatantlar alındı. Kan örnekleri ise herhangi bir ön işlem uygulanmadan analize alınarak sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Örnek veya standart .....	100 µl
GSH buffer .....	890 µl
OPA .....	10 µl

Maddeler eklendikten sonra tüm örnekler 2-3 saniye vortekslendikten sonra oda ısısında 5-6 dakika, direkt ışık etkisinden korunarak bekletilerek mikro plate okuyucu (Jasco, FP-6300) dalga boyu eksitasyon 345 nm ve emisyon 425 nm’de okunarak absorbans değerleri kaydedildi. Okunan standartlardan elde edilen standart eğri formülünde değerler yerine konularak numunemizdeki madde miktarları hesaplanmıştır.

### 3.8. Çalışma için gerekli malzeme ve kimyasallar

#### **Kullanılan cihaz ve malzemeler**

- Benmari (GLF 1086)
- Bıçaklı homojenizatör (Heidolph, Silent Crusher M)
- Buz yapma makinesi (Hoshizaki, FM-120EE)
- Derin dondurucu (Sanyo, MDF 592)
- Distile su cihazı (Barnstead, easypure UV/UF)
- Hassas terazi (Precisa, 262 SMA-FR)
- Filtre kağıdı (Watman)
- Kaba terazi
- Manyetik karıştırıcı (Precisa, Heating stirrer SH-3A)
- Otoanalizör (Roche, Cobas Integra 400 plus)
- Parçalayıcı robot (Sinbo)
- pH metre (Thomas, Cyberscan 2500)
- Pipetler (Eppendorf)
- Rotary evaporatör (Heidolph, Laborata 4002)
- Liyofilize cihazı (Tel star Cryodos)
- Santrifüj (Hettich, Mikro 22 R)
- Spektroflorometre (Jasco, FP 6300)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1700)

Ultrasonikatör (Bandelin, UW 2070)

Vorteks (Stuart Scientific)

Mikro plate okuyucu

**Kullanılan kimyasallar**

GSH

**GSH tamponu**

MDA

Metanol

OPA

PBS

Perklorik asit

Potasyum tamponu

SDS

TBA

TET

Saija, A. ve grubu ise yaptıkları çalışmada kan portakalından elde ettikleri pigmentin siyanidin 3-glikosid olduğunu bildirerek fareler üzerinde yaptıkları araştırmada gastirik mukozaya ve hücre duvarlarındaki kan basıncına koruyucu etki gösterdiğini, bunun yanında bağışıklık etkisini arttırdığını belirtmişlerdir (Yamaguchi ve Honda, 1994).

Yine antosiyaninin sağlık üzerine etkileri konusunda yapılan bir araştırmada, flavonların ve antosiyaninlerin, tedavi yöntemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Proserpio ve Malpede, 1995).

Antosiyaninlerin farmakolojik aktiviteleri incelenerek ilaç, vitamin ve kozmetikte kullanılmaları üzerine yapılan çalışmalar, bir derleme halinde toplanmıştır (Vega ve ark., 1987).

Bu pigmentler kalite indikatörü olarak büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca renk verici özelliklerinin yanında güçlü antioksidan etkilerinden dolayı tedavi edici özellikleri de vardır (Camire ve ark., 2002; Serraino ve ark., 2003).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Bulguları

Kontrol grubu (K), sırasıyla; 2. grup: 40 gün boyunca günde 4 saat UV-C ışığı uygulanan Hasta (UV) grubu; 3. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 2.5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup; 4. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup; 5. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 10mg/kg/gün antosiyanin verilen grup olmak üzere gruplandırılmıştır. Grupların kan serumunda bulunan antioksidan vitaminlerden vitamin A, vitamin C ve vitamin E nin miktarlarına mikropate okuyucu (SpectraMax M5) yardımıyla ölçülüp kaydedildi.

Ayrıca grupların serumda ve bulunan indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) miktarları mikropate okuyucu (SpectraMax M5) yardımıyla ölçülüp kaydedildi.

Gruplardan alınan deri örneklerinde indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) miktarları mikropate okuyucu (SpectraMax M5) yardımıyla ölçülüp kaydedildi.

Grupların beyin dokusunda apoptotic DNA Ladder kit ile Apoptozise bakılıp jelde yüzdürülerek görüntü elde edilmiştir.

#### 4.1.1. Klinik Sonuçlar

Bütün gruplarda yem ve su tüketiminde anormal durumlar gözlenmedi. UV ye maruz bırakılan sıçanlarda traş edilen sırt bölgelerinde deride aşırı bir kalınlaşma bazı sıçanlarda ise kalınlaşma dışında derilerinde çatlama kanama gözlemlendi.

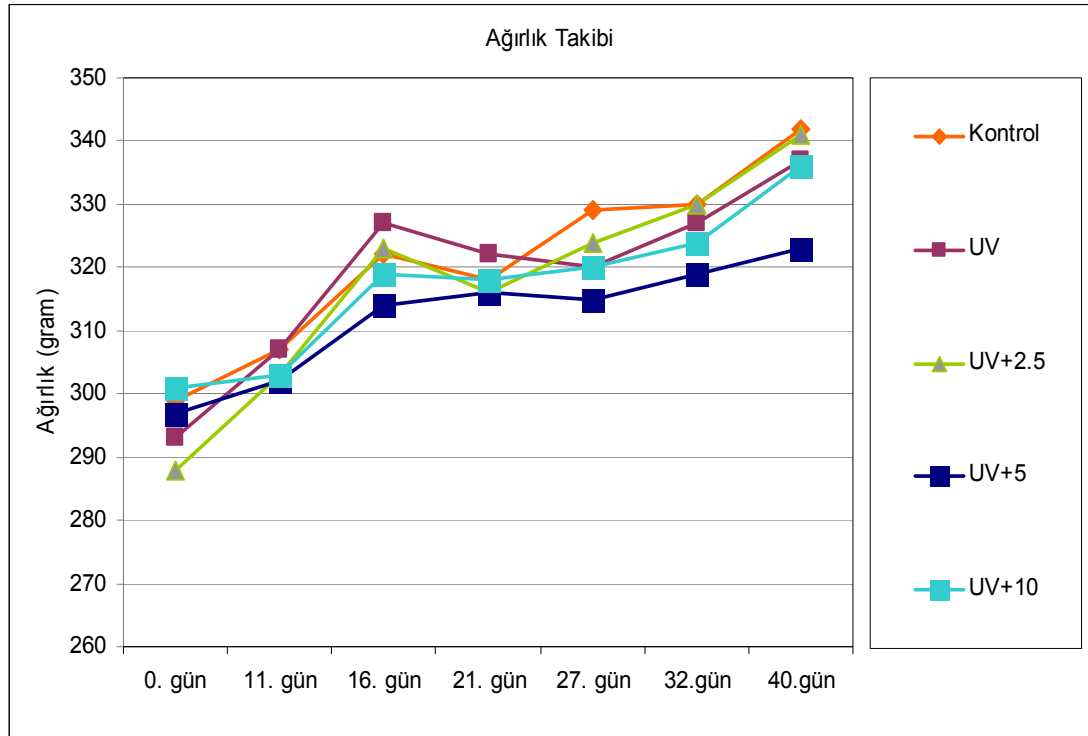
Ratlar UV kabinine bırakıldıktan sonra gözlerini kısmışlardır. Bazı ratların gözlerinde kanama kulaklarında pörsüme ve kızarma gözlenmiştir.

UV ye maruz bırakıldıktan yaklaşık bir saat sonra buldukları kafeste uzanma davranışları skrotumlarında sarkmalar kızarmalar gözlenmiştir. Ayrıca göz çevresi ve kafatasındaki tüylerde dökülme gözlenmiştir.

#### 4.1.1.1. Ağırlık değişim takibi

Çizelge 4.1. Deney süresi boyunca gruptaki ağırlık değişimi (gram)

	Kontrol	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
0. gün	299	293	288	297	301
11. gün	307	307	303	302	303
16. gün	322	327	323	314	319
21. gün	318	322	316	316	318
27. gün	329	320	324	315	320
32.gün	330	327	330	319	324
40.gün	342	337	341	323	336

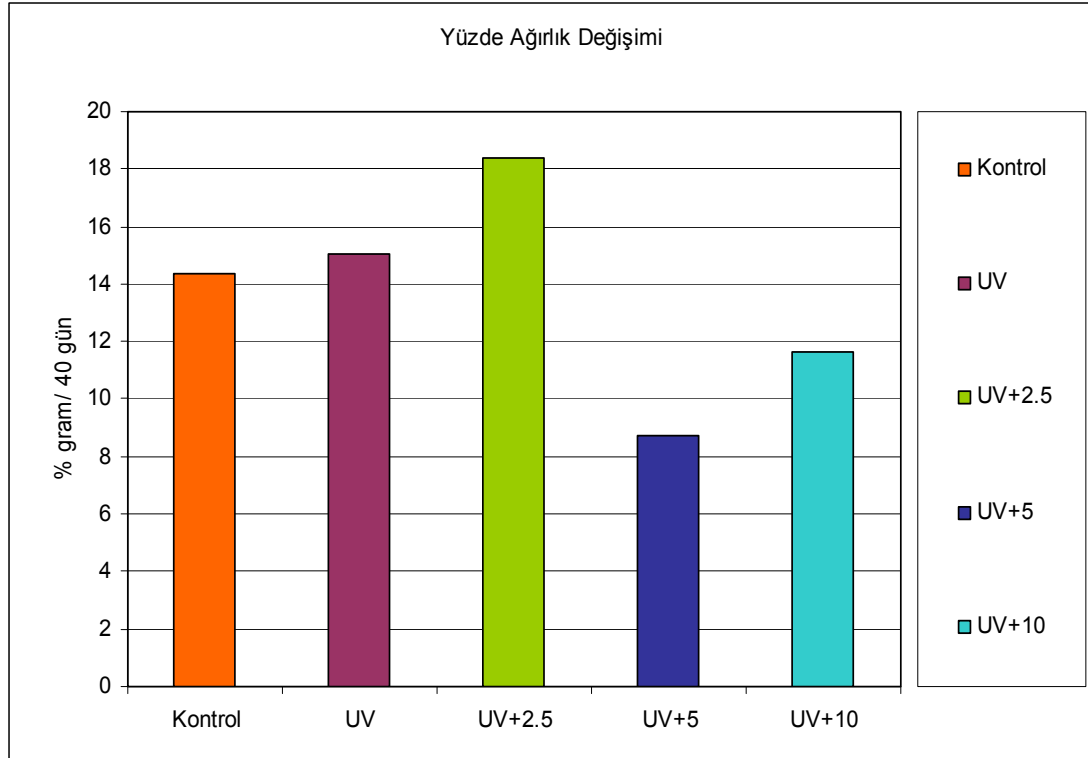


Şekil 4.1. Deney süresi boyunca gruptaki ağırlık değişimi

## 4.1.1.2. Deney sonuna kadar kazanılan net ağırlık ve yüzdesi

Çizelge 4.2. Deney sonuna kadar kazanılan net ağırlık ve yüzdesi

Gruplar	İlk Ağırlık (g)	Son Ağırlık (g)	Fark (g)	Yüzde Ağırlık Değişimi
Kontrol	299	342	43	14,38
UV	293	337	44	15,02
UV+2.5	288	341	53	18,40
UV+5	297	323	26	8,75
UV+10	301	336	35	11,63



Şekil 4.2. Deney sonuna kadar kazanılan ağırlık yüzdesi

Aynı ortam ve şartlarda yaşayan kontrol ve uygulama gruplarında deney sonuna kadar (40 gün) kontrol grubunda %14.38, UV grubunda %15.02, UV+2,5 grubunda %18.40, UV+5 grubunda %8.75, UV+10 grubunda %11.63 oranında ağırlık artışı olduğu görüldü. Ayrıca grupların yem tüketimlerinde önemli sayılabacak bir değişiklik görülmemiştir.



#### 4.1.2. Antioksidan Parametreler

##### 4.1.2.1. Serum vitamin A sonuçları

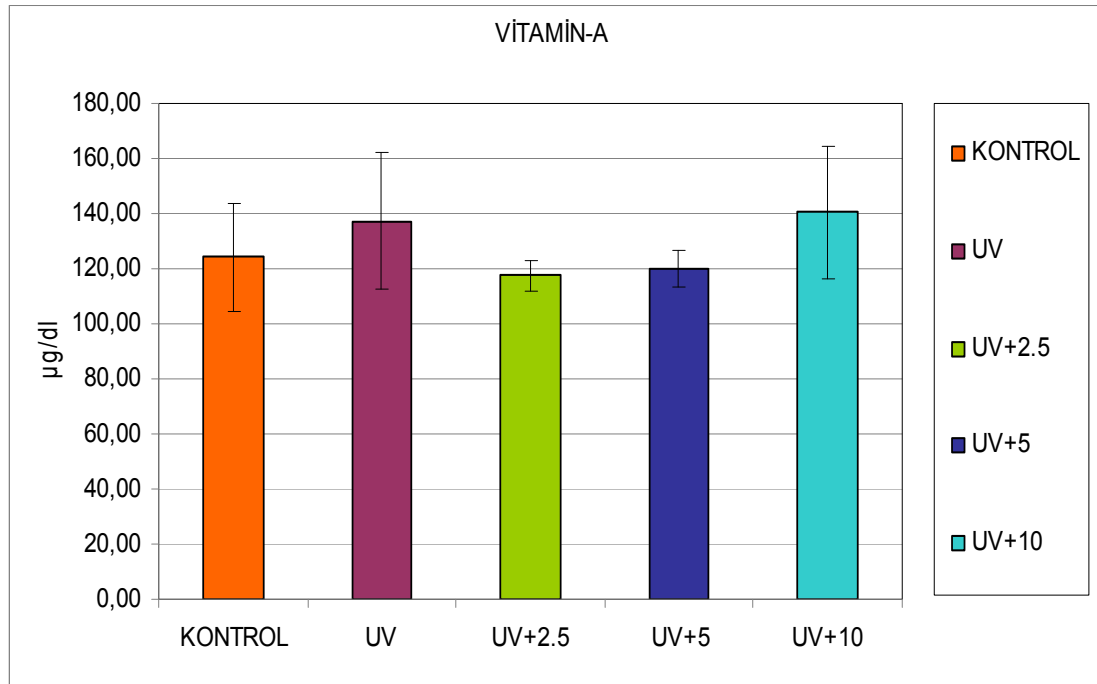
Serumdaki vitamin A miktarı, 453 ve 325 nm dalga boyunda 2 kez okuma yapılarak ölçüldü.

Çizelge 4.3. Deney gruplarının serum vitamin A seviyeleri

Vit-A µg/dl	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
Ortalama	124,14	137,37	117,71	119,95	140,39
STD	19,38	24,95	5,53	6,95	23,78

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.3. Deney gruplarının serum vitamin A seviyeleri

Kan serum vitamin A düzeylerinde kontrol grubuna göre UV ve UV+10 mg antosiyanin grubunda artış görülmekle birlikte bu istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubuna göre UV+2.5 ve UV+5 mg antosiyanin grubunda tespit edilen azalmalar da istatistiki bakımdan anlamlı görülmemiştir. Serum vitamin A düzeylerinde ultraviyole grubuna göre antosiyanin uygulanan gruplarda görülen değişimlerin istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### 4.1.2.2 Serum vitamin C sonuçları

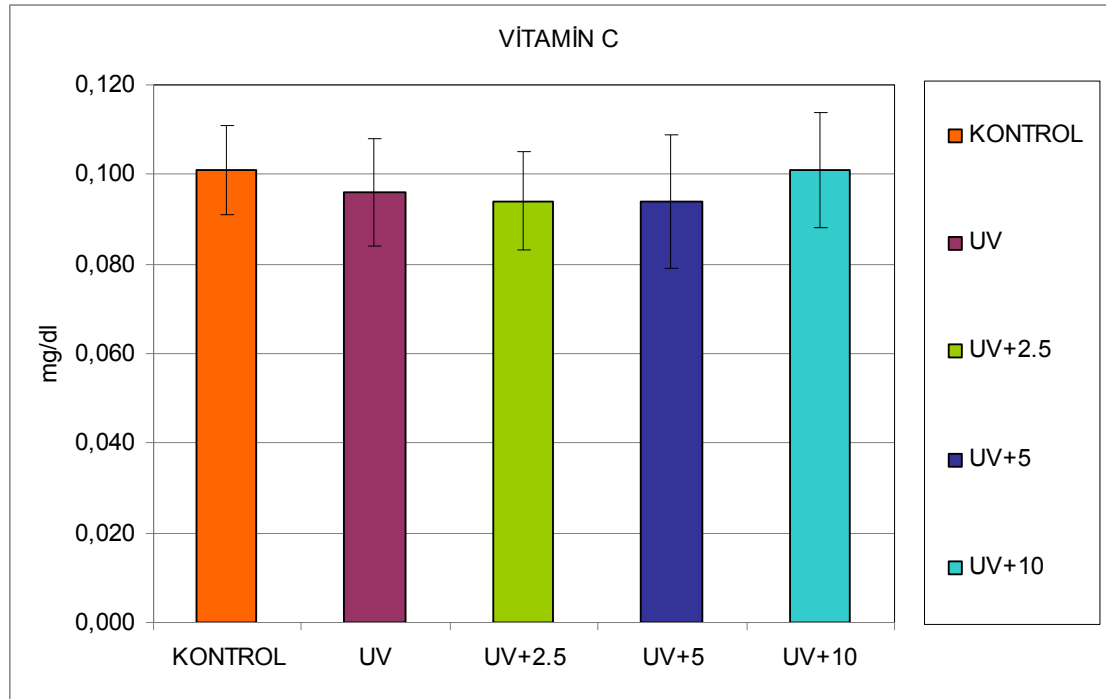
Serumdaki vitamin C miktarı 520 nm dalga boyunda okuma yapılarak ölçüldü.

Çizelge 4.4. Deney gruplarının serum Vitamin C seviyeleri

Vit-C mg/dl	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
Ortalama	0,101	0,096	0,094	0,094	0,101
STD	0,010	0,012	0,011	0,015	0,013

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.4. Deney gruplarının serum Vitamin C seviyeleri

Grupların vitamin C seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre uygulama gruplarında genel bir azalma görülmekle birlikte vitamin C seviyesinde ki bu düşüş istatistiki bakımdan anlamlı bulunmamıştır. Ultraviyole grubuna göre kıyaslandığında antosiyanin uygulanan grupların serum vitamin C seviyelerindeki değişimler istatistiki olarak anlamlı görülmemiştir.

#### 4.1.2.3. Serum vitamin E sonuçları

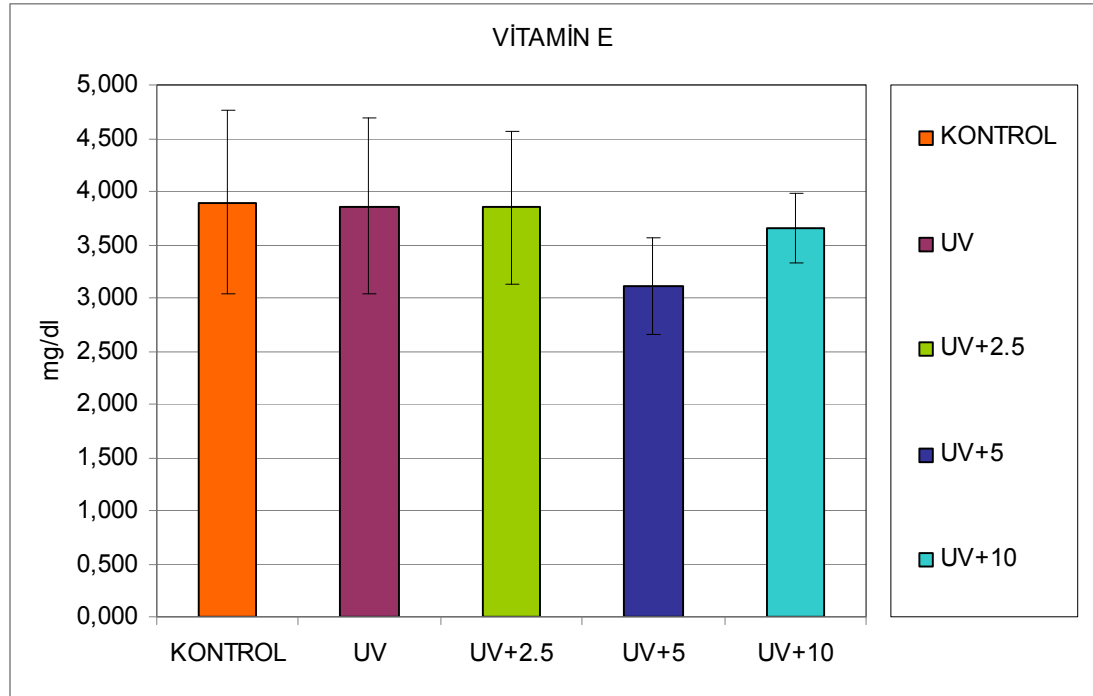
Serumdaki vitamin E miktarı ise 460 ve 600 nm dalga boyunda 2 kez okuma yapılarak ölçüldü.

Çizelge 4.5. Deney gruplarının serum Vitamin E seviyeleri

Vit-E mg/dl	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
ORT	3,893	3,861	3,851	3,105	3,650
STD	0,865	0,830	0,714	0,459	0,324

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.5. Deney gruplarının serum vitamin E seviyeleri

Grupların serum vitamin E seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında düşüş gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise Antosiyanin uygulanan gruplardaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı olarak görülmemiştir.

#### 4.1.2.4 Serum MDA sonuçları

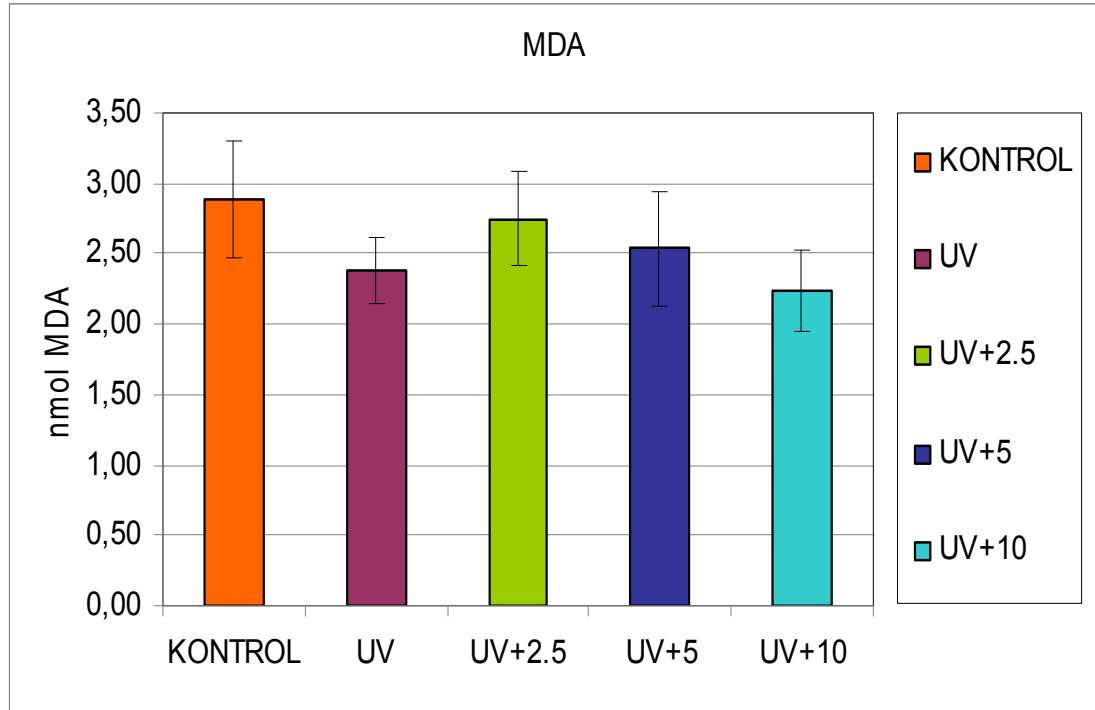
Serum MDA seviyeleri mikro plate okuyucuda dalga boyu eksitasyon 525 nm ve emisyon 560 nm de okunarak absorbans değerleri okunarak kaydedildi.

Çizelge 4.6. Grupların serum MDA değerleri

MDA (nmol)	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
ORT	2,89	2,38 <sup>a</sup>	2,75	2,54	2,24 <sup>a</sup>
STD	0,42	0,23	0,34	0,41	0,28

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.6. Grupların serum MDA miktarları

Grupların serum MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüş gözlenmiştir. UV gruplarındaki düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise antosiyanin gruplarındaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı olarak görülmemiştir.

#### 4.1.2.5. Serum GSH sonuçları

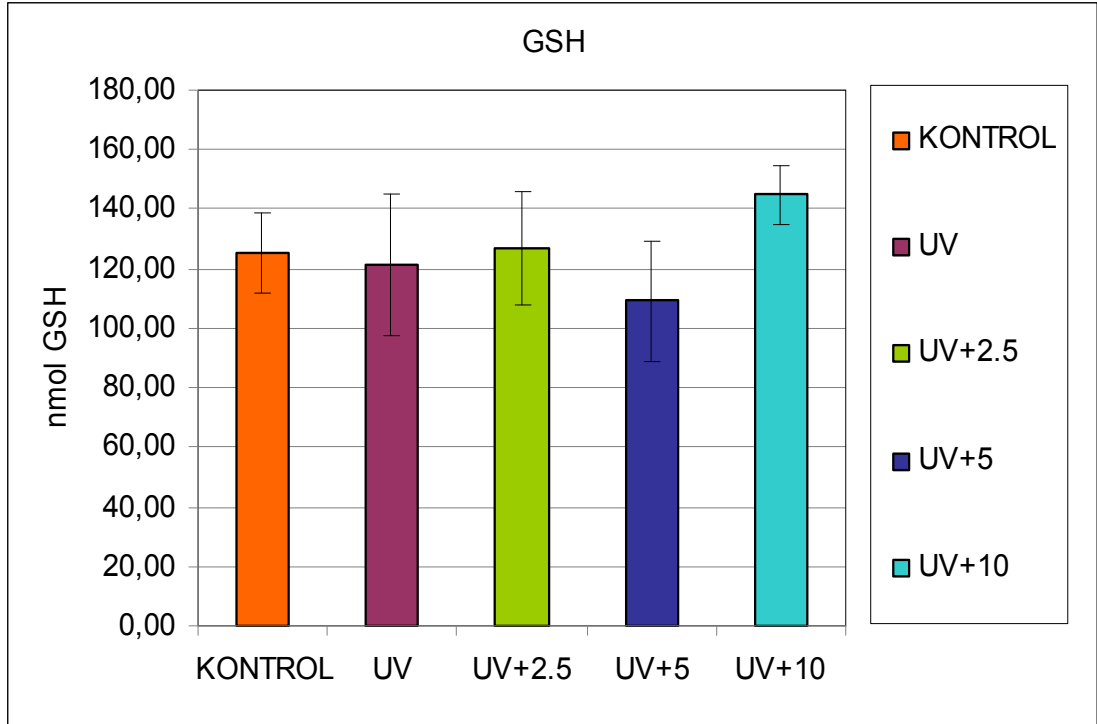
Serum GSH seviyeleri mikro plate okuyucuda dalga boyu eksitasyon 345nm ve emisyon 425nm de okunarak absorbans değerleri okunarak kaydedildi.

Çizelge 4.7. Grupların ortalama serum GSH değerleri

GSH (nmol)	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
ORT	125,11	121,28	126,86	109,10	144,75 <sup>a b</sup>
STD	13,33	24,09	19,24	20,12	10,26

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.7. Grupların serum GSH miktarları

Grupların serum GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV ve UV+5 grubunda azalma ve UV+2,5 grubunda artış gözlemlendi fakat bu değişimler istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki artış gözlemlendi ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarındaki değişimlerden sadece UV+10 grubundaki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.1.2.6. Deri MDA Sonuçları

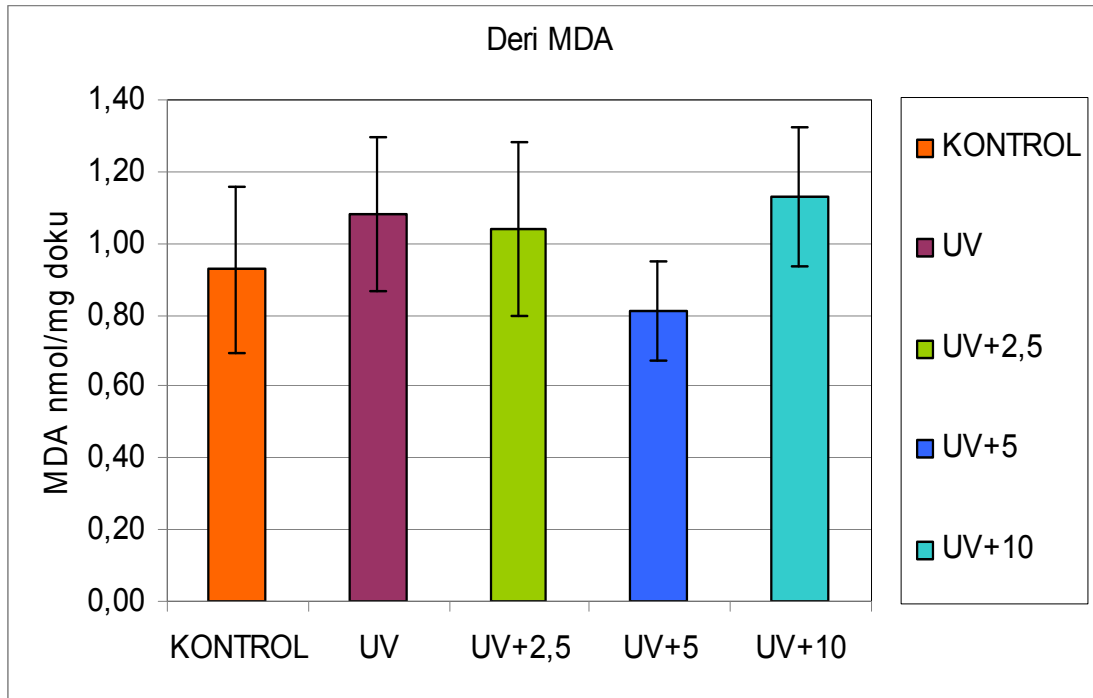
Deri MDA seviyeleri mikro plate okuyucuda dalga boyu eksitasyon 525 nm ve emisyon 560 nm de okunarak absorbans değerleri okunarak kaydedildi.

Çizelge 4.8. Grupların deri MDA değerleri

MDA (nmol/g)	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
ORT	0,93	1,08	1,04	0,81 <sup>b</sup>	1,13
STD	0,23	0,21	0,24	0,14	0,19

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



Şekil 4.8. Grupların deri MDA miktarları

Grupların deri MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV, UV+2,5, UV+10 gruplarında artış UV+5 grubunda ise azalış görülmüştür. Bu değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise UV+2,5 ve UV+5 gruplarında azalma UV+10 grubunda ise bir artma gözlenmiştir. Bu değişimlerden UV+5 grubundaki azalma istatistik olarak anlamlı bulunurken diğer değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### 4.1.2.7. Deri GSH Sonuçları

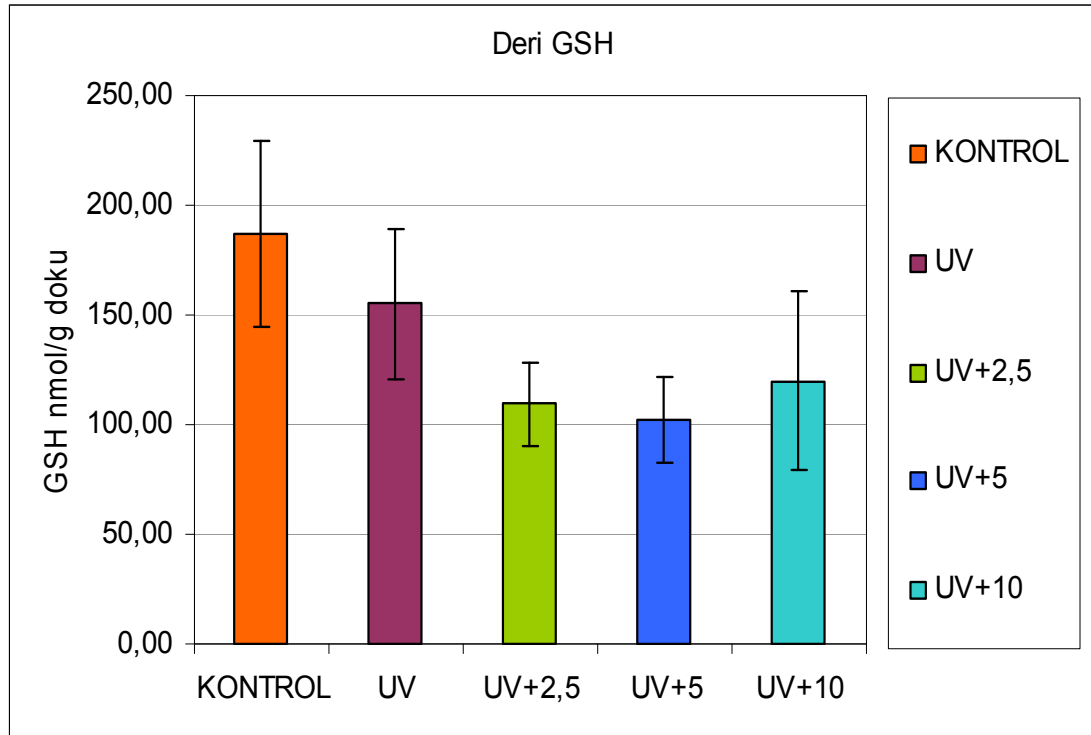
Deri dokusu GSH seviyeleri mikro plate okuyucuda dalga boyu eksitasyon 345nm ve emisyon 425nm de okunarak absorbans değerleri okunarak kaydedildi.

Çizelge 4.9. Grupların ortalama deri GSH değerleri

GSH (nmol/g)	KONTROL	UV	UV+2.5	UV+5	UV+10
ORT	186,65	154,95	109,36 <sup>a b</sup>	102,11 <sup>a b</sup>	119,91 <sup>a</sup>
STD	42,20	33,77	19,04	19,43	40,65

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$

<sup>b</sup> Ultraviyole grubuna göre istatistiki olarak anlamlı  $p \leq 0.05$



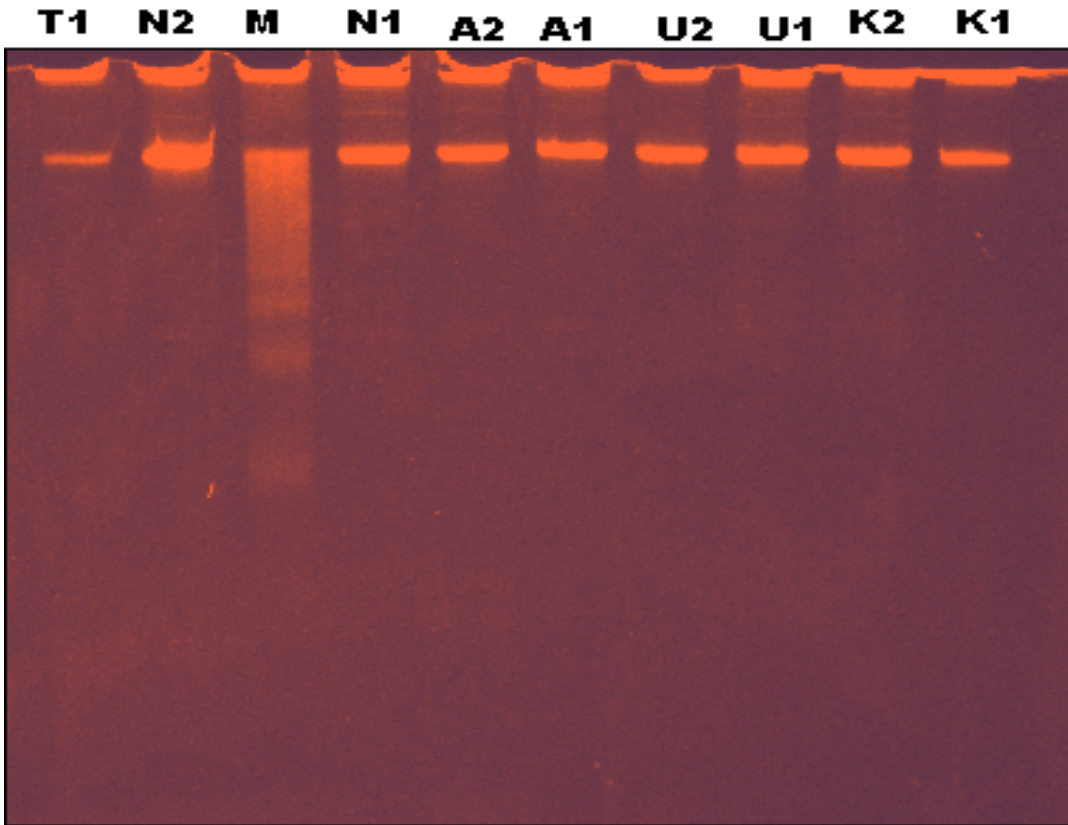
Şekil 4.9. Grupların serum GSH miktarları

Grupların deri GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre bütün gruplarda bir azalma görülmüştür. UV grubundaki azalma istatistiki

olarak anlamsız bulunurken UV+2,5, UV+5 ve UV+10 gruplarındaki azalma istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarında azalma görülmüştür. Bu azalmalardan UV+2,5 ve UV+5 grupları istatistiki olarak anlamlı UV+10 grubu ise istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### 4.1.2.8. Beyin Dokusu Apoptozis Görüntüleri



Şekil:4.10. Beyin dokusu apoptozis görüntüleri

- K:** Kontrol gurubu
- U:** Ultraviyole gurubu
- A:** 2,5 mg/kg antosiyanin verilen gurup
- N:** 5 mg/kg antosiyanin verilen gurup
- T:** 10 mg/kg antosiyanin verilen gurup
- M:** Markır



Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur.

5 mg/mg/gün antosiyanin grubunda belirgin fragmentasyonlar görülmektedir. Bu da apoptozis mekanizmasının çalıştığı ve uygulanan UV-C nin yol açtığı serbest radikallerin hasara uğrattığı hücrelerin kanserleşmeye gitmesini önlemek için DNA'ları 150 nükleotid çiftleri halinde parçalanarak ortadan kaldırılmıştır.

2,5 mg/kg/gün antosiyanin grubunda ise 5 mg/kg/gün antosiyanin grubuna benzer bir fragmentasyon mevcuttur.

10 mg/kg antosiyanin verilen grupta ise fragmentasyon gözlenmemiş olup bu dozun diğer dozlara göre daha az koruyucu olduğu saptanmıştır.

UV grubunda ise fragmentasyonlar yok sayılacak kadar az sayıdadır. Bu durumu UV-C uygulanan ratlarda oluşan serbest radikallerin apoptozis mekanizmasını engellediğini düşünmekteyim.

Kontrol grubunda gözlenen fragmentasyon 5mg/kg/gün grubundan daha az 2,5 mg/kg/gün grubuna paralellik gözlenmiştir.

## 4.2. Tartışma

### 4.2.1. Vitamin-A

Vitamin A vücutta %97 olarak karaciğerde depolanmaktadır. UV etkisi altında karaciğerden seruma Vitamin A salınımında artış görülmektedir. Buna bağlı olarak UV grubunda serum Vitamin A seviyesi yüksek çıkmış olabilir. Yaptığımız çalışmada, A vitamininde gözlenen değişim, olası serbest radikal ataklarından kaynaklanabilir. Bu da serbest radikallerin antioksidan savunma mekanizmalarını aşacak şekilde fazla oluştuklarını göstermektedir. Çünkü serbest radikallerin metabolizma üzerindeki zararlı etkileri bu mekanizmanın aşılması sonucunda şekillenmektedir.  $\beta$ -karoten ve retinol antioksidan aktivitesini serbest radikallerin

oluşumunu engelleyerek ve ortamdaki radikalleri toplayarak gerçekleştirmektedir (Aalt ve ark., 1991). Verilen farklı dozdaki antosiyaninlerden UV+10 mg/kg/gün grubundaki vitamin-A seviyesini en yüksek çıkarmıştır.

#### 4.2.2. Vitamin-C

C vitamini (Askorbik asit) güçlü indirgeyici aktiviteye sahip olduğundan aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların inaktive edilmesinde rol oynar (Akkuş, 1995; Granado ve ark., 1998). Lupo, (2001) UV ışını ile azalan vitamin C replasmanının hücreleri serbest radikal maruziyetinden koruduğunu düşünmüştür. C vitamini suda çözünen bir vitamin olup vücutta depolanamaz. Çalışmamızda UV grubu serumundaki vitamin C seviyesi düşük bulunmuştur. Vitamin C depolanmadığı için oluşan serbest radikallere karşı tüketimi artmıştır. Anyosiyanin gruplarından vitamin C seviyesinin en yüksek olduğu grup 10mg'lık antosiyanin olmuştur. Bu artışın oluşan serbest radikallere karşı antosiyaninin antioksidan etkisinden dolayı serbest radikaller nötralize edilirken vitamin C kullanımı azaltmış bundan dolayıda vitamin C seviyesinde artış olmuş olduğunu düşünülmüştür.

#### 4.2.3. Vitamin-E

E vitamini hücre membranlarını, serbest radikallerden kaynaklanan lipid peroksidasyonundan korumada anahtar rol oynayan, yağda çözünür bir antioksidandır (Nicolaidou ve Katsambas, 2000). Weber ve ark., UV. ye maruz hayvanlarda vitamin E. yi azalmış olarak bulmuş ve Jurkiewicz ve ark. bu azalmanın topikal vitamin E eklenmesiyle UV'ye karşı önemli koruma sağladığını göstermişlerdir. Çalışmamızda Kontrol grubuna göre diğer gruplarda serum vitamin E seviyesini düşük bulduk. UV-C'ye maruz bıraktığımız ratlarda E vitamininin düşük bulunmasını oluşan serbest radikallerin verdiği hasara bağlı olduğunu düşünülmektedir.

#### 4.2.4. Serum MDA

Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının en önemli mekanizması hücre zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonudur (Cross ve ark., 1987). Sağlıklı dokularda çok düşük düzeylerde olan lipid peroksidasyonun artışı serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinden birisi de malondialdehiddir (MDA). Serumdaki MDA düzeyinin ölçümü *in vivo* serbest oksijen radikalleri aracılığla doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilir (Torun ve ark., 1995).

İnal ve Kahraman UV-A'nın indüklediği oksidatif strese karşı quersetinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve sonuç olarak UV grubunda kontrol grubuna göre MDA seviyesinde bir artma olduğunu rapor etmişlerdir (İnal ve Kahraman, 2000). Ayrıca Yarıқтаş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada baş-boyun tümörlü hastalarda eritrosit MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği rapor edilmiştir.

Cellat ve Kılıçalp, (2010) kobayları elektromanyetik radyasyona maruz bırakmışlar ve böbrek dokusunda yaptıkları analizler sonucunda kontrol grubuna göre radyasyon grubunda MDA seviyesinde bir artışın gözleendiğini rapor etmişlerdir.

Fakat bizim Çalışmamızda serum MDA seviyeleri kontrol grubuna göre UV grubunda bir azalma gözlenmiştir.

#### 4.2.5. Deri MDA:

Chang ve Zheng, (2003) *Elaphe taeniura* adlı yılanları UV-B'ye maruz bırakmış ve deri MDA seviyelerine bakmışlar. Sonuçta kontrol grubuna göre UV-B uygulanan gruplarda MDA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir. UV grubunda MDA seviyesi artmıştır. Bu artışın UV'nin oluşturduğunu

düşündüğümüz serbest radikallerin lipidlerde meydana getirdikleri hasardan kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Uygulanan antosiyanin dozlarından MDA seviyesini en çok düşüren grup 5mg/kg/gün antosiyanin grubu olmuştur.

#### 4.2.6. Serum GSH:

Hücre içinde bir tripeptit (glutamik asit, sistein glisin) olarak sentezlenen glutasyon, NADPH'ı kullanarak hücrelere indirgeyici güç sağlamaktadır. Hücrede esas olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunur. Reaktif oksijen türlerinin kimyasal veya metabolik oluşumuna yol açan hücre içi ve/veya hücre dışı koşullar oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasındaki denge organ veya organ sistemlerinin oksidatif strese olan duyarlılıklarını belirler. Endojen ve eksojen stresten kaynaklanan serbest radikaller ateroskleroz, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, ilaç toksisitesi, ve viral enfeksiyon gibi belirli hastalıkların patojenitesinde belirgin bir rol oynamaktadır. GSH, antioksidan vitaminler (vitamin E, vitamin C), antioksidan enzimler oksidatif hasara karşı hücreleri korumada önemli rol oynamaktadır. GSH ve GSH öncülleri antioksidan kapasiteyi korumada tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Cellat ve Kılıçalp (2010) kobayları elektromanyetik radyasyona maruz bırakmışlar ve böbrek dokusunda yaptıkları analizler sonucunda kontrol grubuna göre radyasyon grubunda GSH seviyelerinde bir azalma gözlendiğini rapor etmişlerdir.

İnal ve Kahraman,(2000). UV-A'nın indüklediği oksidatif strese karşı quersetinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve sonuç olarak UV grubunda kontrol grubuna göre GSH seviyesinde bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Verilen antosiyanin dozlarından GSH seviyesini en çok arttıran grup 10 mg/kg/gün grubudur.

Kontrol grubuna göre radyasyon grubunda GSH seviyelerindeki bu azalmayı UV-C ile oluşturduğumuz oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallere karşı antioksidan olan GSH'ın serbest radikalleri nötralize etmede kullanıldığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

#### 4.2.7. Deri GSH

Cellat ve Kılıçalp (2010) kobayları elektromanyetik radyasyona maruz bırakmışlar ve böbrek dokusunda yaptıkları analizler sonucunda kontrol grubuna göre radyasyon grubunda GSH seviyelerinde bir azalma gözlendiğini rapor etmişlerdir.

İnal ve Kahraman (2000) UV-A'nın indüklediği oksidatif strese karşı quersetinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve sonuç olarak UV grubunda kontrol grubuna göre GSH seviyesinde bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir

Çalışmamda elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Verilen antosiyanin dozlarından GSH seviyesini en çok arttıran grup 10mg/kg/gün grubudur.

Kontrol grubuna göre radyasyon grubunda GSH seviyelerindeki bu azalmayı UV-C ile oluşturduğumuz oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallere karşı antioksidan olan GSH'ın serbest radikalleri nötralize etmede kullanıldığından kaynaklandığını düşünmekteyim.

#### 4.2.8. Apoptozis

p53 geni hem tümör baskılayıcı hem de apoptoz yöneticisi görevini görmektedir. (Oltvai ve Korsmeyer, 1994). Gelişmekte olan hücrelerde DNA hasarı ortaya çıktığında, hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktadır (Barr ve Tomei, 1994; Bellamy ve ark., 1995). Bu fazda hücre ya DNA onarım yoluna gider (ve

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

Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir

Çalışmamda beyin dokusunda apoptozis jel görüntülerine bakıldığında UV grubunda fragmentasyonların yok denecek kadar az olduğu gözlemlendi. Bunun nedeninin UV-C'nin direkt ya da oluşturduğu serbest radikallerden etkisi sonucu p53 geninin işleyişinde bir aksamaya veya yapısında bozulmalara neden olmasından kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Antosiyanin verilen gruptaki fragmentasyonların UV grubuna göre çok olmasının nedenini oluşturan serbest radikallere karşı antosiyanin antioksidan özelliğinden dolayı bu serbest radikalleri nötralize ettiği ve dolayısı ile serbest radikallerin apoptozis mekanizmasına hasar vermesini önlediğini ve apoptozis mekanizmasının UV grubuna göre daha iyi çalıştığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda fragmentasyonların en belirgin olarak görüldüğü grup 5mg/kg/gün antosiyanin verilen gruptur.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Son yıllarda sıcak bölgelerde tatil yapılmasının, güneşlenme alışkanlığının ve dışarıda yapılan sporların artması, bazı insanların dışarıda çalışmak zorunda olması endüstride kullanılan ve teknoloji ile hayatımızın her alanına girebilen ultraviyole (UV) yayan çeşitli cihazların artması ve çevrenin aşırı kirletilmesi sonucu ozon tabakasının delinmesi veya incilmesi ile insanlar yoğun olarak UV'ye maruz kalmaktadır. UV'ye maruz kalmanın artması ile birlikte UV'nin zararlı etkileri de son yıllarda artış göstermektedir. UV ışınları 100-400 nm dalga boyundaki ışınlar olup başlıca üç spektruma ayrılmaktadır. UV ışınları serbest radikal oluşumuna sebep olarak vücudumuza zarar vermektedir.

Serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfı da antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ya da ortamdan uzaklaştırarak, bu zararlı etkilerine karşı gelmektedir. Aralarında ön planda karotenoidler, vitamin C, vitamin E, ve polifenollerin sayılabileceği bu antioksidanlar, sebze ve meyvelerde bol miktarlarda bulunmaktadır.

Bitkilerden elde edilen antioksidanlar son yıllarda yoğun bilimsel araştırmalara konu olan ve buna paralel olarak da giderek artan bir kullanım potansiyeline sahip doğal bileşiklerin başında gelmektedir. Bu çalışmada zengin bir antioksidan içeriğe sahip olan Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) bitkisinin kalikslerinden elde edilen antosiyanin maddesinin üç farklı dozu kullanılmıştır.

Çalışmamızda UV-C'nin sebep olduğu muhtemel reaktif oksijen türevlerine karşı antosiyaninin farklı üç dozunun antioksidan kapasitesini araştırdık. Antioksidan savunma sistemini dışarıdan verdiğimiz antosiyanin ile güçlendirmeye ve UV-C'nin verdiği hasara karşı verilen mücadeleyi antioksidanlar lehine çevirmeye çalıştık.

Çalışmamızda günde 4 saat UV C ışınına maruz bıraktığımız albino sıçanların serumlarındaki vitamin A, C ve E seviyelerinde meydana gelen değişimler serum ve deri MDA, GSH seviyeleri ve beyin dokusunda apoptozis incelenmiştir.

Deney ortamını her gün kontrol ederek çalışmamızla ilgili klinik gözlemleri yaptık. Kilo kayıplarını, fiziksel aktivite durumlarını, deney düzeneğindeki davranış değişimleri, çalışma sırasında meydana gelen morfolojik değişimleri, sıçanların yeme olan ilgilerini, günlük su ve yem tüketimlerini kaydederek çalışmamız oluşturdu.

Aynı ortam ve şartlarda yaşayan kontrol ve uygulama gruplarında deney sonuna kadar (40 gün) kontrol grubunda %14.38, UV grubunda %15.02, UV+2,5 grubunda %18.40, UV+5 grubunda %8.75, UV+10 grubunda %11.63 oranında ağırlık artışı olduğu görüldü (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.). Ayrıca grupların yem tüketimlerinde önemli sayılabilecek bir değişiklik görülmemiştir.

Yapılan analizler sonucunda kan serum vitamin A düzeylerinde kontrol grubuna göre UV ve UV+10 mg antosiyanin grubunda artış görülmekle birlikte bu artış istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmamıştır. Kontrol grubuna göre UV+2.5 ve UV+5 mg antosiyanin grubunda tespit edilen azalmalar da istatistik bakımdan anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) görülmemiştir. Serum vitamin A düzeylerinde Ultraviyole grubuna göre antosiyanin uygulanan gruplarda görülen değişimlerin istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmamıştır (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.).

Grupların serum vitamin C seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre uygulama gruplarında genel bir azalma görülmekle birlikte Vitamin C seviyesinde ki bu düşüş istatistiki bakımdan anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmamıştır. Ultraviyole grubuna göre kıyaslandığında antosiyanin uygulanan grupların serum vitamin C seviyelerindeki değişimler istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) görülmemiştir (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.).

Grupların serum vitamin E seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında düşüş gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmamıştır. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise antosiyanin uygulanan gruplardaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) olarak görülmemiştir (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.).



Grupların serum MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüş gözlenmiştir. UV gruplarındaki düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise antosiyanin gruplarındaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) olarak görülmemiştir (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6).

Grupların serum GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV ve UV+5 grubunda azalma ve UV+2,5 grubunda artış gözlendi fakat bu değişimler istatistiki olarak anlamsız ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki artış gözlendi ve bu artış istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarındaki değişimlerden sadece UV+10 grubundaki artış istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. (Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7).

Grupların deri MDA seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre UV, UV+2,5, UV+10 gruplarında artış UV+5 grubunda ise azalış görülmüştür bu değişimler istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmamıştır. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise UV+2,5 ve UV+5 gruplarında azalma UV+10 grubunda ise bir artma gözlenmiştir. Bu değişimlerden UV+5 grubundaki azalma istatistik olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunurken diğer değişimler istatistiki olarak anlamsız ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8).

Grupların deri GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre bütün gruplarda bir azalma görülmüştür. UV grubundaki azalma istatistiki olarak anlamsız ( $p \leq 0.05$ ) bulunurken UV+2,5, UV+5 ve UV+10 gruplarındaki azalma istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarında azalma görülmüştür. Bu azalmalardan UV+2,5 ve UV+5 grupları istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) UV+10 grubu ise istatistiki olarak anlamsız ( $p \leq 0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.9. ve Şekil 4.9).

DNA'nın yapısında oluşan mutasyonlara karşı; hücrenin kanserleşmesini önlemek için p53 geni hasar gören bu hücreyi apoptozis metabolizmasına sokarak vücudu bu hücrenin gelecekte yaratacağı potansiyel kanserleşme riskine karşı korur.

Hücrenin DNA'sı 150-200 baz çifti ve katları şeklinde parçalanır ve jel görüntülerinde fragmentasyonlar halinde görülür.

Grupların beyin apoptozis görüntülerine bakıldığında ultraviyole örneklerinde kontrol grubuna göre çok belirgin olmasada fragmentasyonlarında bir azalma gözlenmiştir. Buda ultraviyolenin p53 geninin yapısını bozduğu ve bundan dolayı apoptozisin azaldığını düşünmekteyiz. Antosiyanin gruplarından verilen antosiyaninlerin UV ile oluşan serbest radikalleri nötralize ederek bu radikallerin p53 geninin yapısının bozulmasına engel olduğu düşünmekteyim. Böylece apoptozisin UV grubuna göre daha yoğun olmasına neden olmuştur. Fragmentasyonlar en belirgin olarak N grubunda görülmüştür. Sonuç olarak N grubunda (5 mg/kg/gün antosiyanin) verilen antosiyanin UV ile oluşan serbest radikallere karşı en iyi koruma sağladığı gözlenmiştir (Şekil 4.8.).

## KAYNAKLAR

- ABDOLLAHI, M., BAHREINI-MOGHADAM, A., EMMAMI, B., FOOLADIAN, F., ZAFARIET, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336.
- ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIE, A., 2004. Pesticides and oxidative stress : a review. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
- ADLER, V., SCHAFFER, A., KIM, J., DOLAN, L., RONAI, Z., 1995. UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem*, 270(44):26071-7.
- AFAG, F., and MUKHTAR, H., 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B*. 63, 61-9.
- AFAG, F., ADHAMI, V.M., AHMAD, N., and MUKHTAR, H., 2002. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front Biosci* 7, 784-92.
- AFAG, F., MUKHTAR, H., 2002. Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 297–306.
- AKKUŞ, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*,38(5) : 1-12
- ALI, B.H., MOUSA, H.M., AND EL-MOUGY, S., 2003. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.*, 17: 56-59.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc Natl Acad Sci*, 90:7915-7922.
- ARABACI, H., ÇUKUÇAYIR, F., EKİCİ, M., ve AKSOY, B., 2003. Ultraviyole B radyasyonu. Online: <http://www.meteor.gov.tr>. 2003.
- ARAI, H., TERAJIMA, M., MIURA, M., ve ark., 1995 Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol* 38:649-652
- ARAS, K., ERŞEN, G., KARAHAN, S., 1976. *Tıbbi Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi
- AYBEY, B., TUFAN, H., ve ERGENEKON, G., 1996. Serbest Radikaller. *Türkderm*, 30: 116-122.
- BARR, P.J., TOMEİ, L.D., 1994. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technol*; 12: 487-493.
- BELLAMY, C.O.C., MALCOMSON, R.D.G., HARRİSON, D.J., WYLLİE, A.H., 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*; 6: 3-16.
- BENZER, F., OZAN, S.T., 2003. Fasciola hepaticae Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, *Turk J Vet Anim Sci*, 27: 657-661
- BERGLUND, C.M., RADESATER, A.C., PERSSON, M.A., BUDD HAEBERLEIN, S.L., 2004. UVinduced apoptosis in SH-SY5Y cells: contribution to apoptosis by JNK signaling and cytochrome c. *J Neurosci Res*, 78(4):580-9.
- BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, BM. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. May;61:882-8.

- BILALOĞLU, G. V., VE HARMANDAR, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul.
- BRUCKDORFER, K.R., 1987. Lipids and Cancer. *Procx. Roy. Soc. Med.* 80: 713-714.
- BURTON, G.W., INGOLD, K.U., 1989. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci*, 570, 7-22.
- CAMIRE, M.E., CHAOVANALIKIT, A., DOUGHERTY, M.P., and BRIGGS, J., 2002. Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. *Journal of Food Science*, 67 (1), 438-441.
- CAO, G., and PRIOR, R.L., 1999. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem.*, 45, 574-576.
- CARR, A., FREI, B., 1999. Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*, 13,1007-1024.
- CARSON, D.A., RIBEIRO, J.A., 1993. Apoptosis and disease. *Lancet*;341: 1251-1254.
- CEMEROĞLU, B., YEMENİCİOĞLU, A., ÖZKAN, M., 2001. "Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları", Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, s. 95-107.
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. 1997. Glikozaminoglikanlar. A. TOKULLUGİL, M. DİRİCAN, E. ULUKAYA. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.
- CHEN, C.C., HSU, J.D., WANG, S.F., CHIANG, H.C., YANG, M.Y., KAO, E.S., HO, Y.C. AND WANG, C.J. 2003. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterolfed rabbits. *J. Agri. Food Chem.*, 51: 5472-5477.
- CHEWONARIN, T., KINOUCI, T., KATAOKA, K., ARIMOCHI, H., KUWAHARA, T., VINITKETKUMNUEN, U., AND OHNISHI, Y., 1999. Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 591-601.
- CHO, H.S., LEE, M.H., LEE, J.W., NO, K.O., PARK, S.K., LEE, H.S., KANG, S., CHO, W.G., PARK, H.J., OH, K.W., and HONG, J.T., 2007. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 23: 155-162.
- CLYDESDALE, G.J., DANDIE, G.W., and MULLER, H.K., 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 79, 547-68.
- COLVEN, R.M., PINNELL, S.R., 1996. Topical vitamin C in aging. *Clin Dermatol*;14:227
- COMPORTI, M. 1985. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.*; 53: 599-623.
- CONROY, L.A., ALEXANDER, D.R., 1996. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia*, 10(9):1422-35.

- CROSS CE, HALLIWELL B, BORISH ET, PRYOR WA, AMES BN, SAUL RL, ET AL.,1987 Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* ;107:526-45.
- CROSS, C.E., HALLIWELL, B., BORISH, E.T., 1987. *Ann Intern Med.* 107: 526-545.
- CUMMINGS, M.C., WINTERFORD, C.M., WALKER, N.I., 1997. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 21(1):88-101.
- DAVIES, K.J.A., GOLDBERG, A.L., 1987. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*; 262: 8220-8226.
- DAVIES, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T., 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*; 27: 1151-1163.
- De GRUIJL, R.R., 2002. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl SkinPhysiol* 15, 316-20.
- DEMİRAĞ, K., UYSAL, V., 2001. "Renklendiriciler", Altuğ, T. (ed), Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir, s. 175-199.
- DENG, X., XIAO, L., LANG, W., GAO, F., RUVOLO, P., MAY, W.S., 2001. Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*, 276(26):23681-8.
- DİKİCİ, İ. 1999. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış).
- DUH, P.D., AND YEN, G.C., 1997. Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chem.*, 60:639-645.
- DUTHIE, M.S., KIMBER, I., and NORVAL, M.. 1999. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Derm* 140:995-1009.
- DÜNDAR, Y., ASLAN, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29 : 95-101.
- EINBOND, L.S., REYNERTSON, K.A., LUO, X.D., BASILE, M.J., KENNELLY, E.J., 2003. "Anthocyanin antioxidants from edible fruits", *Food Chemistry*, 84: 23-28,
- EKİCİ, M., ACAR, Y., 2003. Erişim adresi: UV- B radyasyon ve etkileri. Meteoroloji Genel Müdürlüğü Web Sitesi, <http://www.meteor.gov.tr/2003/arge/ozon/>. Erişim tarihi:2003.
- EKİCİ, M., ve ACAR, Y., 2003. UV- B radyasyon ve etkileri. Meteoroloji Genel Müdürlüğü Web Sitesi, <http://www.meteor.gov.tr/2003/arge/ozon/>.
- EL-SAADANY, S.S., SITOHY, M.Z., LABIB, S.M. AND EL-MASSRY, R.A. 1991. Biochemical Dynamics and hypocholesterolemic action of Hibiscus sabdariffa (Karkade). *Nahrung*, 35: 567-576.
- ERDEN, M., 1992. Serbest Radikaller. *Temel Klinik Tıp Bilimleri*, 12: 201-206.
- ERDOĞAN, B.B., 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.
- ERSOY, E., BAYŞU, N., ERTÜRK, K., ÜSTDAL, K.M., 1979. *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi
- ESPIN, J. C., SOLER-RIVAS, C., WICHERS, H. J., GARCIA-VIGUERA, C., 2000. "Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 1588-1592.

- FIRAT, S. 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 95s (yayınlanmamış).
- FRANCİS, F. C., 1999. "Colorants", Eagan Press, USA, p.55-66.
- FREL, B., 1994. Natural Antioxidants in Human Health and Disease, Academic Press.
- FUCHS ,J., KERN, H., 1998. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation. *Free Radic Biol Med* 25:1006-12
- GARRİSON, W.M., JAYKO, M.E., BENNET, T.W., 1962. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Rad Research*; 16: 483-502.
- GEORGIEVA , N.V., 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J. Vet. Med.*; 8: 1:11.
- GIUSTİ, M. M., WROLSTAD, R. E., 2003. "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems", *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.
- GOIHMAN-YAHR, M., 1996. Skin Aging and Photoaging: An Outlook *Clin Dermatol* 14, 153-60.
- GOULART, M., BATORE'U, M.C., RODRİGUEZ, A.S., LAİRES, A., RUEFF, J., 2005. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagen.*; 20: 311–315.
- GUTTERİDGE, J.M.C., 1995. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*; 41/12: 1819-1828.
- GÜL, Ü., 2001. Güneş ve deri. T.C. Ankara Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü Eğitim Şubesi Yayınları Yayın No: 005 Ankara S:1-16).
- HALLIWELL, B., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*. 23:1396-1397
- HALLIWELL, B., 1991. Reactive Oxygen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am. J. Med.* 91: 145-215.
- HALLIWELL, B., 1996. Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant in take in humans. *eFree Radical Res.* 25: 57-74.
- HALLIWELL, B., and ARUOMA, O.I., 1999. DNA Damage by Oxigen-Derived Species. Its Mechanisms of of Action and Measurements in Mammalian System. *FEBS Lettu.* 281: 9-19.
- HALLIWELL, B., and GUTTERIDGE, J.M.C., 1989: Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Pres; pp.177-178.
- HALLIWELL, B., CHİRİCO, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*; 57: 715-25.
- HAMMADDELER, 2009. Erişim Adresi: [http:// www.hammaddeleler.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3095&Itemid=297](http://www.hammaddeleler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=3095&Itemid=297)  
Erişim Tarihi: 16.05.2009.
- HAWK, J.I.M., 1992. Cutaneous photobiology. Chapter 21, in: Rook, Williams-Ebling, *Textbook of Dermatology*, 1992.
- HENDRY, G.A.F., VE HOUGHTON, J.D., 1996. "Natural Food Colorants", Europe Press, England.

- HIKIM , A. P. S., WANG, C., LEUNG, A.R., SWERDLOFF, S., 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136 (6): 2770-2775.)
- HOCKENBERY, D., 1995. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 146(1):16-9.
- HOWARD, H., 1990. Effects of ultraviolet radiation. *Medical clinics of North America*, March 74(2):509-514.
- HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVI, B., WILLIAMSON, G., 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, S559
- ICHIHASHI, M., FUNASAKA, Y., OHASHI, A., et al., 1999. The inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate in lecithin on melanogenesis. *Anticancer Res* 19:3769-74.
- INAGI, R., MIYARA, T., 1999. Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: "carbonyl Stress". *Blood Purif*, 17:95-98.
- ITO, T., DENG, X., CARR, B., MAY, W.S., 1997. Bcl-2 phosphorylation required for antiapoptosis function. *J Biol Chem* 272(18):11671-3.
- İŞLEKEL, H., İŞLEKEL, S., ve GÜNER, G., 2000. Biochemical Mechanism and Tissue Injury of Cerebral Ischemia and Reperfusion. *J Nuro Sci*, 17: 45-49.
- JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., 1998. *Biochem J*, 335: 85-94.
- JURKIEWICZ, B.A., BISSETT, D.L., BUETTNER, G.R., 1995. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol* 104:484.
- KAGAN, V., WITT, E., GOLDMAN, R., SCITA, G., PACKER, L., 1992. Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin. *Free Radic Res Commun* 16:51
- KAMB, A., 1994. Sun protection factor p53. *Nature*; 372: 730-731.
- KANE, A.B., 1995. Redefining cell death. *Am J Pathol*, 146(1):1-2.
- KANJILAL, S., ANANTHASWAMY, H.N., 1996. Molecular biology of skin carcinomas. In: Weber R, Miller M, Goepfert H, eds. *Basal and squamous cell skin cancers of the head and neck*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- KARADUMAN, A., 1999. Güneş Radyasyon ve Deri Üzerine Etkileri, [www.saglik.tr.net](http://www.saglik.tr.net)
- KARADUMAN, A., 1999. Solar radyasyon ve deri üzerine etkileri. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. Cilt 8 Sayı 7.
- KARADUMAN, A., 2009. Erişim adresi: Solar radyasyon ve deri üzerine etkileri. <http://saglik.tr.net/genel saglik solar radyasyon.shtml>. Erişim tarihi: 2009.
- KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B.V., 1994. Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 (8): 2013-2026.)
- KESKİN, H., (1981), *Besin Kimyası*, İstanbul.
- KOJO, S., 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Curr Med Chem*, 11, 1041-1064.
- KORNER, F.W., VOOM, J., 1978. *Vitamins*. Basel: La Roche.
- KÖSE, K., ve DOĞAN, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, 1: 340-350.

- KULMS, D., SCHWARZ, T. 2002. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6):837-41.
- LANE DP, LU X, HUPP T, HALL PA., 1994 The role of p53 in the apoptotic response. *Phil Trans R Soc Lond B*; 345: 277-280.
- LEUN, G.H.W., VANG, M.J., MAVIS, R.D., 1981. The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem Biophys Acta* 664:26-72
- LIN, W.L., HSIEH, Y.J., CHOU, F.P., WANG, C.J., CHENG, M.J., AND TSENG, T.H., 2003. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Arch. Toxicol.*, 77:42-47.
- LIU, C.L., WANG, J.M., AND CHU, C.Y., 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tertbutyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 635-641.
- LONG, C.A., BİSLSKL, H.J., 1980. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species. *J. Phys. Chem.*; 84: 555-557.
- LOPEZ-TORRES, M., THIELE, J.J., SHINDO, Y., HAN, D., PACKER, L., 1998. Topical application of Nutrition Volume 17, Number 10, 2001 843 Role of vitamins in skin care alphanatocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol* 138:207. 48.
- MADRONICH, S., and De GRUIJL, F.R., 1993. Skin cancer and UV radiation. p, 366.
- MAJNO, G., JORIS, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3-15.
- MAK, T., 2003. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant*, 9(8):483-8.
- MANOME, Y., WEICHSELBAUM, R.R., KUFEL, D.W., FINE, H.A., 1993. Effect of Bcl-2 on ionizing radiation and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced internucleosomal DNA fragmentation and cell survival in human myeloid leukemia cells. *Oncol Res*, 5(3):139-44.
- MARNETT, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.*; 424: 83–95.
- MARTİN, S.J., GREEN, D.R., COTTER, T.G., 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*; 19: 26-30.
- MASON, R.P., 1999. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential. *Cancer*. 85(10):2093-102.
- MCPHIE, D.L., COOPERSMITH, R., PERALTA, A.H., CHEN, Y., IVINS, K.J., MANLY, S.P., KOZLOWSKI, M.R., NEVE, K.A., NEVE, R.L., 2003. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 23 (17): 6914–6927.
- MILLS, E.M., TAKEDA, K., YU, Z.X., 1998. *Biol Chem*, 273: 22165-8.
- MİYATA, T., VAN-YPERSELE, D.E., STRİHOV, C., KUROKAWA, K., et al., 1999. Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications. *Kidney Int*, 55,388-399.



- MURAD, S., GROVE, D., LINDBERG, K.A., et al, 1981 Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*;78:2879
- MUTLU, B., TOROS, H., ve ŞEN, O., 2003. Ultraviyole radyasyonunun insan sağlığı üzerine etkileri. III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu, 19-21 Mart, İTÜ, İstanbul.
- MÜFTÜOĞLU, O., 2003. Yaşasın Hayat. Doğan Kitapçılık, İstanbul.
- ODIGIE, I.P., ETTARH, R.R., AND ADIGUN, S.A., 2003. Chronic administration of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, 86: 181-185.
- OLSON, R.L., EVERETT, M.A., 1975. Epidermal apoptosis: cell deletion by phagocytosis. *J Cutan Pathol*; 2: 53-57.)
- OLTVAÍ ZN, KORSMEYER SJ., 1994 Checkpoints on dueling dimers foil death wishes. *Cell* ; 79: 189-192.
- ONAT ve ark., 2004- KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 7(1).
- ONYENEKWE, P.C., AJANI, E.O., AMEH, D.A., AND GAMANIEL, K.S., 1999. Antihypertensive effect of roselle (Hibiscus sabdariffa) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochem. Funct.*, 17: 199-206.
- ORTHOMOLECULAR, 2009. Erişim Aresi: [http:// orthomolecular.org/ library/ ivccancerpt.shtml](http://orthomolecular.org/library/ivccancerpt.shtml), Ron Hunninghake, Intravenous Vitamin C And Cancer Erişim Tarihi: 16.05.2009.
- PARK, J., KIM, I., OH, Y.J., LEE, K., HAN, P.L., CHOI, E.J., 1997. Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2. *J Biol Chem*, 272(27):16725-8.
- PERRY, J.M., 1980. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 334-360.).
- PHILLIPS, C.L., COMBS, S.B., PINNELL, S.R., 1994. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103:228.
- PROSERPIO, J., VE MALPEDE, D.L., 1995. Alverio. *Cosmet. News*, 18(101):99-102 (Ital)., Ref.C. A. 123, 321662w.
- PRYOR, W.A., 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trial. *Free Rad Biol Med*, 28,141–164.
- REPETTO, M.G., REIDES, C.G., EVELSON, P., ve ark., 1999. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *European J. Clinical Invest* 29:643-649. –
- RIBAYA-MERCADO, D., GARMYN, M., GILCHREST, B.A., RUSSELL, R.M., 1995. Skin lycopene is destroyed preferentially over beta-carotene during ultraviolet irradiation in humans. *J Nutr*;125:1854-59.
- RIBEIRO, J.M., CARSON, D.A., 1993. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease from human-spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*, 32(35):9129-36.
- ROBERT, B., 1997. The Merck Manual of Medical Information, U.S., p.985-988.
- SAİJA, A., 1994. *Essenze Deriv. Agrum.*, 62(1):74-81 (Eng)., Ref. C.A. 123,25219z.
- SALDAMLİ, İ., VE SAĞLAM, F., 1998. “Fenolik Bileşikler ve Renk Maddeleri”, Saldamlı, İ. (ed), Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, s. 434-449.

- SALIM, A.S., 1993. The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. 53: 1031-1035.
- SCHNEIDER, L.A., DISSEMOND, J., BRENNEISEN, P., et al., 2006. Adaptive cellular protection against UVA-1-induced lipid peroxidation in human dermal fibroblasts shows donor-to-donor variability and is glutathione dependent. *Arch Dermatol Res* 297:324-8.
- SCHUESSLER, H., SCHILLING, K., 1984. Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol.*; 45: 267-281.
- SERRAINO, I., DUGO, L., DUGO, P., MONDELLO, L., MAZZON, E., DUGO, G., CAPUTI, P.A., 2003. Protective Effects of Cyanidin-3-O-glucoside From Blackberry Extract Against Peroxynitrite-Induced Endothelial Dysfunction and Vascular Failure. *Life Sciences* 73, 1097-1114.
- SETLOW, R.B., GRIST, E., THOMPSON, K., and WOODHEAD, A.D., 1993. Wavelengths effective in induction of Malignant Melanoma. *Proc Natl Acad Sci.*, 90: 6666-6670
- SHACTER, E., 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*; 319: 428-436.
- SHACTER, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*; 32: 307-326.
- SHINDO, Y., WITT, E., HAN, D., EPSTEIN, W., PACKER, L., 1994. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102:122-4
- SKOLNICK, A., 1991. Is ozone loss to blame for melanoma upsurge?, *JAMA*, June 26.
- STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*; 25: 207-218.
- STADTMAN, E.R., 1988. Protein modification in aging. *J Gerontol*; 43: 112-120.
- STAHL, W., HEINRICH, U., JUNGSMANN, H., SIES, H., TRONNIER, H., 2000. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr* 71:795-8.
- STAMPFER, M. J., RIMM, E.B., 1995. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1365-1369.
- STOLARSKI, E., 1988. "The Antarctic ozone hole", *Sci. Amer.*, 258: 1, 20-27
- SUBOH, S.M., BILTO, Y.Y., AND ABURJAI, T.A., 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phyther. Res.*, 18: 280-284.
- SVOBODOVÁ, A., PSOTOVÁ, J., and WALTEROVÁ, D., 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. a review. *Biomed. Papers* 147(2), 137-145.
- SWALLOW, A.J., 1960. Radiation chemistry of organic compounds. New York, John Wiley & Sons,; 211-224.
- SYMONDS, H., KRALL, L., REMINGTON, L., SAENZ-ROBLES, M., LOWE, S., JACKS, T., et al. 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*; 78: 703-711.
- SZENT-GYORGYI, A., 1928. Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem J* 22:1387.

- TAMER, L., POLAT, G., ESKANDARI, G., ERCAN, B., ve ATİK, U., 2000. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi, 1: 52-58.
- TAMURA, H., VE YAMAGAMI, A.J., 1994. J. Agric. Food Chem., 42(8):1612-1615 (Eng)., Ref. C. A. 121, 106979h.
- TEBBE, B., 2001. Relevance of oral supplementation with antioxidant for prevention and Treatment of Skin Disorders. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology 14: 296-302.
- THIELE, J.J., TRABER, M.G., PACKER, L., 1998. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. J Invest Dermatol 110:756
- THOMAS, C.E., AUST, S.D., 1986. Free radicals and environmental toxins. Ann. Emerg Med.; 15: 1075-83.
- TORUN M, YARDIM S, GÖNENÇ A, SARGIN H. Çeşitli kanser vakalarında serum MDA düzeyleri. Biyokimya dergisi 1995;20:1-7.
- TRAUTINGER, F., 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. Clin Exp Dermatol 26, 573-7.
- TREVITHICK, J.R., XIONG, H., LEE, S., et al., 1992. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. Arch Biochem Biophys 296:575.
- TSAI, P.J., MCINTOSH, J., PEARCE, P., CAMDEN, B., JORDAN, B.R., 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Res. Int., 35: 351-356.
- TSENG, T.H., HSU, J.D., LO, M.H., CHU, C.Y., CHOU, F.P., HUANG, C.L., AND WANG, C.J., 1998. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. Cancer Lett., 126:199-207.
- TSENG, T.H., KAO, C.Y., CHU, C.Y., CHOU, F.P., LIN WU, H.W., AND WANG, C.J., 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. Food Chem. Toxicol., 35: 1159-1164.
- TSENG, T.H., KAO, T.W., CHU, C.Y., CHOU, F.P., LIN, W.L., AND WANG, C.J., 2000. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. Biochem. Pharmacol., 60: 307-315.
- TSENG, T.H., WANG, C.J., KAO, E.S., AND CHU, H.Y., 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. Chem. Biol. Interact., 101: 137-148.
- TUĞLACI, P., 1973. The Medical Dictionary, Ankara.
- UYSAL, M., 1998. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengesi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, 11: 336-341.
- VEGA, F.A., RAMUS, M.T., FERNANDEZ, M., SANTESTEBAN, M., VE GALAR, A., 1987. Cienc. Ind.Farm., 6(4):205-208 (Span)., Ref. C. A. 107, 70111p.
- VURAL, P., CANBAZ, M., SELCUK, İ.D., 1999. Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol 13:96-101
- WANG, C.J., WANG, J.M., LIN, W.L., CHU, C.Y., CHOU, F.P., AND TSENG, T.H., 2000. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl

- hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 38: 411-416.
- WEEDON, D., SEARLE, J., KERR, J.F.R., 1979. Apoptosis: its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol*; 1: 133-144.
- WHO, 1979. Ultraviolet radiation environmental health criteria, 14, Geneva.
- WHO, 1994. Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation, Geneva.
- WIKIPEDIA, 2009. Erişim Adresi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Beta-carotene-2D-skeletal.png> Erişim Tarihi: 16.05 2009.
- WINTROBE, M., and THORN, G., 1976. *Harrisons's Priciples of Internal Medicine*. Menteř Kitapevi, p.385.
- WINTROBE, M., THORN, G., 1976. *Harrison's Priciples of İnternal Medicine*. Menteř Kitabevi , p.385
- WROLSTAD, R. E., 2000. "Anthocyanins", Lauro, G. J. and Francis, F. J. (eds), *Natural Food Colorants*, Marcel Dekker Inc., USA, p. 237-252.
- WROLSTAD, R.E., 1976. *Color and Pigment Analyses in Fruit Products*. Oregon Agric. Expt. Stn. Bull. 624, Corvallis, OR.
- WYLLIE, A.H., ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WALKER, S.W., EVAN, G., 1992. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*, 4(6):389-97.
- YANBEYİ, S. 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış).
- YAMAGUCHI, M., VE HONDA, T., 1994. *Kokai Tokkyo Koho JP.*, 18(101):99-102 (Jpn)., Ref.C.A. 107, 12958j.
- YEL, M. ve GÜVEN, T., 1990. "Ultraviyole ışığıının Spalax leucodon epidermisi üzerindeki etkileri", X.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji Bildirileri, Erzurum.
- ZIGMAN, S., 1993. Ocular light damage. *Photochem Photobiol*, 57(6): 1060-1068
- ZİEGLER, A., JONASON, A.S., LEFELL, D.J., SİMON, J.A., SHARMA, H.W., KİMMELMAN, J., et al. 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*; 372: 773-776.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Hatay'ın Samandağ ilçesinde doğdum. İlköğretim ve lise Eğitimimi aynı ilçede tamamladıktan sonra 2003 yılında Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne kaydoldum ve 2007 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2007 yılında Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2008-2010 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım. Evliyim ve bir çocuk babasıyım.

## **EKLER**



Resim: 1 UV-C Lambası ve Aparatı.



Resim: 2 UV-C uygulama kabini.



Resim: 3 Deneysel hayvanların deney öncesi ortama adaptasyon süreçleri.



Resim: 4 Deneysel hayvanların deney öncesi ortama adaptasyon süreçleri.





Resim: 5 Deney hayvanlarının sırt bölgesinin belli bir kısmının tıraşlanmış hali.



Resim: 6 Deney hayvanlarının UV-C 'e maruz bırakılması.



Resim: 7 Deney hayvanlarının UV-C 'ye maruz bırakılması ve uygulama esnasında ratların göstermiş olduğu davranışlar.



Resim: 8 Liyofilize cihazı ile HSE'nin hazırlanışı.



Resim: 9 HSE'nin hazırlanışı.



Resim: 10 Deney hayvanlarına ekstraktın verilmesi.



Resim:11 Deney hayvanlarına ekstraktın verilmesi.



Resim: 12 Hibiscus sabdariffa kaliksleri.



Resim: 13 UV-C uygulaması sonucu deney hayvanlarında meydana gelen deri deformasyonları .



Resim: 14 UV-C uygulaması sonucu deney hayvanlarında meydana gelen deri deformasyonları .



Resim: 15 UV-C uygulaması sonucu deney hayvanlarında meydana gelen deri deformasyonları .



Resim: 16 UV-C uygulaması sonucu deney hayvanlarında meydana gelen deri deformasyonları.

## ÖZET

Ultraviyole radyasyonu, tüm hayatımız boyunca devamlı olarak maruz kaldığımız bir tür görünmez iyonize olmayan radyasyon şeklidir. Ultraviyole radyasyonu dalgaboylarına göre 200-290 nm arası UV-C, 290-320 nm arası UV-B, 320-400 nm arası UV-A, olarak sınıflandırılır. UV-A ve UV-B yeryüzüne ulaşabilirken UV-C ise son yıllarda ozon tabakasının çeşitli nedenlerden dolayı incilmesi yada delinmesi sonucu artık yeryüzüne ulaşabilmektedir. UV-C en kısa dalga boyuna sahiptir ve en zararlı olmasının yanında ayrıca karsinogenik ve germisittir.

UV ışınları derimize çarptığında serbest radikaller üretilir. Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser oluşumlarını engelleyen moleküllerdir. Çalışmamızda antioksidan olarak *Hibiscus sp.* bikişi kalikslerinden elde edilen antosiyaninin üç farklı dozu kullanılmıştır.

Çalışmada Fırat üniversitesi deney hayvanları üretim merkezinden getirilen ve ortalama ağırlıkları 250-300 gram olan erkek sıçanlar kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar standart rat yemi ile beslendi, su ise adaptasyon süreci boyunca ve bölümde yapılan daha önceki çalışmalarda deney hayvanlarının (n=6+1) günlük su tüketimleri temel alınarak günlük 350 ml su serbest olarak verildi. Kontrol ve UV grubuna sadece su verilirken diğer üç gruba 350 ml su+ sırasıyla 2.5 mg, 5 mg, 10 mg Antosiyanin içeren Hibiskus (*Hibiscus sabdariffa*) ekstraktı eklenerek verildi. Sıçanlar çalışma öncesi, 20 gün yeni kafeslerindeki ortama adapte olmaları sağlandı. Havalandırma tertibatı bulunan, sıcaklığı 22 °C'de sabit tutulmaya çalışılan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanacak şekilde deney ortamı oluşturuldu. Kontrol grubu 6 diğer guruplar ise 7 sıçan olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla; 1. grup: Kontrol (K), 2. grup: 40 gün boyunca günde 4 saat UV-C ışığı uygulanan hasta (UV) grubu; 3. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 2.5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup (A); 4. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı uygulanan ve içme sularına 5 mg/kg/gün antosiyanin verilen grup (N); 5. grup: 40 gün boyunca 4 saat UV-C ışığı

uygulanan ve içme sularına 10mg/kg/gün antosiyanin verilen grup (T) olmak üzere düzenlendi.

Deney hayvanları hafif anestezi altında traş makinası ile sırt bölgelerinde yaklaşık 15cm<sup>2</sup>'lik bölge traş edildi. Tıraşlama işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce ve çalışmanın 20. gününde olmak üzere çalışma boyunca iki kez traş edildi. Uygulama gruplarının yanında kontrol grubu da olası standart sapmayı bertaraf etmek için aynı muameleye maruz bırakılmıştır.

Sıçanlar, ebatları 80x80x100 cm olan teraryumun içerisine UV, bölmelere konularak yetiştirilmiştir Teraryumun kapağına hayvanlardan 50 cm uzaklıkta 90 cm uzunluğunda gücü 30 Watt olan "Mazda TG" ultraviyole lambası yerleştirilmiş ve hayvanlar bu kaynaktan yayılan UV ile 40 gün süre ile ışınlanmıştır. Böylece UV-C'nin oluşturacağı serbest radikallere karşı antosiyaninin koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Sıçanlar UV-C uygulamasından hemen sonra eter ile anestezi edilerek sakrifiye edildi. Abdomen ve toraks kesilerek açıldıktan sonra kalpten kan alındı. Alınan kanın bir kısmı 3000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıştırıldı. Bunun yanında deri ve beyin dokuları alındı. Elde edilen serumda GSH, MDA, Vit-A, Vit-C, Vit-E seviyelerine; Deride GSH, MDA seviyelerine ve Beyin dokusunda apoptozise bakılmıştır.

Oluşturduğumuz kontrol grubunda (K) deney sonuna kadar %14.38, UV grubunda (UV) %15.02, UV+2.5mg antosiyanin grubunda (A) %18.40, UV+5mg antosiyanin grubunda (N) %8.75, UV+10mg antosiyanin grubunda (T) ise %11.63 oranında bir ağırlık artışı kaydedildi.

Kontrol grubu serum vitamin A seviyesi (µg/dl) 124.14 ölçülürken, UV grubu 137.37, grup A 117.71 grup N 119.95, grup T 140.39 olarak ölçüldü. Kan serum vitamin A düzeylerinde kontrol grubuna göre UV ve T grubunda artış görülmekle birlikte bu istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubuna göre A ve N grubunda tespit edilen azalmalar



da istatistiki bakımdan anlamlı görülmemiştir. Serum vitamin A düzeylerinde ultraviyole grubuna göre antosiyanin uygulanan gruplarda görülen değişimlerin istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır

Kontrol grubu serum vitamin C seviyesi (mg/dl) 0.101 ölçülürken, UV grubu 0.096, grup A 0.094 grup N 0.094, grup T 0.101 olarak ölçüldü. Grupların vitamin C seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre uygulama gruplarında genel bir azalma görülmekle birlikte vitamin C seviyesinde ki bu düşüş istatistiki bakımdan anlamlı bulunmamıştır. Ultraviyole grubuna göre kıyaslandığında antosiyanin uygulanan grupların serum vitamin C seviyelerindeki değişimler istatistiki olarak anlamlı görülmemiştir.

Kontrol grubu serum vitamin E seviyesi (mg/dl) 3.893 ölçülürken, UV grubu 3.861, grup A 3.851 grup N 3.105, grup T 3.650 olarak ölçüldü. Grupların serum vitamin E seviyelerindeki değişimler incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında düşüş gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise Antosiyanin uygulanan gruplardaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı olarak görülmemiştir.

Kontrol grubu serum MDA (nmol MDA/ml) seviyesi 2.89 ölçülürken, UV grubu 2.38, grup A 2.75, grup N 2.54, grup T 2.24 olarak ölçüldü. Kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüş gözlenmiştir. UV gruplarındaki düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca UV+10 grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise antosiyanin gruplarındaki değişimlerde istatistiki açıdan anlamlı olarak görülmemiştir.

Kontrol grubu serum GSH (nmol GSH/ml) seviyesi 125.11 ölçülürken, UV grubu 121.28, grup A 126.86, grup N 109.10, grup T 144.75 olarak ölçüldü. Kontrol grubuna göre UV ve N grubunda azalma ve A grubunda artış gözlendi fakat bu değişimler istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Ayrıca T grubundaki artış gözlendi ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarındaki değişimlerden sadece T grubundaki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Kontrol grubu deri MDA (nmol MDA/ml) seviyesi 0.93 ölçülürken, UV grubu 1.08, grup A 1.04, grup N 0.81, grup T 1.13 olarak ölçüldü. Kontrol grubuna göre UV, A, T gruplarında artış N grubunda ise azalış görülmüştür bu değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında ise A ve N gruplarında azalma T grubunda ise bir artma gözlenmiştir. Bu değişimlerden N grubundaki azalma istatistik olarak anlamlı bulunurken diğer değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kontrol grubu deri GSH (nmol GSH/ml) seviyesi 186.65 ölçülürken, UV grubu 154.95, grup A 109.36, grup N 102.11, grup T 119.91 olarak ölçüldü. Kontrol grubuna göre bütün gruplarda bir azalma görülmüştür. UV grubundaki azalma istatistiki olarak anlamsız bulunurken A, N ve T gruplarındaki azalma istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. UV grubuna göre kıyaslama yapıldığında antosiyanin gruplarında azalma görülmüştür. Bu azalmalardan A ve N grupları istatistiki olarak anlamlı, T grubu ise istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

## SUMMARY

Ultraviolet radiation is a kind of invisible and unionized radiation which we expose during our life. Ultraviolet radiation classified according to its wavelength, such as between 200-290nm is UV-C, between 290-320 nm is UV-B, between 320-400 nm is UV-A. While UV-A and UV-B can reach the earth in recent years, UV-C can also reach the earth because of depletion of ozone layer or perforamation. Addition to being the most harmful, UV-C has the shortest wavelength and also carcinogenic and germicide.

When UV rays hits our skin, free radicals are produced. Free radicals are molecules which attach to somatic cells and immune system. Antioxidants neutralize the effect of free radicals and they also prevent from cancer reactions. In our study as an antioxidants three different dose of anthocyanin were used which was obtained by Hibiscus sp plant calyx.

In our study male rats were used whose average weight is 250 to 300 gr and they obtained from Central Animal House Facility of Fırat Universty Elazığ, Turkey. Experimental rats are fed by standard pellet feed. During adaptation time 350 ml water was given to rats and that amount was determined according to (n=6+1) daily water consumption by helping of recent study. While only water was given to control and UV group, other three group took 350 ml water +2,5 mg, 5 mg, 10 mg anthocyanin containing Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) extract.

Before the experiment, rats stayed 30 days in their cage for adaptation. In our experimental area, there was ventilation system and the temperature was kept constant around 22 °C. Furthermore 12 hours light/dark cycle in the experiment enviroment was created. For experiment we formed 5 groups in which control have 6 rats and other groups have 7 rats. These were grouped like that: first group control (K), second group (UV): rats treated with UV-C 40 days, 4 hours for per day. Third group (A): treated with UV-C 40 days 4 hours for per day and 2,5 mg/kg/day anthocyanin was added to their drinking water, fourth group(N): treated with UV-C 40 days 4 hours for per day and 5 mg/kg/day anthocyanin was added to their drinking

water, fifth group(T): treated with UV-C 40 days, 4 hours for per day and 10 mg/kg/day anthocyanin was added to their drinking water.

Rats' 15cm<sup>2</sup> back area was shaved with shave machine under little anesthesia. During the experiment period we shaved the rats two times. First shave was before the one day beginning to study and second was in twentieth day. Beside experimental groups control groups was also shaved to minimize standard division.

Rats were placed in tetarium(80X80X100 cm) and they grow up here. There was ultraviolet lamp (MAZDA TG, 30 watt) on the teratum cover, and that lamp was 90 cm in length. We put the lamp 50 cm distance from rats and during the 40 days rats exposed UV. In the end of that study we researched that while UV-C producing free radicals how can anthocyanin protect from that damage.

Rats were scarified immediately after ether Anastasia. After abdomen and thorax were cut, blood was taken from heart. A portion of blood was taken and centrifuged at 300 rpm, 15 minutes, so serum was separated. Brain and skin tissue were also taken. In serum we made such analyses GSH, MDH and we also looked vit-A, vit-C and vit-E level. In skin GSH, MDA analyses were made and we also examine apoptosis.

In our experiment we observed weight increase like that control group (K) %14,38, UV group (UV) %15,02, UV+2,5 anthocyanin group(A) %18,40, UV+5mg anthocyanin group (N) % 8,75, UV+10mg anthocyanin group(T) % 11,63.

Vitamin A level ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) results like that: control group (K) 124,14, UV group (UV) 137,37, group A 117,71, group N119,95, group T 140,39. According to control group, vitamin A level in serum was increased in UV and T group but that is meaningless statistically. In addition to this there was an decrease in A and N group but that is meaningless too. At the end when we compare ultraviolet group with anthocyanin added group there is not a significant changing in serum vitamin A level.

Vitamin C level (mg/dl) was like that, control group 0,101, UV group 0,096, group A 0,094, group N 0,094, group T 0,101.when we compare experimental group

with control group, there is a decrease in vitamin C level but that is not meaningful statically. When we compare serum vitamin C level in anthocyanin given group, that is not significant according to ultraviolet group.

We also measured vitamin E level and results are that : control group 3,893, UV group 3,861, group A 3,851, group N 3,105, group T 3,650. when we look at vitamin E level changing that is not statically significant, when they were compared with control group. When we observe our result, anthocyanin given group results is not meaningless when these results compare with UV group.

In MDA results, control group 2,89, UV group 2,38, group A 2,75 , group N 2,54, group T 2,24. There is a decrease in experimental group. Decrease in UV groups is a good result for that study. In addition to this, decrease in UV+10 group is statically significant. However, result of anthocyanin given group is not meaningless when it compared with UV group.

When we look at GSH level, control group 125,11, UV group 121,28, group A 126,86 , group 109,10, group T 144,75. When these results compared with control groups, there is a decrease in N group. But these results are not meaningless. Furthermore when we compared these results according to UV group, there is an decrease in group A and N but there is an increase in T group.

We also look at skin MDA results. Results are like that control group 0,93 UV group 1,08 group A 1,04 group N 0,81 group T 1,13. According to control group, there is increase in UV, A, T group and decrease in N group. These results are not significant for us. When our results compared with UV group, there is decrease in A and N groups and increase in T group was observed. According to our results decrease in N group is significant but other are meaningless statically.

Lastly we examine GSH level in skin and our results were like that: control group 186,65, UV group 154,95, group A 109,36, group N 102,11, group T 119,91. There was a decrease in all groups when they compare with control group is not significant but decrease in A,N and T is significant. When UV group compared with anthocyanin group, decrease was seen. Between these decrease A and N statically meaningful and T groups meaningless.