

**ÇEŞİTLİ ULTRAVİYOLE KORUYUCU MADDELERİN
GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
SAĞLIKLI HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SAPTANMASI**

DUYGU SEVİNÇ



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ ULTRAVİYOLE KORUYUCU MADDELERİN GENOTOKSİK VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
SAPTANMASI**

Duygu SEVİNÇ

Doç. Dr. NİLÜFER ÇİNKİLİÇ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2014

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Duygu SEVİNÇ tarafından hazırlanan ‘çeşitli ultraviyole koruyucu maddelerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin sağlıklı hücre kültüründe saptanması’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Başkan: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Rahmiye AYDIN
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
13.05.2014

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

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

21.04.2014

Duygu SEVİNÇ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ ULTRAVİYOLE KORUYUCU MADDELERİN GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SAPTANMASI

Duygu SEVİNÇ

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Yapılan bu çalışmada güneş kremlerinde bulunan avobenzon ve oktokrilen UV koruyucularının CCD-1094Sk insan sağlıklı deri fibroblast hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri XTT formazan boyama ve tek hücre jel elektroforez (Komet) testi ile araştırılmıştır.

Tez çalışmasında avobenzonun ve oktokrilenin sağlıklı hücre hattı üzerinde tek başlarına oluşturdukları sitotoksik etkiyi belirlemek için XTT testi uygulanmıştır. Sağlıklı insan deri fibroblastları (SF); 32 ile 800 µM arasında değişen dozlarda avobenzon ve 130 ile 6500 µM arasında değişen dozlarda oktokrilen UV koruyucularına maruz bırakılmış ve hücrelerin canlılık eğrileri hazırlanmıştır. Uygulanan test sonucunda avobenzonun IC50 dozu 100,2 µM, oktokrilenin IC50 dozu 1390,95 µM olarak belirlendi. Bulunan IC50 sonuçlarına dayanarak genotoksisite testinde kullanılacak avobenzon ve oktokrilenin IC50, IC25 VE IC12,5 olmak üzere üç farklı dozu seçilmiştir.

Genotoksik etkileri belirlemek amacıyla kullanılan komet testi sonucunda avobenzonun iki yüksek dozunda DNA hasar oranını anlamlı arttırdığı, oktokrilenin de kullanılan üç dozunda da DNA hasar oranını arttırdığı ve avobenzon ile oktokrilenin kombinlenmesi durumunda tek başlarına oluşturduklarına kıyasla anlamlı oranda DNA hasarı oluşturdukları saptanmıştır.

Sonuç olarak avobenzon ve oktokrilenin güneş koruyuculardaki güvenli kullanımını sağlayabilmek için bu kimyasalların insandaki etkilerinin daha ileri in vivo ve in vitro genotoksisite test yöntemleri ile değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: UV, Avobenzon, Oktokrilen, Komet, Sitotoksisite, Genotoksisite, CCD-1094Sk deri fibroblast hücreleri.

2014, ix + 87 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF SOME SUNSCREEN COMPOUNDS ON HEALTHY CELL CULTURE

Duygu SEVİNÇ

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

This study investigated the cytotoxic and genotoxic effects of avobenzone and octocrylene in sunscreen formulations alone or in combination on CCD-1094Sk human healthy skin fibroblast cells using XTT formazan dye and single cell gel electrophoresis (Comet) assay.

In this thesis; the XTT test was performed to determine the cytotoxic effect of avobenzone and octocrylene. For cytotoxicity assays, CCD-1094Sk human healthy skin fibroblast cells (SF) exposed to several doses of avobenzone (32 to 800 μ M) and octocrylene (130 to 6500 μ M) and survival curves were prepared. IC₅₀ dose of avobenzone was found as 100.2 μ M and octocrylene was found as 1390.95 μ M with XTT assay. According to results of XTT assay, IC₅₀, IC₂₅ and IC_{12,5} doses of avobenzone and octocrylene used in genotoxicity testing.

We found the genotoxic effects in the comet assay at the two higher doses of avobenzone and the three doses of octocrylene. They both increased the rate of DNA damage significantly compared with control groups. Avobenzon plus octocrylene combination treatment increased the level of DNA damage when compared with single avobenzone or octocrylene treatments in comet assay.

In conclusion UVA filter avobenzon and UVB filter octocrylene are widely used in sunscreen formulations however their possible cytotoxic and genotoxic effects on human should be determine further in vivo and in vitro genotoxicity test methods.

Key Words: UV, Avobenzone, Octocrylene, Comet, Cytotoxicity, Genotoxicity, CCD-1094Sk skin fibroblasts cells.

2014, ix + 87 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, tez çalışmam süresince göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve rehberliğinden dolayı değerli hocam, Sayın **Doç. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ**'a,

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

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, desteğini hep hissettiren, çalışmaktan zevk aldığı sevgili hocalarım, Arş. Gör. Dr. Özgür **VATAN** ve Arş. Gör. Dr. Dilek **YILMAZ**'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve desteğinden dolayı Özgün **TEKSOY**, ve Mümin **COŞKUN**'a,

Yüksek lisans çalışmaları boyunca yanımda olan ve birlikte eğitim gördüğüm Ersin **KOCAOĞLU**'na ve diğer arkadaşlarıma,

Eğitimim boyunca maddi ve manevi her türlü desteği veren, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum aileme ve özellikle de tüm bu zahmetli süreç boyunca her türlü sabırla bana yardımcı olan ve moral-motivasyonumu arttıran sevgili eşim Emin **SEVİNÇ**'e

En içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Duygu SEVİNÇ
21.04.2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ivi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Radyasyon nedir?.....	3
2.1.1. İyonlaştırıcı Radyasyon.....	4
2.1.2. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon türleri.....	4
2.1.2.1. Morötesi (Ultraviyole Radyasyon).....	5
2.2. UV'nin insan sağlığına etkisi.....	7
2.2.1. UV'nin ani etkileri.....	9
2.2.2. UV'nin geç (kronik) etkileri.....	11
2.3. UV ile indüklenen DNA hasarları.....	13
2.4. UV kaynaklı DNA hasarı onarım mekanizmaları.....	14
2.4.1. Doğrudan Tamir.....	15
2.4.2. Eksizyon Onarımı.....	15
2.4.2.1. Baz Eksizyon Onarımı (BER).....	16
2.4.2.2. Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER).....	18
2.5. UV Koruyucular.....	23
2.5.1. Doğal Koruyucular.....	23
2.5.1.1. Fenolik Bileşikler.....	23
2.5.1.2. Belirlenmiş UV Koruyucu Fenolikler.....	24
2.5.2. Kimyasal Koruyucular.....	29
2.5.2.1. İnorganik UV filtreleri.....	34
2.5.2.2. Organik UV filtreleri.....	35
2.6. SPF Belirleme.....	40
2.7. Toksisite testleri.....	44
2.7.1. Sitotoksisite Testi.....	44
2.7.2. Genotoksisite testi.....	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler.....	48
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
3.2.1. Besiyeri hazırlanması.....	51
3.2.2. Hidrojenperoksit (H ₂ O ₂) hazırlanması.....	51
3.2.3. XTT testi.....	52
3.2.4. Komet testi.....	52
3.3. Çalışma Planı.....	53
3.3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı ve Pasajlanması.....	53
3.3.2. Çalışmada kullanılan UVA ve UVB filtrelerinin özellikleri ve hazırlanışı.....	54

3.3.3.	Çalışmada kullanılan kontrol ve doz grupları.....	55
3.3.4.	XTT testi.....	56
3.3.5.	Komet testi.....	57
4.	BULGULAR.....	59
4.1.	XTT test bulguları.....	59
4.2.	Komet testi bulguları.....	60
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
	KAYNAKLAR.....	78
	ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
CCD-1094Sk	İnsan Sağlıklı Deri Fibroblast Hücresi
SF	Skin Fibroblast
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IC50	%50 'lik inhibitör konsantrasyonu
LMA	Düşük yoğunluklu agaroz
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROT	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi (Komet)
XTT	(2,3 Bis-[2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
UV	Ultraviyole ışık
LH	Langerhans hücre
CPDs	Siklobütan pirimidin dimerleri
FAD	Flavin adenine dinucleotide
BER	Baz Eksizyon Tamiri
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
AP Liyaz	DNA- (apürinik ve apirimidik bölge) liyaz
BMDM	Butil Metoksi Dibenzoil Metan (Avobenzon, Parsol® 1789)
OCT	Oktokriken (2-etilheksil-2-siyano-3, 3diphenylacrylate)
TCR	Transkripsiyona Bağlı Onarım
GGR	Global Genomik Onarım
RFC	DNA Replikasyon Faktörü C
PCNA	Prolifere Edici Hücre Nükleer Antijeni
XP	Xeroderma pigmentosum
CS	Cockayne syndrome
TTD	Trichothiodystrophy
N	Azot

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
LA	Linoleik Asit
SIRC	Fare Korneal Hücrelerinde
HaCaT	İnsan Keratinosit Hücrelerini
Mexoryl SX	Terephtalylidene Dikamfor Sülfonik Asit (Ekamsul)
TiO ₂	Titanyum Dioksit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
ZnO	Çinko oksit
EMC	2-etil p-metoksisinamat
DTS	Drometrizol Trisiloksan
DPDT	Disodyum Fenil Dibenzimidazol Tetra Sülfanat
DHHB	Dietilamino Hidroksi Benzoil Hegzil Benzoat
MBBT	Metilen Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenol
BEMT	Bis-Etilheksiloksifenol Metoksifenil Triazin
SPF	Güneş Koruma Faktörü
BSA	Sığır Serum Albümini
MED	Minimal Eritem Dozu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Radyasyonun çeşitleri.....	3
Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrumda UV radyasyon bölgesi ve bu bölgenin dalga boylarına göre sınıflandırılması.....	5
Şekil 2. 3. Ultraviyole radyasyon bileşenleri ve ozon.....	6
Şekil 2.4. İnsan derisinin yapısı.....	10
Şekil 2.5. Yaygın kanser tipleri.....	12
Şekil 2.6. Siklobütan pirimidin fotodimeri ve 6-4 fotoürün oluşturması.....	14
Şekil 2.7. Fotoreaktivasyon.....	15
Şekil 2.8. Urasil DNA N-glikozilazın aktivitesi.....	17
Şekil 2.9. DNA N-glikozilazların AP liyaz aktivitesi.....	18
Şekil 2.10. Nükleotid Eksizyon Onarımı.....	19
Şekil 2.11. NER'in iki alt yolağı.....	20
Şekil 2.12. NER mekanizmasının işleyişi.....	21
Şekil 2.13. XP, CS ve TTD sendromlarının oluşumu.....	22
Şekil 2.14. Kumarik asidin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.15. Rosmarinik asit kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.16. Siyah çayın ana polifenol kimyasal yapıları.Fenolik gruplar antioksidan potansiyeli sağlar. R =galloyl grubu.....	28
Şekil 2.17. Avobenzonun ışık ile bozulmuş ürün oluşturması.....	37
Şekil 2.18. Oktokrilen avobenzon ve ekamsulun in vitro metadolojisine dayanan spektrofotometrik koruma eğrileri.....	38
Şekil 2.19. Parsolün emme göstermesi.....	38
Şekil 2.20. Oktokrilenin emme göstermesi.....	39
Şekil 2.21. Parsol ve oktokrilenin birlikte emme göstermesi.....	39
Şekil 2.22. XTT tetrazolium tuzunun turuncu renkli formazan ürününe indirgenmesi.....	44
Şekil 2.23. XTT testi aşamaları.....	45
Şekil 2.24. Komet analiz çalışmaları.....	47
Şekil 3.1. Avobenzonun kimyasal yapısı.....	54
Şekil 3.2. Oktokrilenin kimyasal yapısı.....	54
Şekil 4.1. Avobenzonun XTT test sonucu belirlenen % canlılık grafiği.....	59
Şekil 4.2. Oktokrilenin XTT test sonucu belirlenen % canlılık grafiği.....	60
Şekil 4.3. Komet testinden elde edilen mikroskopik görüntüler.....	61
Şekil 4.4. Avobenzon için komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.....	63
Şekil 4.5. Oktokrilen için komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.....	64
Şekil 4.6. Avobenzon ve oktokrilenin tek doz ve kombin dozları için komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri.....	65
Şekil 4.7. Avobenzon için komet testi kuyruk %DNA değerleri.....	66
Şekil 4.8. Oktokrilen için komet testi kuyruk %DNA değerleri.....	67

Şekil 4.9. Avobenzon ve oktokrilenin tek ve kombin dozlarını için karşılaştırmalı komet testi kuyruk %DNA değerleri.....	68
Şekil 4.10. Avobenzon için komet testi OKM değerleri.....	69
Şekil 4.11. Oktokrilen için komet testi OKM değerleri.....	70
Şekil 4.12. Avobenzon ve oktokrilen kombin dozları için komet testi OKM değerleri.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. UV radyasyona maruz kalma kategorisi.....	8
Çizelge 2.2. Cilt tiplerine göre güneş tepkimeleri.....	9
Çizelge 2.3. UV koruyucu bazı fenolikler ve kaynakları.....	24
Çizelge 2.4. Avustralya, Avrupa Komitesi (EC) ve ABD (Gıda ve İlaç İdaresi monografi)'de güneş koruyucularda aktif madde kullanımına izin verilen ajanlar.....	31
Çizelge 2.5. FDA (ABD) tarafından onaylanmış UVA-emici özellikteki filtreler.....	33
Çizelge 2.6. Avrupa'da onaylanmış UVA ve UVB emici özellikteki filtreler.....	33
Çizelge 2.7. UV filtrelerinin güneş kremlerindeki analizi.....	36
Çizelge 2.8. FDA, COLIPA ve Yeni Zelanda da yayımlanan UV filtrelerin major parametrelerinin karşılaştırılması.....	40
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman.....	48
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler.....	50
Çizelge 3.3. XTT testinde kullanılan avobenzon dozları.....	55
Çizelge 3.4. XTT testinde kullanılan oktokrilen dozları.....	55
Çizelge 3.5. Komet testinde avobenzon ve oktokrilenin tek başına ve kombin dozları.....	56
Çizelge 4.1. Avobenzon için komet testi ortalama değerleri.....	62
Çizelge 4.2. Oktokrilen için komet testi ortalama değerleri.....	62
Çizelge 4.3. Avobenzon ve oktokrilen kombin dozları için komet testi ortalama değerleri.....	62

1.GİRİŞ

Güneş ışığı yeryüzündeki yaşam için temel olan enerjiyi taşır, ancak güneşten gelen ultraviyole (UV) radyasyonun açıkça gözlenen zararlı etkileri vardır. Güneş, yüksek enerjili UVC bandı (280 nm'nin altı) ve UVB bandından (280-315 nm) UVA bandına (315-400nm) geniş bir yelpazede UV radyasyon yayar. Atmosferden geçerken bütün zararlı UVC ve UVB radyasyonunun çoğu 'ozon tabakası' tarafından emilir. Bununla birlikte, UVB ışınması yer seviyesine ulaştığında protein ve DNA tarafından emilir ve korumasız hücrelere zarar verebilir (Grujil 1999).

Deri günümüzde, kanserden en fazla etkilenen organdır ve cilt kanseri oranı, özellikle genç yetişkinler arasında, son yıllarda hızla artmaktadır. Bu eğilimin nedeni, UV radyasyonun ciltte DNA hasarına neden olması ve karsinogenezi başlatabilmesidir. Özellikle, DNA içindeki aromatik heterosiklik bazlar, UVB'nin dalga boyu aralığındaki ışınları güçlü bir şekilde emer ve bu da siklobutan pirimidin dimerlerinin C→T ve CC→TT mutasyonlarına yol açar. Son çalışmalar, UVA radyasyonun da siklobutan pirimidin dimer oluşumu ile DNA 'ya zarar verebileceğini göstermektedir. Bu DNA fotoürünü tümör baskılayıcı p53 geni içeren mekanizmalarla onarılabilmesine rağmen p53 geni de dipirimidin mutagenesine uğrayabilir (Schulman ve fisher 2009). UV radyasyonun, p53 tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir ve insan ve fare deri kanserlerinde p53 geninde mutasyona sebep olduğu bilinmektedir (Soehnge ve ark. 1997). Bu nedenle, UV aracılı DNA hasarı hem genom boyunca mutasyonlar başlatarak hem de p53 fonksiyon kaybına neden olarak kanserojen bir potansiyele sahiptir (Schulman ve fisher 2009).

Halk sağlığı için artan tehdit olan deri kanser artışına bağlı olarak, ulusal ve uluslararası sağlık otoriteleri UV radyasyonunun zararlı etkilerine karşı koruyucu tedbirler alınması konusunda önerilerde bulunmaya başlamışlardır. Bunlar UV radyasyonun yoğun olduğu saatlerde güneşten kaçınma ve koruyucu giysi kullanma, şapka ve güneş kremlerinin kullanımı şeklinde özetlenebilir. Önerilen tüm koruyucu önlemlerin başında güneş kremlerinin özellikle de açık eğlence, spor, ya da su aktiviteleri sırasında, sık sık kullanılması gelmektedir (Nohynek ve Schaefer 2001).

UV filtreleri genellikle güneş ışığından kaynaklanan ultraviyole ışınlarına kronik (cilt kanseri) veya akut (güneş yanığı, foto-yaşlanma) maruz kalan cildi korumak için kullanılır. Organik ve inorganik olarak iki tip güneş koruyucu geliştirilmiştir. Oktokrilen (OCT), 2-fenilbenzimidazol-5-sulfonik asit (PBSA), homosalat, 2,4-dihidroksibenzofenon, 2,2',4,4'-tetrahidroksi benzofenon, oksibenzon, 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (benzofenon-3¼BP-3), 5-benzoil-4-hidroksi-2-metoksi-benzensülfonik asit (benzofenon-4¼BP-4), 4-metilbenziliden kamfor (4MBC), 2-etil-heksil-4-trimetoksi sinnamat (EHMC) ve etil-4-aminobenzoat en yaygın olarak kullanılan organik UV filtreleridir. Bağımsız organik UV filtreleri, nispeten dar bir absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Bu nedenle, organik filtreler genellikle tüm UV-radyasyon spektrumuna karşı bir koruma elde etmek için diğer UV filtreleri ile birleştirilir (Grabicova ve ark. 2013).

Manová ve ark. (2013) yaptığı çalışmalara göre; yıl boyunca kullanılan ürünlerdeki UV filtre konsantrasyonları, öncelikle güneşten korunma amaçlı ve sadece seçilmiş günlerde kullanılan güneş kremlerinin UV filtre konsantrasyonları ile benzerdir. Kişisel bakım ürünlerinde en çok kullanılan UV filtrelerinden ikisi, EHMC ve oktokrildir. BMDM (butil metoksi di benzoil metan, avobenzon)'yi fotostabilize etmek için kullanılan oktokrilen (OCT), güneş kremlerinde sık kullanılan ve en yüksek oranda bulunan UV filtresidir (Manová ve ark. 2013). Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada avobenzon (BMDM) ve OCT güneş koruyucu filtrelerinin sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

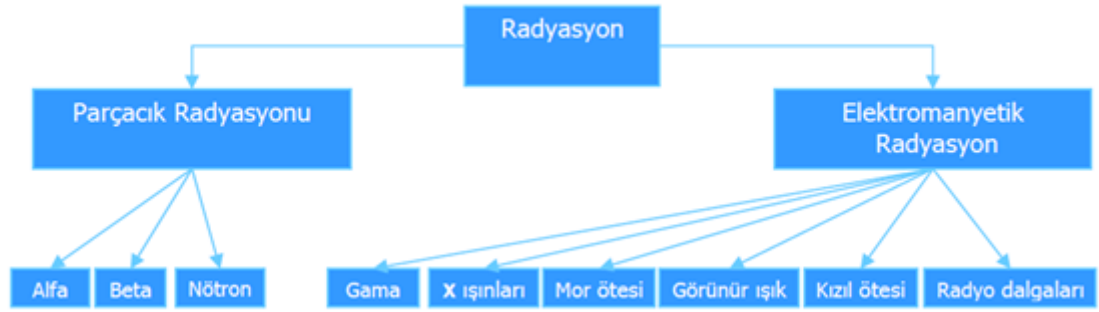
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Radyasyon Nedir?

Radyasyonu ortamda yol alan enerji olarak tanımlamak mümkündür. Bu tanım kapsamında, doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjilere radyasyon denir (Yaren ve Karayılıanoğlu 2005, Büyüksu 2007).

Radyasyonu tanımlamada üç ana parametre kullanılır (Şekil 2.1).

- Enerjisi (düşük ve yüksek enerjili radyasyon)
- Türü (parçacık radyasyonu ve elektromanyetik radyasyon)
- Kaynağı (doğal ve yapay radyasyon kaynakları)



Şekil 2.1. Radyasyonun çeşitleri (Seyrek 2007)

Parçacık radyasyonu; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden parçacıkları ifade eder. Bunlar hızla giden mermilere benzerler, ancak gözle görülemeyecek kadar küçüktürler. Dalga tipi radyasyon; belli bir enerjiye sahip ancak kütsüz radyasyon çeşididir. Bunlar, titreşim yaparak ilerleyen elektrik ve magnetik enerji dalgaları gibidir. Görünür ışık dalga tipi radyasyonun bir çeşididir. Bütün dalga tipi radyasyonlar ışık hızıyla (3×10^8 m/s) hareket ederler (Köklü 2006).

Doğada mevcut bulunan kararsız elementler kararlı yapıya geçmeye çalışırken, hiçbir dış müdahale olmadan, sahip oldukları fazla enerjilerini çekirdeklerinden dışarı salarlar. Böyle elementlere doğal radyoaktif elementler, bunların enerji salma olayına da doğal

radioaktivite denir. Doğada kararlı olarak bulunan izotoplar da yapay yollarla kararsız (radioaktif) hale getirilebilirler. Radyoaktif hale gelen çekirdek parçalanmaya uğrar. Bu olay yapay radioaktivite olarak adlandırılır (Gençay 1994, Şeker 2000).

Yüksek enerjili radyasyon iyonize radyasyon olarak da tanımlanır ve atomdan elektron koparabilen dolayısıyla atomu iyonize edebilen radyasyon türüdür. Bunlar: Alfa, Beta, Gama, Nötron ve X-Işınları'dır.

Düşük enerjili ya da iyonize olmayan radyasyon ise etkileştiği materyal içindeki atomları yeteri kadar enerjisi olmadığı için iyonize edemez ve sadece uyarmakla yetinir. Mikrodalgalar, görünür ışık, radyo dalgaları, kızılötesi ve (çok kısa dalga boyluları hariç olmak üzere) morötesi ışık iyonize olmayan radyasyona örnektir (Seyrek 2007).

2.1.1. İyonlaştırıcı Radyasyon

İyonlaştırıcı radyasyon, çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilen radyasyon demektir. İyon meydana gelmesi yani iyonizasyon olayı herhangi bir maddede meydana gelebileceği gibi, insanlar dahil tüm canlılarda da oluşabilir. O halde iyonlaştırıcı radyasyonlar, önlem alınmadığı takdirde tüm canlılar için zararlı olabilecek radyasyon çeşitleridir. Başlıca beş iyonlaştırıcı radyasyon çeşidi vardır. Bunlar, Alfa parçacıkları, Beta parçacıkları, X-ışınları, Gama ışınları ve Nötronlardır (Büyüksulu 2007).

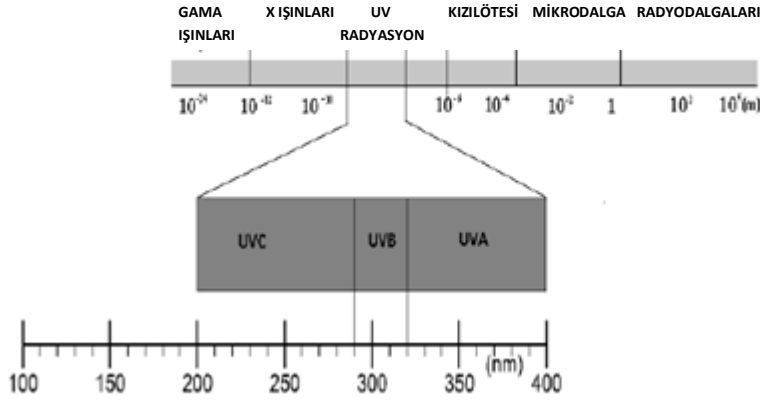
2.1.2. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon türleri

İyonlaştırıcı olmayan radyasyon türleri aşağıda sınıflandırılmıştır:

- Morötesi(ultraviyole)
- Mikrodalgalar
- Kızılötesi
- Radyo dalgalarıdır.

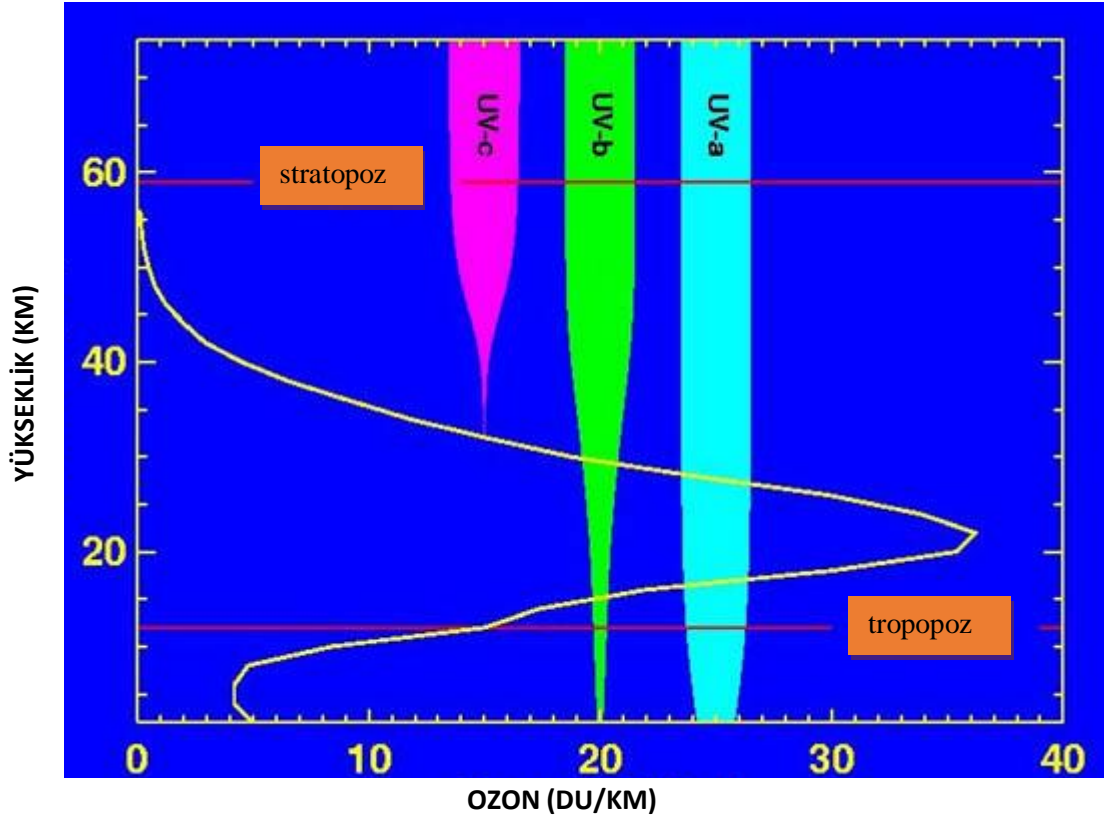
2.1.2.1. Morötesi (Ultraviyole Radyasyon)

Mor renkli ışık, gözlerimizin fark edebileceği en yüksek enerjili ışıktır. Radyasyonun enerjisi arttıkça ışık rengi mor renk ötesine gider ve morötesi olarak adlandırılır. Morötesi ışığı göremez veya hissedemeyiz, ancak ortamda mevcuttur ve eğer şiddeti büyükse ciltte bırakacağı güneş yanığına benzer yanık izleri ile varlığı hissedilir. Ultraviyole (UV) radyasyon, güneşten gelen ışık enerjisinin bir şeklidir. Güneş elektromagnetik spektrum diye bilinen bir dizi enerji yayar. Enerjinin değişik şekilleri, dalga boylarına göre sınıflandırılır. En kısa dalga boylu radyasyon en fazla enerjik olandır. UV radyasyonu 320-400 nm arasında UV-A, 280-320 nm arasında UV-B ve 200-280 nm arasında UV-C olmak üzere üç kategoride sınıflandırılabilir (Mutlu ve ark. 2003) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrumda UV radyasyon bölgesi ve bu bölgenin dalga boylarına göre sınıflandırılması (Harmanşah 2008)

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 üstünde miktarda UV dünyaya erişirse, en kısa dalga boylu UV radyasyon çok fazla oranlarda biyolojik zarar verici olabilir (Karaduman 1999).



Şekil 2. 3. Ultraviyole radyasyon bileşenleri ve ozon
(www.mgm.gov.tr/FILES/arastirma/ozonuv/UltraviyoleRadyasyon.pdf)

UV-A: UV radyasyonun en az zararlı şeklidir ve dünyaya büyük miktarlarda erişir.

UV-A stratosfer tabakasını geçerek yere kadar ulaşır. Derinin daha alt kısımlarına kadar etki yaparak, öncelikle cildin koyulaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca deri kanserinin gelişimini de artırmaktadır.

UV-B: Potansiyel olarak çok zararlıdır. Atmosferdeki stratosferik ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak değişik oranlarda yer yüzeyine ulaşır, çoğu stratosferde ozon tarafından yutulur. İnsan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinden dolayı UV-B radyasyonuna ‘biyolojik UV’ denmektedir.

UV-C: Çok enerjik olduğundan potansiyel olarak en fazla zararlıdır. Bütün UV-C stratosferde oksijen ve ozon tarafından yutulur ve asla dünya yüzeyine erişmez (Berkow 1997).

Stratosferik ozondan başka faktörler de dünyamıza ulaşan UV radyasyon miktarını etkilemektedir. UV radyasyon enlem, sezon, günün saati ve meteorolojik koşullar gibi birçok parametreye bağlıdır (Fourtanier ve ark. 2011). Güneş ışınlarının yeryüzüne eğik veya dik gelmesi yeryüzüne ulaşan UV radyasyon miktarını etkiler. Bunun yanında, güneşin gün içerisindeki konum değişikliği, atmosfer içerisinde geçen UV radyasyon miktarını etkiler. Güneş gökyüzünde alçak olduğunda, sabah ve akşam saatlerinde ışınlar atmosfer içerisinde daha uzun bir mesafe kat etmektedir ve su buharı ile diğer atmosferik bileşenler tarafından saçılmaya uğrayabilir ve yutulabilirler. Güneş kendisinin en yüksek noktasında olduğunda (öğlen), yani gün ortası civarında UV'nin daha büyük miktarları dünyaya ulaşır. Ayrıca topoğrafik yükseklik de etkilidir. Hava parselleri dağ zirvelerinde daha temiz ve daha az yoğunluktadır, bundan dolayı daha fazla UV'yi geçirir. Bulut dünya yüzeyine erişen UV radyasyonun miktarı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İnce bulut örtüsünden çok daha fazla UV radyasyon geçişi olur (Şen ve ark. 2003). Yağış koşulları ve hava kirliliği de UV taşınım miktarını azaltır. Zararlı UV-B radyasyonu stratosferik ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak yer yüzeyine ulaşır. UV-B 'nin yer yüzeyine ulaşmasını stratosferik ozon, bulutlar, havada asılı kalan partiküller ve aerosoller engellemektedir. Bulutlar, UV ışınlarını değişik yönlerde absorbe edip dağıtmaktadırlar (Lubin 1995).

2.2. UV'nin insan sağlığına etkisi

Güneş radyasyonunun deriyi etkileyebilmesi için bazı kriterler vardır, bunlar; radyasyon deri yüzeyine ulaşmalı, deri yüzeyinden içeri girmeli ve bazı deri elemanları tarafından emilmeli, emilen radyasyonun foton enerjisi fotokimyasal reaksiyonları başlatacak kadar büyük olmalıdır. Gün içerisinde, güneş en tepedeyken (öğlen saati) yer yüzeyine ulaşması beklenen ve cilt zararlarına neden olabilecek olan UV radyasyon miktarının sınıflandırılmasına UV-İndisi denir. UV-I (UV İndisi) 0-15 veya 16 değerleri aralığında kabul edilir (0: Gece, 15 veya 16: Tropiklerde öğle saatinde ve açık havada olabileceği kabul edilir). Çizelge 2.1'de UV radyasyona maruz kalma genel olarak sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2.1. UV radyasyona maruz kalma kategorisi (Anonim 2002)

MARUZİYET KATEGORİSİ	UV ARALIĞI
DÜŞÜK	< 2
ORTA	3 – 5
YÜKSEK	6 – 7
ÇOK YÜKSEK	8 – 10
AŞIRI	11+

Ultraviyole radyasyonun etkisinde kalma kategorilerinin bilinmesi halkın sağlığı açısından çok önemlidir. Bu kategoriler güneşten kaçınmayla ilgili olarak indisten yararlanmada kilit rol oynar. Maruz kalma kategorileri oluşturulurken, açık tenli insanların yanmaları ilke olarak benimsenmiştir. Açık tenli insanların güneş radyasyonuna verdikleri ani tepkiler radyasyonun cilt üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında çok yardımcıdır. Bu indis uyarıları sadece güneş yanıklarını önlemeye yöneliktir. Uzun zamana bağlı sağlık etkilerini ortaya çıkaran riskler cilt tipine bağlı değildir. Çok çeşitli olan insan cildinin güneşe olan hassasiyeti kişisel olarak belirlenmelidir. Öncelikle vücudun değişik bölümlerinin cilt renkleri belirlenmelidir. Şöyle ki; bacağın hemen altının, dizin arkasının ve kolun üst tarafının iç rengi özellikle önceliklidir. Cilt fototiplerine göre cildin vereceği reaksiyonlar Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Cilt tiplerine göre güneş tepkimeleri (Mutlu ve ark. 2003)

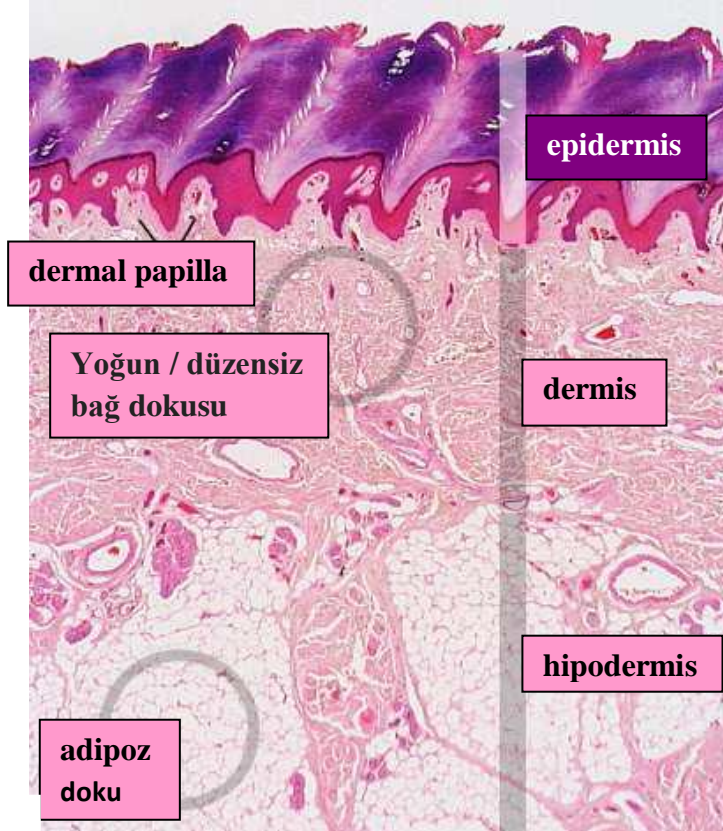
CİLT FOTOTİPLERİ	ÖZELLİĞİ	CİLT RENGİ (Görünmeyen yerler dikkate alınmıştır)	CİLDİN GÜNEŞ REAKSİYONU
Hiç bronzlaşmamış	Her zaman yanar	Soluk veya sütbeyazı	Gelişen kırmızı güneş yanıkları, acı veren şişikler ve cilt soyulması
Bazen bronzlaşan	Sık yanar	Çok açık kahverengi (Bazen küçük benler oluşur)	Sıklıkla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

UVA ve UVB ışınları normal deri üzerinde akut ve kronik etkilere sahiptirler. Ayrıca güneş yanığı reaksiyonunun şiddeti derideki koruyucu melanin ile ters, derinin güneş radyasyonuna maruz kalış süresiyle doğru orantılıdır (Mutlu ve ark. 2003).

2.2.1. 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 bilineni 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 hücrel yıkıma yol açar (Karaduman 1999).

UV'nin bir etkisi de cildin renginin değişmesidir. Ultraviyolede dolaylı cilt renk değişimi ani ve geç bronzlaşma olmak üzere iki aşamalıdır. Ani bronzlaşma UVA ile oluşan kızarıklığı izleyen deride var olan melaninin oksidasyonu ve keratinositlerin transferi sonucu oluşmaktadır. Eğer güneş radyasyonu ile daha uzun temas olursa geç cilt renk değişimleri gelişebilir. Geç bronzlaşma ise UV'ye maruz kalmayı izleyen 24-72 saat sonra epidermal melanin oluşumunun artması ile gelişir. UV'nin bir diğer etkisi de hücrelerin anormal çoğalmasıdır (Mutlu ve ark. 2003). Ultraviyole ışınlarının uyardığı inflamasyon uyarılma eşiği arttığında derinin stratum korneum, epidermis, dermis tabakalarında kalınlaşmaya neden olur (Şekil 2.4). Özellikle açık tenlilerde ve derisinde beyaz lekeleri olanlarda tek UVB dozundan sonra derinin koruyucu tabakası kalınlaşır. Bu kalınlaşma deriyi güneş yanığından 10-20 kat korur. 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. Bu kalınlaşma açık tenli kişilerde, bronzlaşmadan daha fazla koruyuculuk sağlar (Tekbaş 2005).



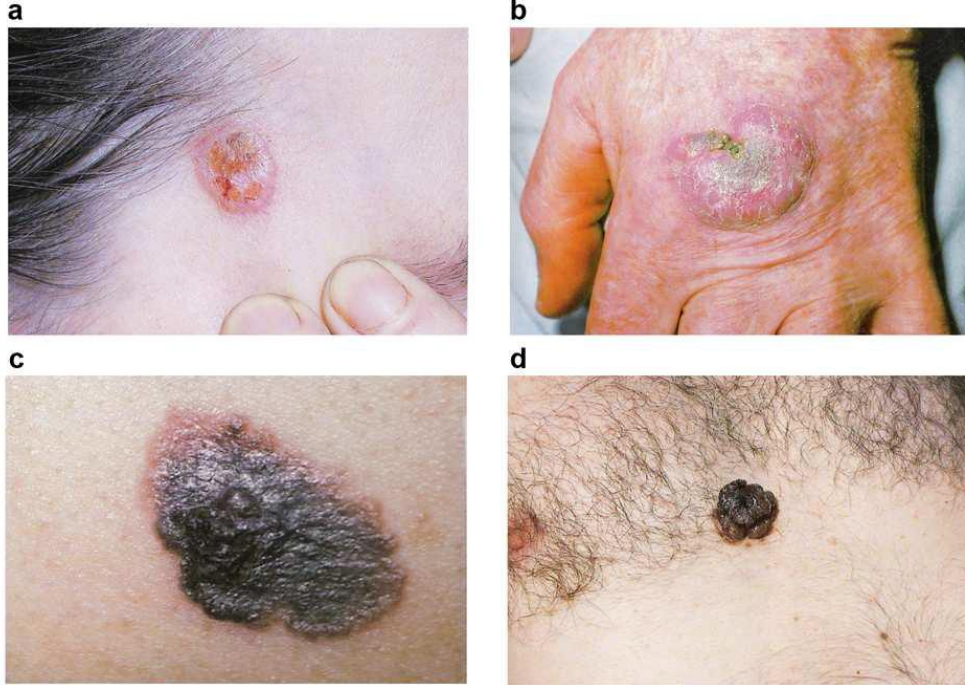
Şekil 2.4. İnsan derisinin yapısı (Petrova 2009)

UV ışınları epidermal Langerhans hücrelerinin sayıları ve görevlerini etkileyerek onların antikor üretme yeteneklerini azaltır. Bu bozukluk T hücrelerinin gelişimini uyarak 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 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).

2.2.2. 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 ışınlarıdır. 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 değişikliklere UVB, dermisdeki (derinin orta katmanı) değişikliklere hem UVB, hem de UVA neden olur. Fotonların hücresel 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. UV'nin kronik etkilerinden birisi de cilt kanseridir. Güneş ışınlarının çok yoğun bulunduğu bölgelerde yaşayan kimselerde bazal ve skuamoz kanser vakaları büyük artış göstermektedir (Mutlu ve ark. 2003). Doğal ya da yapay ultraviyole ışınları ile uzun süreli temas sonucu insanlarda ve deney hayvanlarında deri kanseri olduğu deneylerle kanıtlanmıştır. 280-320 nm UVB ışınları kanser oluşturur. Uzun dalga boylu UVA (320-400nm) ışınları UVB ışınlarıyla birleştiğinde kanser riski artar. UV radyasyonu

ışınımla uzun süre temasta kalmanın DNA yapısında değişikliğe yol açtığı gözlenmiştir. UVB ve UVC; DNA yapısında mutasyon, hücre yıkımı ve transformasyona neden olmaktadır. Ayrıca UV tümör baskılayıcı gen olan p53 geninde de mutasyona sebep 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 1993). Ultraviyole ışınları etkisi ile bazal hücreli karsinom, skuamöz 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 söz konusudur. Melanom olmayan deri kanserlerinin teşhisi zordur (Şekil 2.5) ve bu tip kanserlere yakalanma riski ırka bağlıdır, ayrıca sarışınlarda çok fazla görülmektedir. Melanom olmayan kanserler, melanom olana göre daha çok yaygındır ama ölüme yol açmaz, ayrıca tedavisi daha kolaydır. 1970 yılından itibaren Amerika’da yapılan araştırmalara göre, %4’lük bir deri kanseri artışı gözlenmiştir (Mutlu ve ark. 2003).



Şekil 2.5. Yaygın kanser tipleri: (a)bazal hücreli karsinom (b)skuamöz hücre karsinomu (c)yüzeysel melanom (d)nodüler melanom (Petrova 2009)

Güneşin yakıcı ışınları gözlere de zarar verebilir. Çalışmalar, 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 (Mutlu ve ark. 2003).

UV Radyasyonun insan ve diğer canlılar üzerindeki etkileri şöyle sıralanabilir:

Yanıklar: UV ışın, deri üzerinde güneş yanığı dediğimiz etkiyi yaratır.

Mutasyon Oluşturması: UV ışını, bakteri ve virüsler dahil tüm hücrelerde, DNA'da mutasyon oluşturur.

Kromozom kırılmaları yaratması: UV'nin, iyonlayıcı radyasyona göre çok daha az da olsa kromozomları kırabileceği bilinmektedir.

Hücre bölünmesinde gecikme ve dev hücre oluşumu: Hücre bölünmesinin UV ile engellenebildiği ve böyle hücrelerin aşırı büyüme gösterdiği tespit edilmiştir.

Metabolizma ve protein sentezine etkisi: UV'nin DNA sentezi üzerinde iyonlayıcı radyasyona göre daha fazla etkisi olduğu bulunmuştur (Güler ve Çobanoğlu 1994).

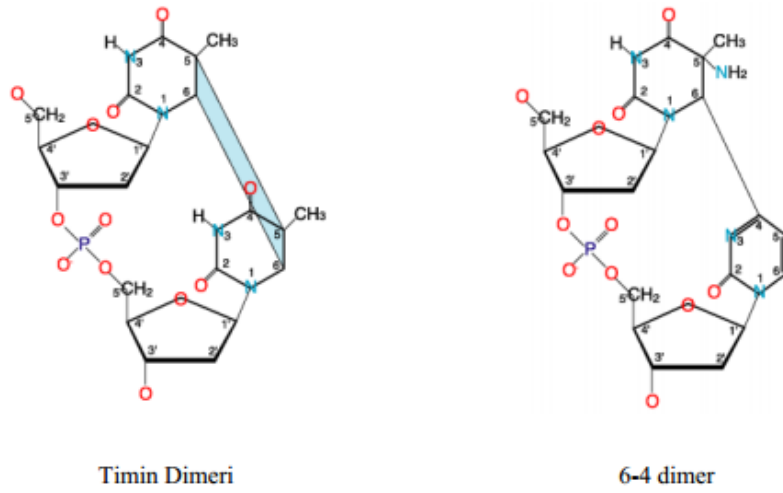
2.3. UV ile indüklenen DNA hasarları

UV, foto-ürün denen DNA değişimlerine yol açar. İki farklı lezyon oluşturarak aynı zincirde komşu pirimidinleri birleştirir. Bu lezyonlar siklobütan pirimidin fotodimeri ve 6-4 fotoürün oluşturmasıdır (Griffiths ve ark. 2005).

UV ışını sonrası oluşan siklobütan pirimidin fotodimeri oluşumu, en fazla bulunan ve en sitotoksik lezyonlardır ancak 6-4 fotoürün oluşumunun daha ciddi, potansiyel olarak ölümcül, mutajenik etkileri olabilir.

- Siklobütan pirimidin dimeri örneğinde UV ışını dört üyeli siklobütül halkası oluşumunu aynı DNA zincirindeki komşu pirimidinler arasında 5,6 çift bağ üzerinde harekete geçerek oluşturur.
- 6-4 fotoürün yapısı iki komşu pirimidinin C-6 ve C-4 atomları arasında oluşur (çoğunlukla 5'CC3' ve 5'TC3')

Pirimidin dimerleri heliks yapısını bozar. Dimerin 3' pozisyonunda UV foto-ürünlerinin karşısına yanlış bazlar eklenir.



Şekil 2.6. Siklobütan pirimidin fotodimeri ve 6-4 fotoürün oluşturması (Debeleş-Bütüner ve Kantarcı 2006)

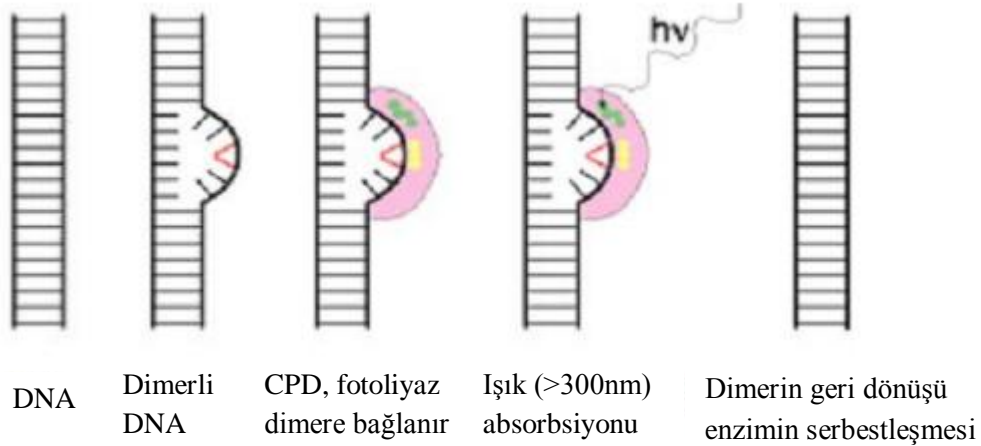
2.4. UV kaynaklı DNA hasarı onarım mekanizmaları

Bir hücrenin bölünmesiyle oluşan diğer hücrelere genetik bilginin doğru aktarımı organizmaların yaşam anahtarıdır. Bu hedefe ulaşmak için; organizmalar UV veya başka herhangi bir stres nedeniyle oluşan DNA lezyonlarının ölümcül etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla etkin bir dizi DNA tamir mekanizmaları geliştirmiştir. Özel onarım proteinleri DNA lezyonlarının varlığı için sürekli olarak genom tarar. Lezyon tanıma proteini uyumsuz bir bazla karşılaştıktan sonra genetik bilginin restorasyonunu sağlayan etkili bir DNA tamirini tetikler. Önemli tamir mekanizmaları şöyledir (Sinha ve Häder 2002):

2.4.1. Doğrudan Tamir

Bazı DNA hataları baz yada nükleotid çıkarılmadan düzeltilir. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs), fotolizaz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir. Reaksiyona fotoreaktivasyon denir (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006). Pirimidin dimerleri ışıkla uyarılan tepkimeler sonucu oluşur. Fotolizazlar bu hataları yok etmek için absorblanan ışıktan elde edilen enerjii kullanır.

Fotolizazlar genellikle ışık absorblayıcı ajan veya kromofor olarak görev yapan iki kofaktör içerir. Kromoforlardan biri her zaman FADH'tır. E.coli ve mayalardaki diğer kromofor ise folattır. Fotolizazlar bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde, omurgasızlarda ve çoğu omurgalıda bulunur ancak insanda ya bulunmaz ya da fonksiyonel değildir (Çakmakoglu 2012).



Şekil 2.7. Fotoreaktivasyon (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006)

2.4.2. Eksizyon Onarımı

DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesinde, bazlardaki her kimyasal değişiklik kendine özgü bir onarım mekanizması gerektirir. Ancak, hücreler birçok kimyasal hasar tipini düzeltebilecek genel bir onarım mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Bu da eksizyon onarımıdır ve yanlış yerleştirilen, hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006). Fotoreaktivasyonun aksine, onarım yolları çok daha karmaşıktır ve doğrudan DNA hasarını tersine çevirmez ancak

bunun yerine yeni hasarlı DNA hasarsız nükleotidle yer değiştirir (Sinha ve Häder 2002).

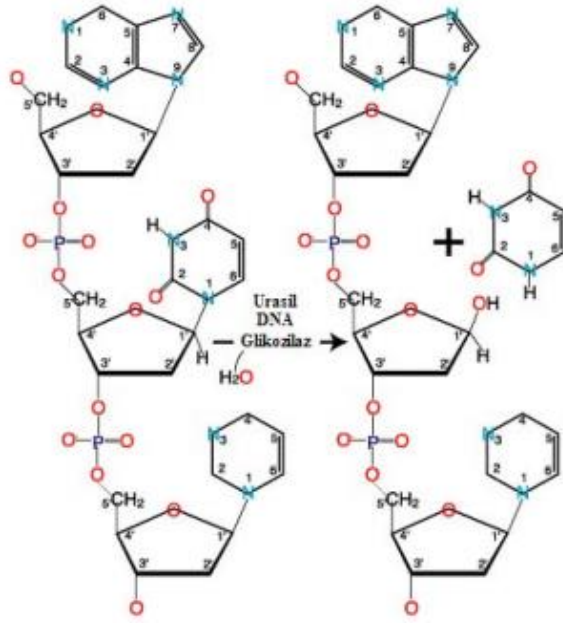
Eksizyon onarım yollarının iki ana kategorisi vardır: Baz eksizyon tamiri (BER) ve nükleotid eksizyon onarımı (NER).

2.4.2.1. Baz Eksizyon Onarımı (BER)

Baz eksizyon yolu, DNA baz yapısını değiştiren reaktif oksijen türleri veya hücre içi metabolitlerden, hidroliz ile indüklenen endojen DNA hasarının zararlı etkilerinden hücreleri korumak için geliştirilmiştir. Buna ek olarak, BER iyonize edici radyasyon ve güçlü alkile edici maddeler tarafından üretilen lezyonlara dayanmak için de önemlidir (Sinha ve Häder 2002). Her yanlış baz tipine özgün birçok yolak vardır. Bu yolaklar 2. ve 3. basamaklar ortak olmak üzere 3 adımdan oluşur:

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir AP (Apürinik / Apirimidinik) bölge oluşması. AP bölgeleri spontan olarak kaybolan ya da glikozilaz etkisiyle uzaklaştırılan DNA bölgeleridir. Bir memeli hücresi günde 10000 pürin ve 500 pirimidin kaybeder.
2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılması ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulması.
3. AP bölgesinin kesilip çıkarılarak uzaklaştırılması ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucunun uzatılması.

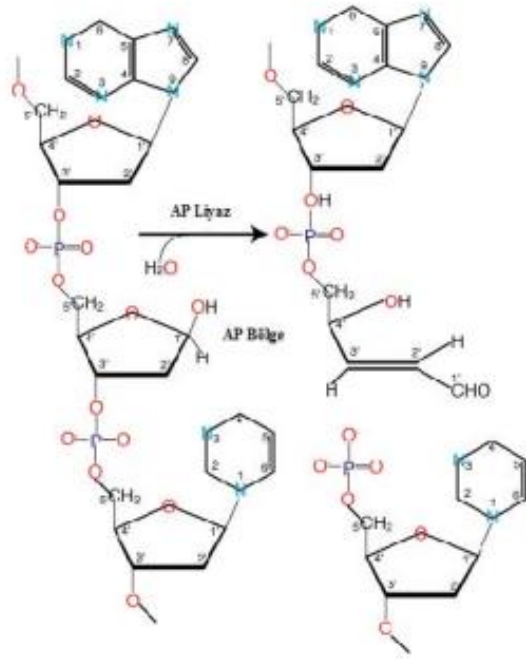
İnsan hücrelerinde çok sayıda DNA N-glikozilaz tanımlanmıştır. Diğer ökaryotik organizmalarda ve prokaryotlarda da benzer yapıda glikozilaz enzimi bulunmaktadır. DNA N-glikozilaz, DNA sarmalı üzerinde hatalı eşleşmeden kaynaklanan bükülmüş yapıyı tanır, baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Ayrıca glikozilazlar bazların yüksek afinite gösterdiği bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bu iki etken birleşince yanlış eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması kolaylaşır.



Şekil 2.8. Urasil DNA N-glikozilazın aktivitesi (Debeleş-Bütüner ve Kantarcı 2006)

Spontan deaminasyon hatalı baz eşleşmesine ve böylece DNA replikasyonu esnasında kalıcı hale gelen mutasyonlara sebep olur. Örneğin; deaminasyon sitozini urasile çevirir ve sonrasında, urasil replikasyon esnasında adenin ile eşleşir. Urasil N-glikozilaz hatayı tanır ve urasili çıkarır.

DNA N-glikozilazlar ayrıca AP liyaz aktivitesine sahiptirler (şekil 2.9). Bu şekilde AP bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler. Bir sonraki adımda AP endonükleazları 5' fosfodiester bağını hidroliz ederler ve uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozyu uzaklaştırırlar. Son olarak, DNA polimeraz (polimeraz-β) tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır.

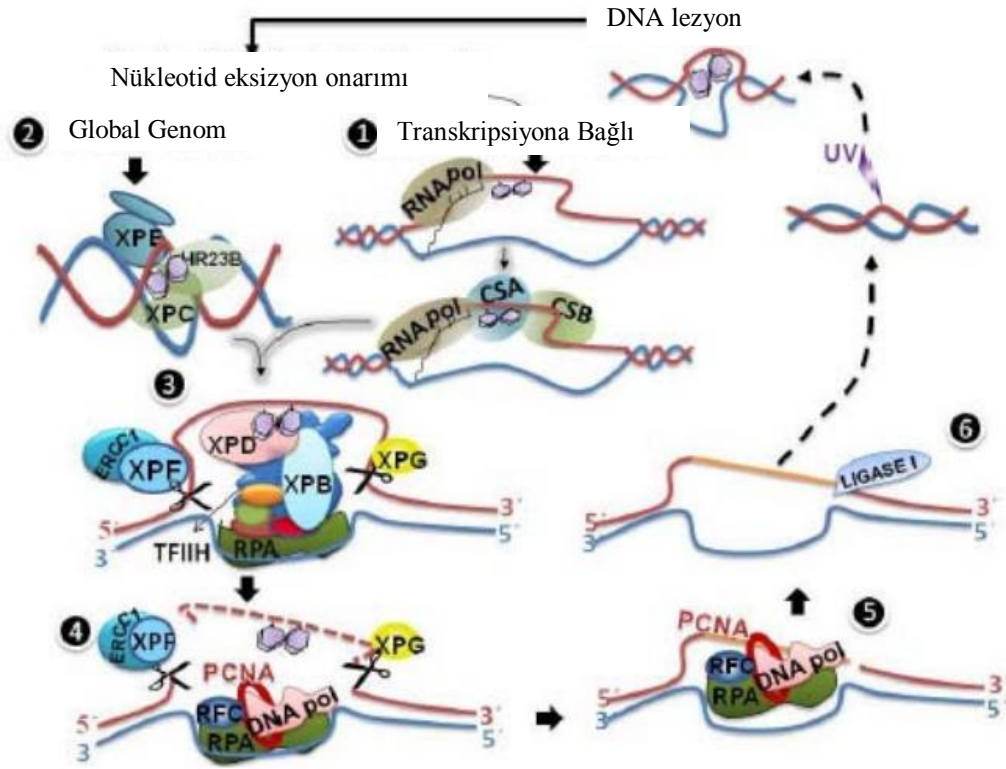


Şekil 2.9. DNA N-gikozilazların AP liyaz aktivitesi (Debeleş-Bütüner ve Kantarcı 2006)

2.4.2.2. Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER)

DNA'da büyük şekil bozukluklarına yol açan sarmal yapıdaki kusurların genelde nükleotid eksizyon onarımı ile düzeltilmesinin hayati bir önemi vardır (Çakmaköğlu 2012).

İnsanlarda, güneşten gelen UV ışığının karsinojenik etkilerine (dimerler) karşı önemli bir onarım mekanizmasıdır (Onur ve ark. 2009).

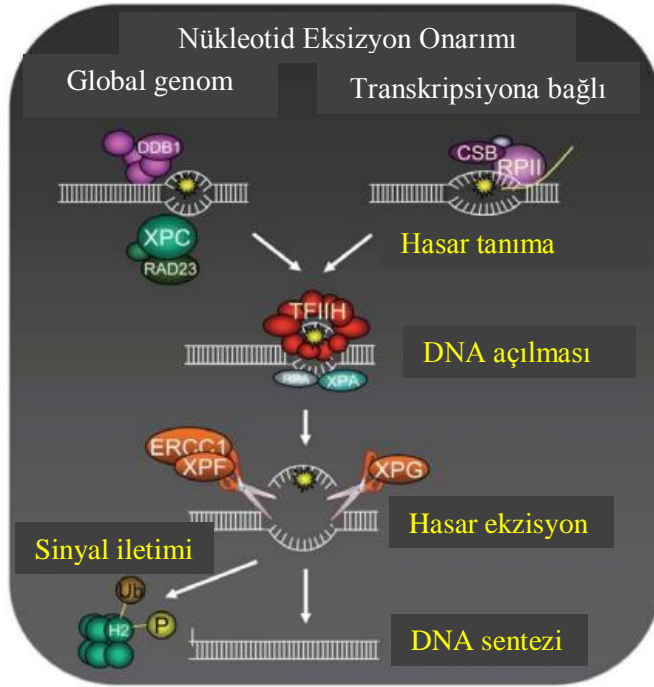


Şekil 2.10. Nükleotid Eksizyon Onarımı (Çakmakoğlu 2012)

NER mekanizmasının işleyişi:

1. Hasarın tanınması
 2. Protein kompleksinin hasarlı bölgeye bağlanması
 3. ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragmenti içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı zincirin kesilmesi (insizyon)
 4. Hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılması (degradasyon)
 5. DNA sarmalı üzerinde meydana gelen boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması (polimerizasyon)
 6. Ligasyon
- aşamalarından oluşur (Onur ve ark. 2009).

1. Nükleotid eksizyon onarımının iki alt yolağı vardır:



Şekil 2.11. NER'in iki alt yolağı (Çakmakçoğlu 2012)

a) Transkripsiyona bağlı onarım (TCR), RNA polimeraz II'nin bir DNA lezyonu ile karşılaştığında aktive olan DNA onarımıdır.

b) Global genomik onarım (GGR), transkripsiyondan bağımsız olan DNA onarımıdır.

TCR ve GGR sadece ilk basamakta birbirinden farklıdır.

- GGR de hasarın tanınma basamağında XPC/hHR23B ve XPE (DDB2) proteinleri görev alır.
- TCR de RNA polimeraz II hasarı kendisi tanır. CSA ve CSB proteinleri tanınma aşamasına katılırlar.

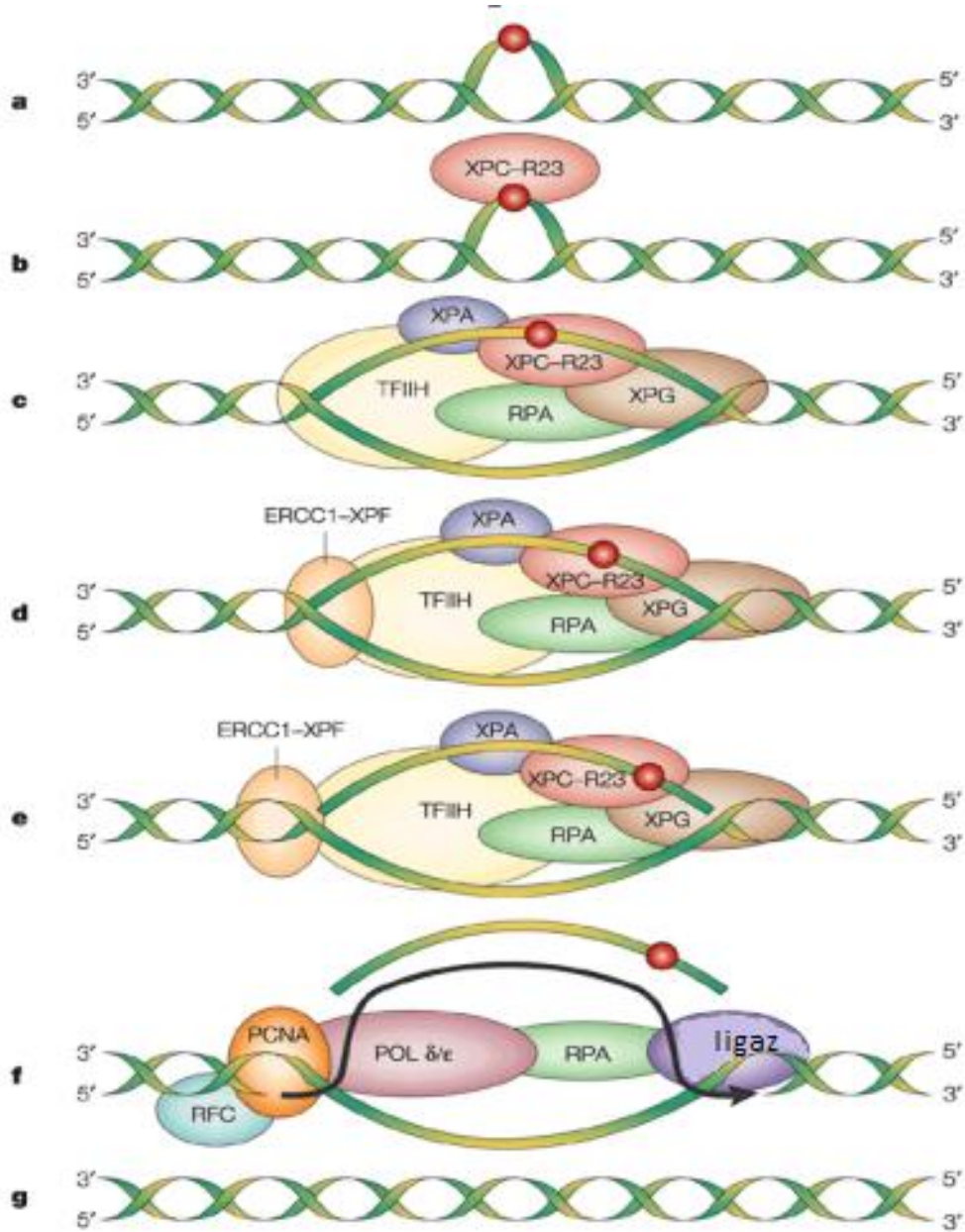
2. Lezyon tanımlandıktan sonra her iki alt yolak birleşir ve farklı proteinlerin katıldığı reaksiyonlarla hasar uzaklaştırılır.

3. XPG nükleazı 3' uç bölgesinden XPF/ERCC1 nükleazı ise 5' uç bölgesinden DNA zincirini keser.

Hasarlı bölgeyi içeren 24-32 nükleotidlik oligonükleotid serbest bırakılır.

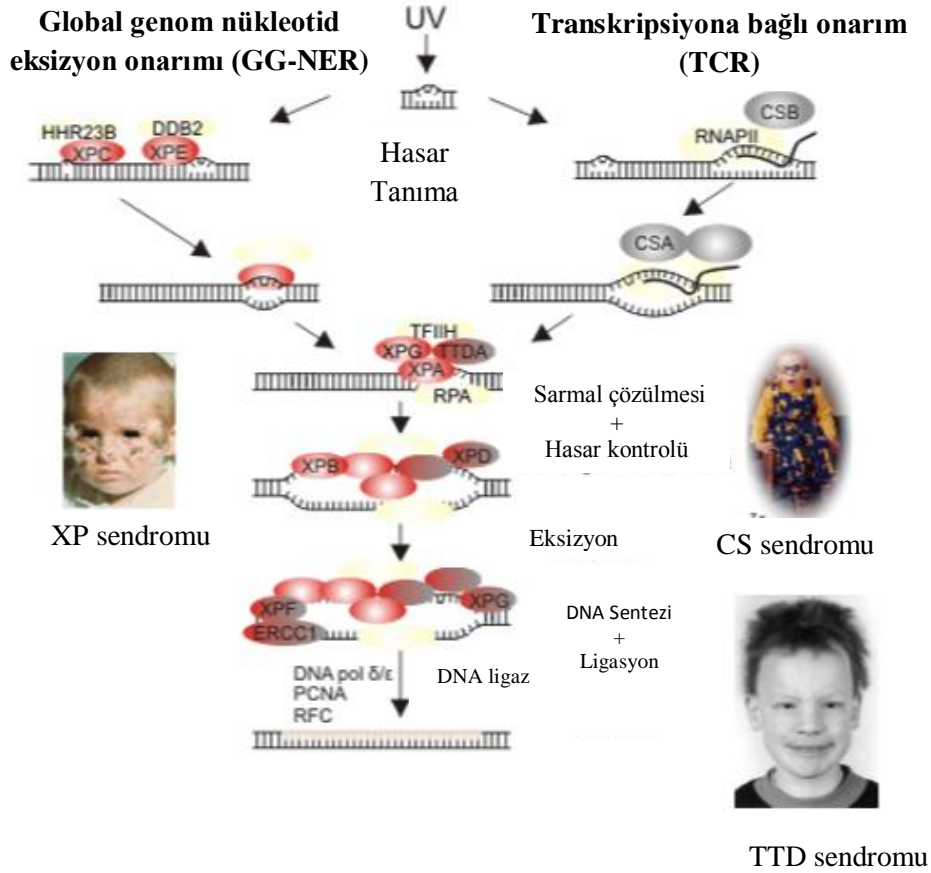
4. DNA zincirindeki boşluk, DNA replikasyon faktörü C (RFC), prolifer edici hücre nükleer antijeni (PCNA) ve DNA polimerazlar δ ve ϵ ile doldurulur.

5. Nükleotid-Kesim-Tamir mekanizmasındaki son basamak, PCNA proteininin ayrılması ve ligaz I enzimi ile yeni sentezlenen DNA zincirinin ligasyonu.



Şekil 2.12. NER mekanizmasının işleyişi (Çakmakoğlu 2012)

NER; hücresel DNA'dan hasar içeren oligonükleotit çıkarmak için yaklaşık 30 gen ürününü kullanır (Sinha ve Häder 2002). NER yolağında lezyonların genel özelliği DNA kimyasının modifikasyonu ve DNA çift sarmalının helikal olarak şekil değişimine uğramasıdır. Nükleotid eksizyon onarım mekanizmalarının genom bütünlüğünü koruyucu ve hayatın devamlılığını sağlayıcı işlevleri, nükleotid eksizyon onarım proteinlerinden herhangi birini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan, nadir görülen, otozomal resesif geçişli üç sendromla anlaşılabilir (Şekil 2.13). Bu sendromlar Xeroderma pigmentosum / XP, Cockayne sendromu / CS, Trichothiodystrophy / TTD olarak isimlendirilmiştir. Bu bireylerde güneşe duyarlılık, bazı organ dokularında erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidansında artış gözlenir. Cockayne sendromu, XP ve TTD fenotiplerinin en belirgin ortak özelliği ultraviyole ışığına olan aşırı duyarlılıktır ancak, XP hastalarından farklı olarak, CS ve TTD hastalarında deri tümörleri gelişmez (Kulaksız ve Sansar 2007).



Şekil 2.13. XP, CS ve TTD sendromlarının oluşumu (Çakmakoğlu 2012)

2.5. UV Koruyucular

2.5.1. Doğal Koruyucular

2.5.1.1. Fenolik Bileşikler

Benzen halkası içeren organik maddeler genel olarak fenolik bileşikler olarak adlandırılmakta olup bunlar bütün bitkiler aleminde bulunan ikincil metabolitlerdir (Uylaşer ve ince 2008, Akalın 2011). Fenolikler asidiktir ve kolay parçalanabilirler. Bitkileri ultraviyole ışınlarından, hastalık ve zararlılardan korurlar (Tümer 2006). Serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklere sahiptirler (Hertog 1995; Kato ve ark. 1997; Lodovici ve ark. 2001) ve normal gelişim sırasında, UV ışınlarına maruz kalma gibi stres koşulları altında sentezlenmektedirler. Fenolik bileşikler, flavanların polimerleri olup, başlıca flavan 3-4-diollerden oluştuğu bilinmektedir. Bu bileşikler fenol halka sayılarının fonksiyonuna bakılarak farklı gruplarda sınıflandırılabilirler ve bir halkayı diğerine bağlayarak yapısal element görevi üstlenebilirler (Okcu ve ark. 2011). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır. Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir. Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Nizamlıoğlu ve Nas 2010).

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Söylemezoğlu 2003):

Fenolik Asitler; hidroksi benzoik ve hidroksisinnamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Gallik asit ve ellajik asit, hidroksi benzoik asit grubuna; p-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit hidroksisinnamik asit grubuna dahildir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Nizamlıoğlu ve Nas 2010). Flavonoidler yapısal olarak kendi içerisinde altı alt gruba ayrılmaktadır; Kuarsetin ve kaemferol flavonollara, genistein isoflavanoitlere, kateşin ve epigalaktokateşin/gallat flavanollara, hesperidin flavanonlara, pelargonidin ve siyanidin antosiyanidinlere ve krisin flavonlara dahildir (Yılmaz 2010).

Binlerce bitki fenoliklerinin bazılarını kökenleriyle sıralamak gerekirse; klorojenik asit (kahve, havuç ve patatesten), ferulik asit (mısır, pancar ve tek çenekli sebzelerde), flavonlar ve flavonoller (soğan, yeşil sebzeler, çay ve elmada), kateşin ve diğer flavan-3'ler (çay, elma, üzüm ve çikolatada), isoflavonlar (soya tohumu), ligantlar (mısırdan) yaygın olarak bulunmaktadır. Süt ve et ürünleri, bazı bitkisel gıdalar, β -karoten, lutein, likopen, β -kriptoksantin ve zeaksantin bakımından zengindirler. Bitkilerdeki karotenoit miktarları bitkinin türü, aldığı ışık ve azot (N) miktarı ile tarımsal işlemlerden etkilenmektedir. Karotenoitler bitkilerin fotosentetik kısımlarında, meyvelerde yağ damlacıkları içerisinde çözülmüş halde ya da havuç ve domateste yarı kristalize halde bulunurlar (Yılmaz 2010).

Gallik, klorojenik, kafeik, ellajik ve ferulik asitler gibi meyvelerdeki fenolik asitler antimitojenik (Malavcille ve ark.,1998), antikanserojen (Arimoto-Kobayashi ve ark. 1999), antioksidan (Namiki ve ark. 1993; Rice-Evans ve ark. 1996), ve antitümör (Owen ve ark. 2000) etkiye sahiptirler.

2.5.1.2. Belirlenmiş UV Koruyucu Fenolikler

Çizelge 2.3. UV koruyucu bazı fenolikler ve kaynakları (Kullavanijaya ve Lim 2005)

AJAN	KAYNAK	FOTO-KORUMA ÖZELLİĞİ
Kalsitriol	Böbreklerde sentezlenir	Serbest radikal süpürücü
Kafeik asit ve Ferulik asit	Bitki ve sebzelerde	Radikal süpürücü ve antioksidan
Löykotomos eğreltisi	Bitki ekstratı	Antioksidan ve iltihap önleyici
Çinko		Antioksidan
Kadmiyum klorid	Sentetik	Metallotionein İndüksiyonu

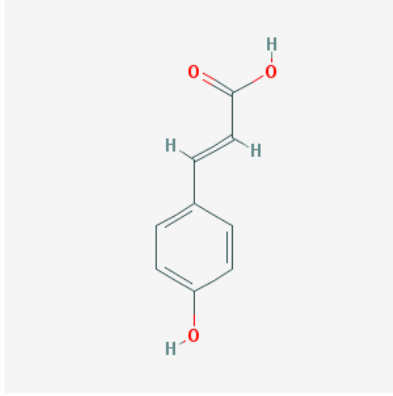
Çizelge 2.3. UV koruyucu bazı fenolikler ve kaynakları (devam) (Kullavanijaya ve Lim 2005)

AJAN	KAYNAK	FOTO-KORUMA ÖZELLİĞİ
Cistus	Akdeniz çalısı	Serbest radikal süpürücü
Fenolik bileşikler	Yeşil çay	Antioksidan
İzoflavon	Bitkiler	Antioksidan
İzoflavon metabolitler		
-Genistein	Soya fasülyesi	UV indüklenmesine karşı koruyucu
-Equol	Kırmızı yonca	
Kafein	Bitkiler	Apoptosisin artışı
Bitki oligosakkaritleri:		
- Xyloglucan	Demirhindi tohumları	UV ile indüklenen sistemik
-Aloe poli/oligosakkarit	Aloe Vera	immünosupresyonun önlenmesi
T4 endonükleaz	Bakteriyel DNA eksizyon enzimi	Siklobütin pirimidin dimeri onarımı
Omega-3 çoklu doymamış yağ asidi	Balık yağı	Güneş yanığı hücre formasyonunun azalması

Propolis:

Arıların bitkilerden ürettiği kovan temizliği ve yalıtımında kullandığı bir arı yapışkanıdır ve onun ana polifenolik bileşenleri yüksek antioksidan aktivite gösterirler; sodyum dodesil sülfat (SDS) misellerindeki linoleik asitin (LA) lipid peroksidasyonu ile ilgili önleyici etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca çalışmaların sonuçları gösteriyor ki, propolis ve onun bileşenleri, cilt bakım pazarında yaygın olarak kullanılan UV filtrelerden kesinlikle daha iyi koruma sağlar (Gregoris ve ark. 2010).

Kumarik asit:



Şekil 2.14. Kumarik asidin kimyasal yapısı (Lodovici ve ark. 2002)

Hücrelerin UV-B radyasyona maruz kalması, hücresel hasar bileşeni olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini uyarabilir. Fakat serbest radikal süpürücüler ve antioksidanlar ROT üretimini engelleyebilir. Fare korneal hücrelerinde (SIRC) yapılan araştırmaya göre; UV-B radyasyon, SIRC hücrelerde antioksidan savunma sistemlerini etkiler ve oksidatif DNA hasarına neden olur ancak 4-kumarik asit, muhtemelen serbest radikal süpürücü özelliği sayesinde, insanın maruz kaldığına benzer yoğunluktaki UV-B radyasyonunun zararlı etkisini azaltır ve tavşan kornea hücrelerini korur (Lodovici ve ark. 2002).

Löykotomos eğreltisi:

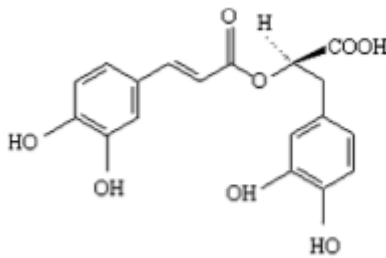
Bu bitkisel kaynaklı ajan, tek bir dozdan sonra insan cildi üzerinde fotokoruma göstermiştir. Bu bağlamda, düşük bir dozda bile; eritem, timin dimerler oluşumu ve Langerhans hücre kaybını azaltarak insan cildi üzerinde bir koruyan bir etki gösterir. Bu eğreltinin faydalı etkileri, yüksek antioksidan yeteneği; trans-urocanic asit fotoizomerizasyon inhibisyonunu ve in vivo ve in vitro hücre foto korunmayı da içerir (Gonzalez ve ark. 2008).

Omega-3 çoklu doymamış yağ asidi:

Yapılan bir klinik çalışmada; omega-3 çoklu doymamış yağ asidinin UVB kaynaklı güneş yanığı ve inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir; aynı zamanda balık yağı alındıktan 3 ay sonra UVA bağımlı tepkiler azalmıştır (Gonzalez ve ark. 2008).

Rosmarinik asit:

Rosmarinik asit; esas olarak, antioksidan, anti-enflamatuar ve antimutajen olmak üzere birden fazla biyolojik aktivite sergiler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, aynı zamanda, atopik dermatit tedavisinde ve foto-korumada yarar sağladığını göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, rosmarinik asit ile tedavi sonrası UVA'nın oluşturduğu oksidatif hasara karşı HaCaT keratinositlerini koruduğunu gösterilmiştir (Vostalova ve ark. 2010).

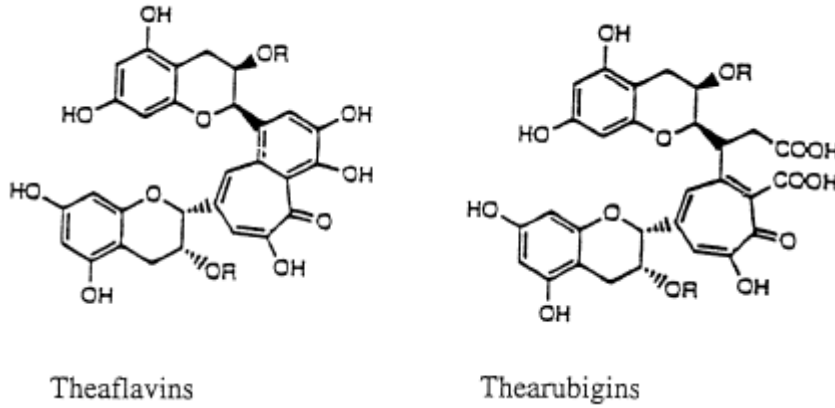


Şekil 2.15. Rosmarinik asit kimyasal yapısı (Vostalova ve ark. 2010)

Theaflavin:

Mor ötesi radyasyon ile indüklenmiş deri kanser oluşumuna karşı yapılan kemopreventif çalışmaların çoğu yeşil çay ve polifenolik bileşenler kullanılarak yapılmıştır. Ancak, kanser kemopreventif potansiyeli daha az bilinmesine rağmen dünya çay tüketiminin %80'inden fazlası siyah çaydır. Siyah çay ile ilgili olarak, çalışmalar fare deri kanseri modellerinde theaflavinin ultraviyole B radyasyonun neden olduğu tümör oluşumuna karşı koruma sağladığını göstermiştir. Siyah çaydaki polifenoller; theaflavin ve gallate türevleridir. Theaflavinler, siyah çay imalatı sırasında kateşin, epikateşin ve gallokateşin kateşin gallatlar gibi kateşinlerin enzimatik oksidasyonundan meydana gelirler (Katiyar ve Mukhtar 1997).

Theaflavin ve gallate esterlerinin kimyasal yapısı:



Şekil 2.16. Siyah çayın ana polifenol kimyasal yapıları. Fenolik gruplar antioksidan potansiyeli sağlar. R =galloyl grubu (Katiyar ve Mukhtar 1997)

Siyah çay yapraklarının su ekstrelerindeki katıların önemli bir kısmı, theaflavinlerden daha yaygın okside ve polimerize olan thearubigenleri temsil eder (Wang ve ark. 1994).

Miller ve ark. tarafından; siyah çayın su ekstratı ile ciltte yapılan kemopreventif çalışmaları ile çayın antitümör etkisi gösterilmiştir. Sulu ve lipofilik aşamalarında serbest radikalleri temizleme yeteneklerini inceleyerek theaflavinler ve gallat esterlerinin antioksidan özelliklerini bildirmişlerdir (Katiyar ve Mukhtar 1997).

Genistein:

Çok güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip çok güçlü bir soya fasulyesi isoflavonudur. Ayrıca, protein tirozin kinazların ve fitoöstrojenin özel bir inhibitörüdür. Farelerde oral olarak takviye edilen genisteinin, UVB ile indüklenmiş deri karsinogenezini engellediği de gösterilmiştir (Gonzalez ve ark. 2008).

Silimarin:

Silimarin, devedikenini tohumlarından izole edilen bir bitki flavonoididir (Türsen 2006, Gonzalez ve ark. 2008). Bu; silibin, silidianin ve silikristin olmak üzere 3 flavonoid karışımından oluşur. Güncel deneysel gözlemler silimarinin; güneş yanığı, DNA hasarı ve melanom dışı deri kanserine karşı koruduğunu göstermektedir (Gonzalez ve ark. 2008).

2.5.2. Kimyasal Koruyucular

Son yıllarda, UVA radyasyonunun güvenli olduğu düşünülmesine rağmen UVB zararlı olarak kabul edilmiştir (Fourtanier ve ark. 2011). Bununla birlikte, yüksek yoğunluklu yapay UVA kaynaklarının kullanılmaya başlanması ile UVA radyasyonunun cildin derinine nüfuz etmesi ile zararlı biyolojik etkilere neden olmuştur. UVA radyasyonu esas olarak endojen ve ekzojen kromofor ile etkileşim yoluyla reaktif oksijen türleri (ROT) üretir. Bu reaktif oksijen türleri DNA, hücre, damar ve doku hasarına yol açabilir. UVB'ye benzer şekilde, UVA da bağışıklık sistemi depresyonu ve melanom gibi deri kanseri gelişiminde ilişkili bulunmuştur. Fotoallerjik ve fototoksik reaksiyonlar gibi fotodermatozlar ağırlıklı olarak UVA kaynaklıdır. Bu nedenle, UVA ve UVB filtrelerinin bir kombinasyonunu ihtiva eden günlük bir nemlendirici kullanmak, cilde UVA maruz kalmasını azaltmak için çok önemlidir (Seité ve ark. 2012).

UVB filtreleri; UVB radyasyonunun yaklaşık %90'ını bloke etmede yüksek etkilidirler. Sinamatlar en sık kullanılan UVB ajanlarıdır, ancak zayıf kalıcı etkiye sahip olduklarından genellikle, diğer maddeler ile kombine edilerek kullanılmaktadırlar.

Çoğu ticari güneş koruyucular UVB ışınlarına karşı mükemmel koruma sağlar, ancak bunların hepsi UVA radyasyona karşı eşit derecede etkili değildir. Öte yandan UVA filtrelerinin çoğu, UVB radyasyonun bir kısmını emer. Bazı filtreler ise hem UVA hem UVB radyasyonu emer. Örneğin, terephtalylidene dikamfor sülfonik asit (Mexoryl SX) dayanıklı fotostabiliteye sahiptir ve sık sık Avobenzon ile formülasyonlarına dahil edilerek geniş spektrumlu bir güneş kremi oluşturur. İnsanlarda Mexoryl SX; UVA maruziyeti ve pigmentasyon, epidermal hiperplazi, deri hidrasyon azalması ve elastikiyet gibi zararlı etkilerinden korur (Gonzalez ve ark. 2008).

Güneş kremlerinde aktif maddeler dünya genelinde önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Aktif maddelerin izin verilen maksimum konsantrasyonları bile ulusal düzenleyiciler arasında değişkenlik göstermektedir. AB'de kozmetik ürünlerde izin verilen ultraviyole filtrelerin listesi son 20 yılda düzenli olarak güncellenmiştir. Şu anda listelenen 27 farklı güneş koruyucusu vardır. Avustralya'da 28 farklı güneş koruyucuları onaylanmış ve dört ek madde ise şu anda inceleme altındadır. Buna karşılık, ABD'de yeni Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) monografında listelenen sadece 16 maddedir. 1978 yılından bu yana, FDA sadece listeye ek olarak Avobenzon, Çinko oksit ve 2006'da Mexoryl SX (Ekamsul) ekledi. Çünkü; ABD'de, güneş koruyucu aktif maddeler ilaçlar gibi kabul edilmektedir (Lautenschlager ve ark. 2007). Buna ek olarak, butil metoksi dibenzoil metan (BMDM) olarak da adlandırılan, Avobenzonun kullanımında bazı sınırlamalar vardır. Avobenzonun konsantrasyonu % 3 ile sınırlandırılmıştır ve titanyum dioksit (TiO₂) veya enzulizole gibi UV filtreleri ile kombinasyonlarına izin verilmez (Fourtanier ve ark. 2011).

Çizelge 2.4. Avustralya, Avrupa Komitesi (EC) ve ABD (Gıda ve İlaç İdaresi monografi)'de güneş koruyucularda aktif madde kullanımına izin verilen ajanlar (Lautenschlager ve ark. 2007)

UVB filtreleri	Eş anlamlısı,kısaltması,ticari adı	Maximum konsantrasyon	izin verilen
*PABA türevleri			
4-Aminobenzoik asit	PABA	5%,*15%±	EC,USA,AUS
Padimat O	2 Etilhekzil 4 dimetil aminno benzoat, Oktildimetil PABA, ED PABA	8%	EC,USA,AUS
Etoksilli etil 4-benzoik asit	PEG-PABA,Uvinul P25,Unipabol U17	10%	EC,AUS
2,4,6-Triamilino- (p-karboetilhekzil-1-oksi) -1,3,5 triazin	Oktiltriozin,etilhekzil triazon,ET, Uvinul T150	5%	EC,AUS
*Sinnamatlar			
Etilhekzil metoksisinnamat	Oktil metoksi sinnamat, EMC(OMC) Escalol 557 Eusoleks 2292, Parsol MCX	7-5±-10%*+	EC,USA,AUS
Cinoxate	2-Etoksietil p-metoksisinnamat	3±6%+	USA,AUS
İzopentenil- 4 - metoksisinnamat	İzoamil 4 – metoksisinnamat, IMC,Neo Helipan E1000	10%	EC,AUS
*Salisilatlar			
2 - Etilhekzil salisilat	Oksisalisilat, oktisal, ES(OS) Escalol 587,Neo Helipan OS	5%	EC,USA,AUS

Çizelge 2.4. Avustralya, Avrupa Komitesi (EC) ve ABD (Gıda ve İlaç İdaresi monografi)'de güneş koruyucularda aktif madde kullanımına izin verilen ajanlar (devam)

	Eş anlamlısı,kısaltması,ticari adı	Maximum konsantirasyon	izin verilen
UVB filtreleri			
Homosalat	Homometil salisilat, HMS	10*-15%+	EC,USA,AUS
Trolamin salisilat	Trietanolamin salisilat	12%	USA,AUS
*Kafurlar			
Benziliden kafur sulfonik asit	BCSA, Mexoryl SD-20, Unisol-S22	16%	EC
3- Benzil kafur	BC,Mexoryl SD-20, Unisol-S22	2%	EC
UVA filtreleri			
*Benzofenonlar			
Benzofenon-3S	Oksibenzon, BENZ-3, Eusolex 4360, Neo Helipan BB, Escalol 567, Uvinul M40	6+-10%*+	EC,USA,AUS
2-Hidroksi-4- metoksibenzofenon 5- sulfonik asit	Sulisobenzon, BENZ-4, UVAsorb S5, Escalol 577	5*-10%+	EC,USA,AUS
Dioksibenzon	Benzofenon-8	3%	USA,AUS
*Diğerleri			
Metil antranilat	Metil-2-aminobenzoat, meradimat	5%	USA,AUS
1-(4-tert-butilfenil)- 3(4metoksifenil) propan	Butil metoksi dibenzoil metan, BMDBM, avobenzon, Parsol1789, Eusolex 9020	3+-5%*+	EC,USA,AUS

ABD tarafından onaylanmış UVA filtrelerinin ve Avrupa’da onaylanmış UVA ve UVB filtrelerinin maximum absorbans değerleri de sırasıyla Çizelge 2.5 ve Çizelge 2.6’da gösterilmektedir:

Çizelge 2.5. FDA (ABD) tarafından onaylanmış UVA-emici özellikteki filtreler (Fourtanier ve ark. 2011)

INCI isim (Diğer isim ya da kısaltması)	Maksimum dalgaboyu absorpsiyonu (nm)
Avobenzon (Butilmetoksidibenzoikmetan)	357
Oksibenzon (benzofenon – 3)	288,329
Sulisobenzon (benzofenon - 4)	325
Meradimat (metil antranilat)	336
Titanyum dioksit (TiO ₂)	295
Çinko oksit (ZnO)	390

INCI: Uluslararası Kozmetik Maddeler isimlendirilmesi.

Çizelge 2.6. Avrupa’da onaylanmış UVA ve UVB emici özellikteki filtreler (Fourtanier ve ark. 2011)

INCI İsim (Diğer isim ya da kısaltması)	Maksimum dalgaboyu absorpsiyonu (nm)
Sulibenzon (bezofenon – 4)	286,324
Drometrisol trisiloksan (DTS)	303,344
Butil metoksi dibenzoil metan (BMDM)	355
Oksibenzon (benzofenon – 3)	288,329
Disodyum fenil dibenzimidazol tetra sülfanat (DPDT)	335
Dietilamino hidroksi benzoil hegzil benzoat (DHHB)	354
Metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBBT)	305,360
Bis-etilheksiloksifenol metoksifenil triazin (BEMT)	310,343
Titanyum dioksit (TiO ₂)	295

Güneş koruyucuların gelişimi tarihsel yönleriyle son zamanlarda gözden geçirilmiştir. 20. yüzyılın başlarında güneş koruyucuların en başarılısı 1935 yılında Eugene Schueller tarafından hazırlanan benzil salisilat içeren, Amber Solaire olmuştur. Kısa bir süre

sonra; sülfonik asit benzilimidazol içeren Delial üretilmiştir. Bugün, topikal güneş kremleri organik ve inorganik ajan olarak iki geniş kategoriye ayrılır.

2.5.2.1. İnorganik UV filtreleri

İnorganik maddeler (titanyum dioksit ve çinko oksit) bir opak bariyer oluşturur ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak, hem yansıma ve hem de absorpsiyon yaparak ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlar. Organik güneş koruyucuları ile karşılaştırıldığında ışık saçılım özellikleri nedeniyle, inorganik ajanların koruyucu etkisi daha azdır. Opak inorganik güneş koruyucuları görünür ışık kaynaklı hastalıklara karşı koruyucu olabilir ve duyarlılık reaksiyonları ile ilgili hiçbir çalışma yoktur. Deri içine, inorganik maddelerin nüfuz etmesine ilişkin endişeler tartışılmıştır ancak in-vivo ve in-vitro çalışmalarda, titanyum dioksit penetrasyonu ve çok az çözünür çinko oksitin sınırlı penetrasyonu ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Lautenschlager ve ark. 2007). Çinko oksit ve titanyum dioksit fotostabildir ve yeterli yansıma elde etmek için kalın bir uygulama gerektirirler (Sambandan ve Ratner 2011). Cilt tahriş edici bir potansiyele sahip değildirler. (Fourtanier ve ark. 2011). Ancak inorganik güneş filtreleri opak olmasından dolayı genellikle kozmetik olarak kabul edilemez. Ama son zamanlarda, mikronizasyon ve kapsülleme gibi modern ilaç yaklaşımları, kaliteli inorganik güneş kremlerinin gelişmesini sağlamıştır. 10-50 nm (mikronize form) parçacık boyutuna düşürülmesi, görünür ışığın az saçılımı ile sonuçlanmakta ve kozmetik açıdan kabul edilebilir bir ürüne yol açmaktadır (Lautenschlager ve ark. 2007). Titanyum dioksit (TiO_2) ya da çinko oksit (ZnO) gibi metal oksitlerin pigment içeren tozları, UVA aralığında koruma seviyesini arttırmak için, organik filtreler ile bir arada uzun yıllardır kullanılmaktadır (Fourtanier ve ark. 2011). Titanyum dioksit üstün UVB koruma sağlar ve kırılma indeksi daha yüksek olduğu için beyaz bir tona sahiptir; çinko oksit ise daha iyi bir UVA koruma sunar. Doğal ten rengine daha yakın olan başka bir fiziksel engelleyici kırmızı renkli demir oksit, genellikle titanyum dioksit ve çinko oksit opaklığını maskelemek için güneş kremlerine eklenir (Sambandan ve Ratner 2011).

Yalnız inorganik maddeler ihtiva eden güneş koruyucular, genellikle çocuklar için önerilmektedir. Çünkü fotoalerjiye neden olmaz ve genotoksik olarak hiçbir in vivo kanıt bulunmamıştır (Lautenschlager ve ark. 2007).

2.5.2.2. Organik UV filtreleri

Organik güneş kremleri ultraviyole radyasyonu emerek hareket ederler. Ultraviyole radyasyon; kimyasal filtrelerin elektronlarını pasif halden uyarılmış duruma geçirir. Kararlı duruma dönerken sıcaklık veya floresan ışığa önemsiz miktarda yayılır. Bu kimyasal ajanlar UVA, UVB veya geniş bant emiciler olarak ayrılır. Etkili olmak için, filtreler; çözülen ya da kolayca ve kalıcı olarak dağılan, ve terleme ya da yüzme sonrası yerinde kalan yapıda olmalıdır. Buna ek olarak, madde, toksik olmamalı ve tahriş veya alerji temasına neden olmamalıdır. UVB absorbanları dünya çapında yaygın olarak kullanılmasına rağmen birçok UVA ve geniş bant absorbanları son yıllarda yeni geliştirilmektedir. Bir güneş kreminin görevi tüm ultraviyole spektrumuna karşı korumak olduğundan, farklı filtrelerin aynı ürün içinde kombine edilmesi gerekir. Genişbant ajanları ve geliştirilmiş fotostabilite için artan ihtiyaç filtrelerin yeniden düzenlenmesini sağlamıştır. Mexoryl SX, geniş spektrumlu ışığa karşı emici ve Mexoryl X, hem UVA hem UVB emicidir; birlikte kullanıldıklarında sinerjistik etki göstermektedir. Tinosorb S; yağda çözünür, UVA aralığında iyi bir emme gösteren geniş spektrumlu bir ultraviyole filtresidir, Avobenzon ve EMC (2-etil p-metoksisinamat), güneş kremlerinin fotoverimliliğini artırmak için başarılı bir şekilde kullanılabilir (Lautenschlager ve ark. 2007). %3 ekamsul, % 10 oktokriolen, %2 avobenzon ve %5 titanyum dioksit içeren bir güneş koruyucu kullanarak yapılan araştırmada; Ekamsul ve Avobenzonun her ikisinin de dahil edildiği güneş koruyucu, sadece bir UVA filtre ihtiva eden formülasyonlar ile karşılaştırıldığında, klinik yarar sağladığı ortaya konmuştur (DeLeo ve ark. 2009). Organik ve inorganik morötesi filtre maddelerinin SPF artırmak için sinerjistik olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Lautenschlager ve ark. 2007).

Kuinolin ve türevleri:

Yapılan bir çalışmada; bir baz molekül olarak kinolini kullanarak yeni güneşten koruyucu kimyasal maddeler sentezlendi. On iki adet kinolin türevleri sentezlenmiştir, bunların dördünde, yaygın geçirgenlik spektrofotometrisi kullanarak in vitro olarak fotokoruyucu bir etkinlik tespit edilmiştir. Çalışmada, bu moleküllerin SPF veya UVAPF açısından tek ya da sinerjistik etki olarak iyi olduğu ve yeni güneş koruyucu ürünler yaratmak için uygun olduğu gösterilmiştir (Polonini ve ark. 2013).

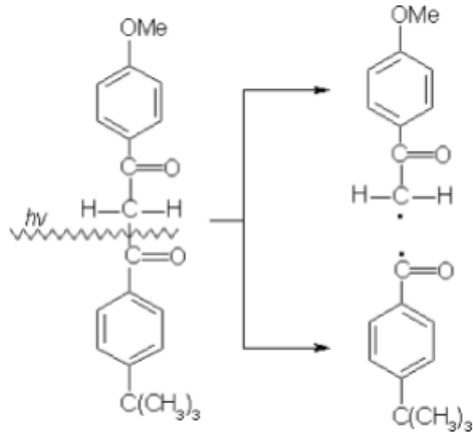
UV filtreleri içeren ürünlerin yüzdesinde yıldan yıla sürekli bir artış gözlenmektedir:

Çizelge 2.7. UV filtrelerinin güneş kremlerindeki analizi (Wang ve ark. 2012)

	1997 anket			2003 anket			2009 anket		
	günlük	dinlenme	toplam	günlük	dinlenme	toplam	günlük	dinlenme	toplam
çinko oksit	18%	0%	3%	37%	63%	100%	57%	43%	100%
avobenzon	0%	2%	2%	31%	27%	29%	43%	67%	54%
avobenzon + oktokriolen	0%	0%	0%	7%	12%	10%	23%	54%	36%
avobenzon + oktinoksat	0%	2%	2%	24%	17%	20%	23%	13%	19%

Avobenzon (Butil metoksidibenzoilmetan(BMDM), Parsol® 1789)

360 nm'de maximum emme sergileyen uzun dalga boylu UVA filtresidir (DeLeo ve ark. 2009). UVA dalgaboyu aralığında 380 nm'ye kadar güçlü Emilimi vardır. Fakat güneş ışığına maruz kaldıktan 1 saat sonra koruma kapasitesinin % 50 ile % 60 oranında azaldığı gösterilmiştir. Avobenzonun ışıkla bozunması sadece ışıktan koruyan gücünü azaltmaz aynı zamanda serbest radikallerin oluşumuyla başlayan bir dizi bozulmuş ürün oluşumuna sebep olur (Şekil 2.15) (Armeni ve ark. 2004). Bu radikaller plasmid DNA'daki, DNA kırıklarının (Damiani et al. 1999) ve sığır serum albümininde (BSA) oksidatif modifikasyonların (Damiani et al. 2000) en olası nedenidir. Ayrıca güneşten koruyucuların foto-ayrışması nedeniyle UV-cilt hasarına karşı koruma etkisi azalabilir (Damiani ve ark. 2006).

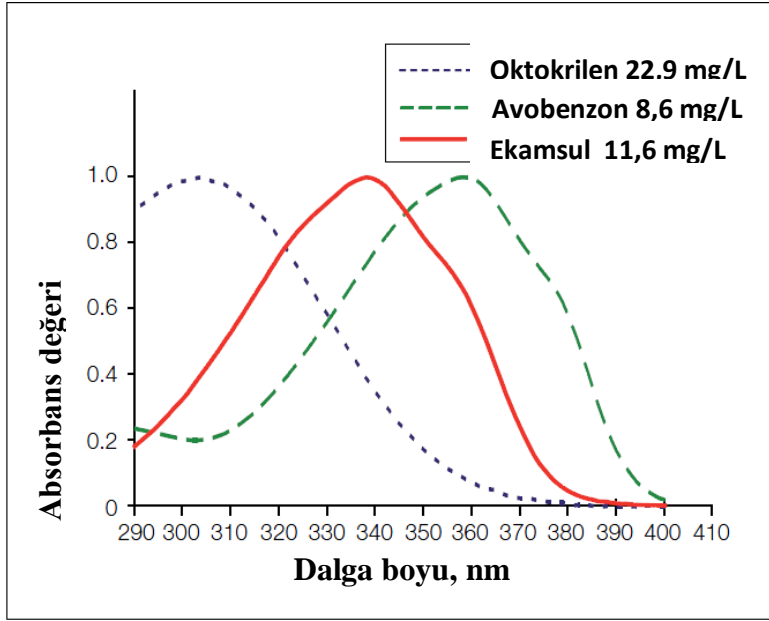


Şekil 2.17. Avobenzonun ışık ile bozulmuş ürün oluşturması (Armeni ve ark. 2004)

Ayrıca, avobenzon fotolabil(ışığa karşı kararsız) olduğundan, fotostabiliteyi arttırmak için sıklıkla oktokrilen, salisilatlar, metilbenziliden kafur, mikronize ZnO ve / veya TiO₂ ile birleştirilir (Kullavanijaya ve Lim 2005).

Oktokrilen (2-etilheksil-2-siyano-3, 3diphenylacrylate)

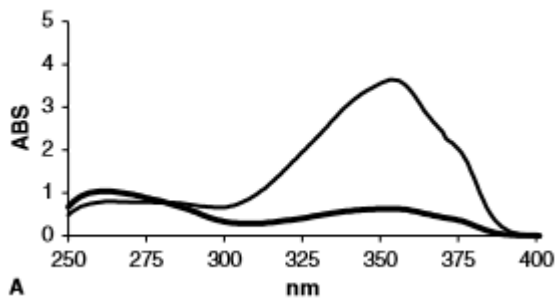
300 ve 310 nm arasında maksimum emme ile UVB koruma sağlar (DeLeo ve ark. 2009). Diğer güneş koruyucularıyla birleştirildiğinde, son oluşan ürünün fotostabilitesini arttırabilir (Kullavanijaya ve Lim 2005).



Şekil 2.18. Oktokrilen avobenzon ve ekamsulun in vitro metodolojisine dayanan spektrofotometrik koruma eğrileri (DeLeo ve ark. 2009)

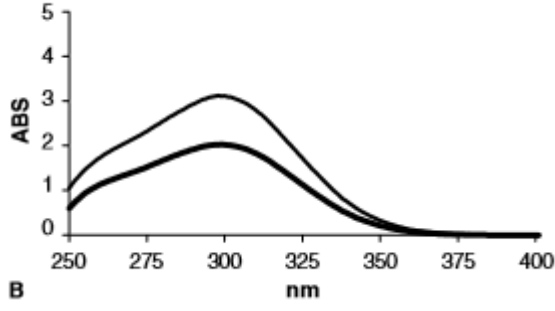
Damiani ve ark. (2006) tarafından yapılan bir deneyde Parsol ve oktokrilen tek başlarına UVA ve UVB'ye maruz bırakılmış, daha sonra ikisi birlikte UVA ve UVB ışınlarına maruz bırakılarak sonuçlar yorumlanmıştır:

Parsol güçlü bir UVA'ya maruz kaldıktan sonra UVA bölgesinde büyük ölçüde güçlü bir emme göstermektedir:



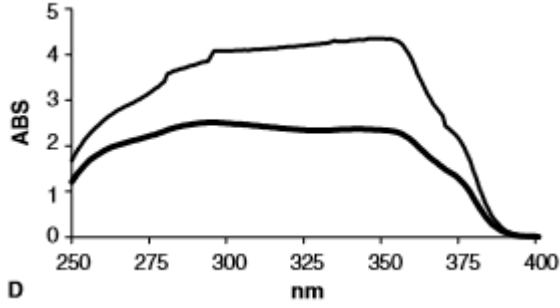
Şekil 2.19. Parsolün emme göstermesi

İstikrarlı bir UVB filtresi olan oktokrilen ile, UVA maruz kaldıktan sonra emilim derecesinde indirgeme Parsol'de olduğu kadar dikkat çekici olmamakta ve herhangi bir değişiklik spektrumu görülmemektedir:



Şekil 2.20. Oktokrilenin emme göstermesi

Oktokrilen varlığı; oldukça Parsol(A)nın tek başına olduğu durumuna kıyasla, UVA'ya maruz kaldıktan (Şekil 2.21) sonra UVA aralığında sadece % 30 azalma görülmekte ve Parsol 1789'un UV-emme kapasitesini arttırmaktadır:



Şekil 2.21. Parsol ve oktokrilenin birlikte emme göstermesi

Şu an piyasada bulunan ve avobenzon ile oktokrilen içeren güneş koruyucuların formülasyonları aşağıda verilmiştir:

Anthelios 40 olarak L'Oréal tarafından reçetesiz pazarlanan La Roche-Posay güneş koruyucu; % 3 ekamsul, % 2 avobenzon, UVB koruması için % 10 oktokrilen, ve UV yelpazesinde koruma sağlayan fiziksel bir filtre olarak % 5 titanyum dioksit içerir (Jancin 2009).

Yine L'Oreal laboratuvarında hazırlanan bazı güneş koruyucu formülasyonlardan; fotostabil ürün, % 15 Miglyol içeren bir yağ-içinde-su emülsiyonu içinde % 1.5 avobenzon, % 2 oktil triazon ve % 5 metilbenziliden kafurdan oluşmaktadır, fotostabil olmayan ürün ise, % 15 vazelin yağı içeren yağ-içinde-su emülsiyonu içinde % 1.5

avobenzon ,% 2 oktil triazon ve % 5 oktil metoksi sinamat ihtiva etmektedir (Marrot ve ark. 2005).

2.6. SPF Belirleme

Güneş koruyucuların SPF'sini belirlemek için farklı yöntemler ve normları vardır. Test yöntemlerinin en önemli parametreleri Çizelge 2.8'de özetlenmiştir ve ABD'deki Food and Drug Administration (FDA), Avrupa'daki Colipa ve Avusturalya/Yeni Zelanda da ki parametreleri içerir. In vitro bir güneş filtresi absorpsiyonu veya aktarımı ile in vivo SPF tahmin etmek için kullanılabilir.

Çizelge 2.8. FDA, COLIPA ve Yeni Zelanda da yayınlanan UV filtrelerin major parametrelerinin karşılaştırılması (Krutmann ve ark. 2009)

	FDA (1999)	AVUSTURYA YENİ ZELANDA STANDARTI (1998)	COLİPA (1994)
Deri fototipi	I, II, III	I, II, III	I, II, III
Test alanı	50cm ² (arka deri)	30 cm ² (arka deri)	30 cm ² (arka deri)
Ürün miktarı	2.0 mg/cm ²	2.0 ±0,1 mg/cm ²	2.0±0,4 mg/cm ²
Uygulama	15 dk	15 dk	15 dk
UV kaynağı ve spektrumu	yapay lamba kaynağı. 290-400nm boyunca devam eden emisyon spektrumu.	yapay lamba kaynağı. 290 ve 320 nm arasında spektrum. spektrum 400nm'ye kadar devam eder.	yapay lamba kaynağı. standart40° enlemine dayalı epidermal etkinliği 290-400nm arasında tanımlanır.

Çizelge 2.8. FDA, COLIPA ve Yeni Zelanda da yayınlanan UV filtrelerin major parametrelerinin karşılaştırılması (devam)

	FDA (1999)	AVUSTURYA YENİ ZELANDA STANDARTI (1998)	COLIPA (1994)
Işık kaynağı filtresi	WG320/1mm artı UG5/1mm veya IG11/1mm	WG320/1mm artı çift renkli veya ısı emici filtre	WG320/1mm artı UG11/1mm
Işık dozunun uygulanması	1cm kalınlığında 5 alan, doz en fazla 1,25	1cm kalınlığında 5 alan, 1,26'dan fazla değil	1cm kalınlığında 5 alan, 1,26'dan fazla değil
UV maruziyetinden sonra MED zamanı belirleme	22 – 24 saat	16 – 24 saat	20 ± 4 saat
SPF hesaplanması	bireysel SPF aritmetik ortalamasından düzeltme faktörü çıkartılması	bireysel SPF'lerin aritmetik ortalaması	bireysel SPF'lerin aritmetik ortalaması

Avrupa Kozmetik, Tuvalet ve Parfümeri Derneği (Colipa), 1994 yılı SPF test yönteminde, UV kaynağının emisyon spektrumunu belirlemek ve kalorimetrik cilt tiplerini seçmek için yeni teknikler tanıtmıştır. Colipa, JCIA ve CTFA-SA 2000 yılında SPF ölçüm metodunun uyum üzerine tartışma başladı. Uluslararası SPF Testi yöntemi üzerinde ortak bir anlaşmaya Ekim 2002'de ulaşıldı (Anonim 2006).

Bir güneş kreminin etkinliği güneş koruma faktörü(SPF) ile ölçülür. SPF, korunan cilt üzerinde UV enerji tarafından oluşan minimal eritem dozu(MEDp)nun, korunmamış cilt üzerinde UV enerji ile oluşan minimal eritem dozu(MEDu)na bölünmesi ile tanımlanır (Krutmann ve ark. 2009).

$$\text{SPF} = \frac{\text{MED (korunmuş cilt)}}{\text{MED (korunmamış cilt)}} = \frac{\text{MEDp}}{\text{MEDu}}$$

Ürünün SPF'si, testte bütün bireylerden alınan tüm geçerli bireysel SPF'i değerlerinin aritmetik ortalamasıdır, ondalık değer olarak ifade edilir. Her bir deneğin cildinin herhangi bir alanı bir koruma olmadan ultraviyole ışığa maruz kalır ve başka bir (farklı) alan bir test güneş koruma ürününün uygulanmasından sonra maruz kalmaktadır. Bundan başka en az bir başka bölge daha, bir SPF referanslı güneş koruyucu formülasyonun uygulanmasından sonra maruz kalmaktadır. Aşamalı olarak UV dozu artırılarak deri eritemin değişen dereceleri oluşturulur. Bu gecikmiş eritemal tepkiler eğitilmiş bir değerlendirici kararıyla, 16 ila 24 saat UV radyasyon sonrası görsel olarak kızarıklık yoğunluğu açısından değerlendirilir. Korumasız cildin minimum eritemal dozu(MEDu) ve bir güneş koruyucu uygulamasından sonra elde edilen minimum eritemal dozu(MEDp) aynı gün aynı konu üzerinde tespit edilmelidir. Birden fazla ürün tek bir testte aynı konuda test edilebilir. Test edilen her konu için ayrı bir güneş koruma faktörü (SPF) MEDp / MEDu oranı olarak hesaplanır. Ürün için güneş koruma faktörü, her denekten alınan tüm geçerli SPF'i sonuçlarının aritmetik ortalamasıdır, ve ondalık olarak ifade edilmelidir. SPF hesaplamada geçerli minimum 10, maximum 20 sonuç kullanılmalıdır. Ortalama SPF için güven sınırları (% 95 Güven Aralığı) ortalama SPF'nin \pm % 17 aralığında olmalıdır. Her test, test formülasyonlarının beklenen SPF'sine bağlı olarak ,uygun bir yüksek veya düşük SPF güneş koruyucu referans formülasyonu içerecektir. Elde edilen SPF, bir SPF güneş koruyucu referans formülasyonu aralığında olmalıdır (Anonim 2006).

Genel Denklemler:

1. Her bir ürünün tek tek aşağıdaki denkleme uygun olarak SPF değeri hesaplanır:

$$\text{SPFi} = \text{MEDpi} / \text{MEDui}$$

2. Ürünün SPF'si toplam denek sayısından(n) elde edilen bireysel SPF'i değerlerinin toplamıdır:

$$SPF = (\sum SPF_i) / n$$

3. Standart sapma(s):

$$s = \sqrt{[(\sum (SPF_i^2) - ((\sum SPF_i)^2 / n)) / (n - 1)]}$$

4. Ortalama SPF için % 95 güven aralığı (%95CI):

$$95\% CI = (SPF - c) \text{ den } (SPF + c) \text{ 'ye kadar olan değer}$$

5. c'nin hesaplanması:

$$c = (t \text{ değeri}) \cdot SEM = (t \text{ değeri}) \cdot s / \sqrt{n}$$

$$c = t \cdot s / \sqrt{n}$$

$$6. CI[\%] = 100 \cdot c / SPF$$

SEM: ortalamanın standart hatası

n: kullanılan deneklerin toplam sayısı

t: t değeri

SPF; UVB ve UVA kısa dalga boylu (320-340 nm) ışınların neden olduğu UV-kaynaklı eriteme karşı bir koruma indeksi sağlar. Bu dalga boyları DNA hasarı ve deri tümörleri başlatmasına neden olacağı için, SPF UV ışınlarına karşı koruma değerleme için iyi bir parametre olarak kabul edilmiştir (Bernerd ve ark. 2003).

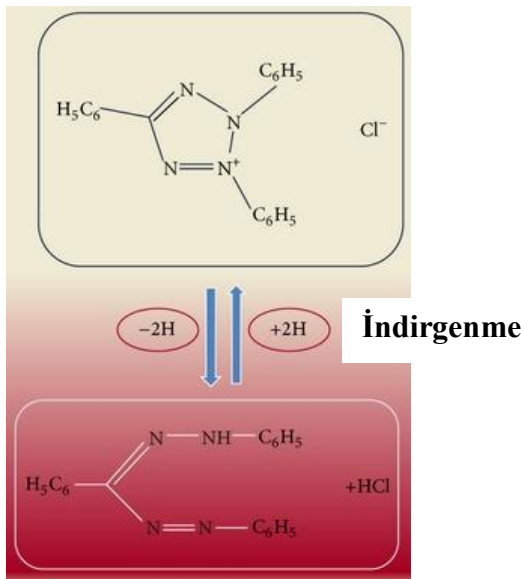
In Vivo SPF test yöntemleri ve in vivo UVA koruma faktörü (UVA-PF) test yöntemleri; insan cildi üzerinde güneş yanığı uyarılması için kullanılan UV dozları nedeniyle fotodegresyonu dikkate alır (Fourtanier ve ark. 2011).

2.7. Toksikite Testleri

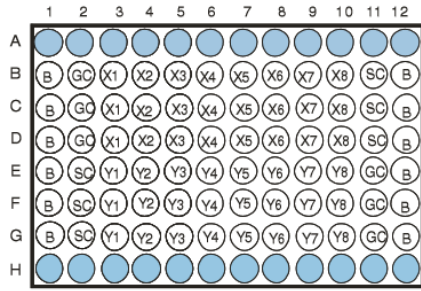
2.7.1. Sitotoksikite Testi

XTT testi

Tetrazolium tuzu olan XTT, 2,3-bis[2-metoksi4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-karboksanilid, yaygın olarak, hücre canlılığı ve proliferasyonu ölçmek için kullanılan test yöntemidir (Berridge ve ark. 2005; Hasen and Bross 2010; Tsukatani ve ark. 2009; Wang ve ark. 2010). Canlılık ve proliferasyon; canlı hücrelerdeki mitokondrial dehidrogenaz enziminin suda çözünen XTT'yi turuncu formazan ürününe indirgenmesine dayanır (Wang ve ark. 2011) (şekil 2.20). Formazan ürün miktarı göreceli hücre canlılığı tahmin etmek için bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Yaygın olarak, bu dönüşüm sadece canlı hücrelerinde meydana gelmektedir (Zhu ve ark. 2004).



Şekil 2.22. XTT tetrazolium tuzunun turuncu renkli formazan ürününe indirgenmesi (Moussa 2013)



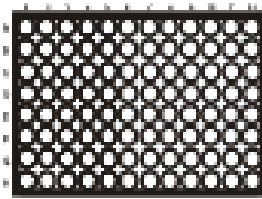
Sıra A ve H: Distile su

B: Hücre olmadan besiyeri

GC: Besiyeri ve hücreler

SC: Besiyeri, hücreler ve çözücü

X ve Y: Dozlar



Hafif sallanır.



Elisa cihazında 450 ve 650 nanometrede absorbands ölçülür.

24 saat süre ile

37 °C %5 inkübatöre atılır.

Şekil 2.23. XTT testi aşamaları

2.7.2. Genotoksisite testi

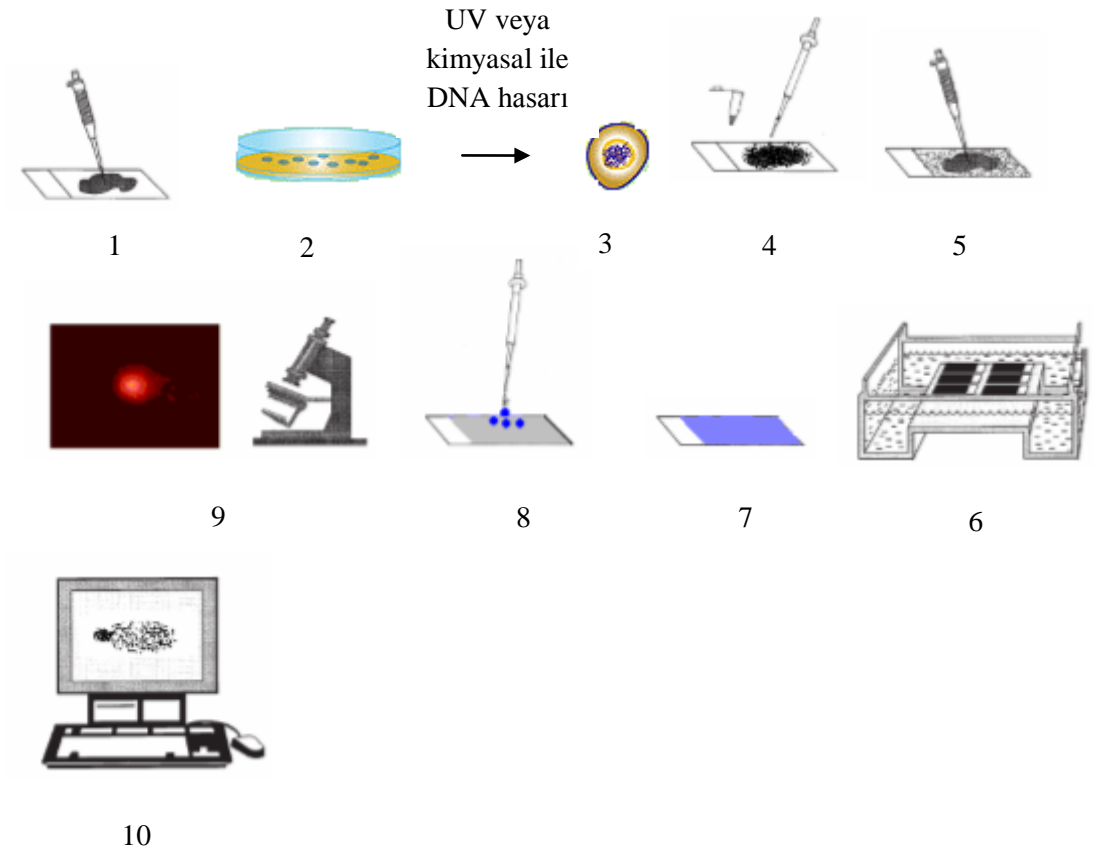
Komet testi

Komet testi ile ilgili bugün ne biliniyorsa kökeni Peter Cook ve arkadaşları tarafından 1970'li yıllarda yapılan çalışmalara dayanır (Collins ve ark. 2013). Spesifik hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlendi. Mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülmüş hücreler hafif alkali ortamda bekletilerek membranların parçalanıp DNA sarmallarının kısmi açılması sağlandı. Daha sonra nötralize edilen hücreler akridin turuncusu ile işaretlendi ve DNA hasarının düzeyi yeşil floresansın kırmızı floresansa oranının fotometrik ölçümü ile belirlendi -

yeşil floresans çift sarmal DNA'yı, kırmızı floresans ise tek sarmal DNA'yı belirtir- (Dinçer ve Kankaya 2010). Daha sonra Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarı değerlendirmek için komet testi geliştirildi ve bu teknik ile deterjan ve yüksek tuz ile hücrelerin çözülmesi ve nötr koşullar altında elektroforeze tabi tutulması sonucu serbest DNA oluşturuldu (Liano ve ark. 2009). DNA miktarı preperatların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir. Ancak burada elektroforezin nötral koşullarda uygulanması yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilemez. Tek sarmal kırıkları tamamlanmamış kesip çıkarma onarım bölgeleri ile apuridik ve apirimidinik bölgelerde olduğu gibi alkali duyarlı bölgelerden kaynaklanmaktadır. 1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir. Günümüzde uygulanan "Comet Assay" Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıkların tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan yöntemdir (Dinçer ve Kankaya 2010).

Komet testi, genotoksik ajanların çeşitli tip ve dozlarına maruz kalan toplumlarda DNA hasarını ölçmek için değerli bir araçtır ve mesleksi ve çevresel maruziyet konusunda 'doz-biyolojik etkisi ' açısından yarar sağlayabilir. Komet testi, sağlık risklerinin erken tespitine yardımcı olabilir. Komet testi ile yapılan çalışmalarda; hava kirliliği, radyasyon ve pestisit maruz kalan insan popülasyonlarında artan DNA hasarı bulunmuştur (Collins ve ark. 2013).

Komet testi aşamaları şekil 2.24'de gösterilmiştir.



Şekil 2.24. Komet analiz çalışmaları (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010)

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

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada güneş kremlerinde kombin olarak bulunan avobenzon ve oktokrilen kimyasal koruyucularının CCD-1094Sk insan sağlıklı deri fibroblast hücreleri üzerindeki, tek başlarına ve kombin dozlarda sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla sitotoksisite testi olarak XTT, genotoksisite testi olarak da tek hücre jel elektroforez (komet) testi kullanılmıştır. Tez çalışması, Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmamızda kullanılan ekipmanların modelleri çizelge 3.1'de, sarf malzemelerin marka ve katalog numaraları çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman

Ekipman	Marka / Model
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Görüntüleme sistemi	KAMERAM
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA – HI 221

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman (devam)

Ekipman	Marka / Model
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CHL
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO
Inverted mikroskop	SOIF
+4°C Standard Buzdolabı	BEKO
Hücre sayım cihazı	ROCHE
Elisa Reader	
96 kuyucuklu plaka	
Saf (Distile) su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Pastör fırını	ELEKTRO-MAG – M 3025P
Elektroforez Tankı	
Elektroforez Tankı Güç Kaynağı	
Canlı hücre sayım cihaz lamı	ROCHE – CEDEX SMART SLIDE
Hücre sayım cihazı ve ucu	MILLIPORE – MA 01821

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma / Katalog No
Oktokrilen	FLUKA 02343
Avobenzon	FLUKA 49858
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml'lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril 15 ml lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Triton X-100	GERBU 2000
EMEM	LONZA BE 12-611F
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
XTT Test Kiti	B1
Etil alkol	AY-KİM
DPBS (500 ml)	SIGMA- ALDRICH A9418
Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
Agaroz	MERCK 1.01236
NaCl ₂ EDTA	MERCK 106404

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler (devam)

Sarf Malzeme	Firma / Katalog No
Tris	SIGMA E5134
NaOH	MERCK 1.08387
Low Melting Agar	SIGMA S8045
Dimetilsülfoksit DMSO	SIGMA A9414
Etidium Bromür	MERCK 1.6743
NEAA (non esansiyel amino asit)	SIGMA E7637
Trypan Blue	SIGMA T8154

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1.Besiyeri hazırlanması

500 ml'lik EMEM medyumuna içine ;

6 ml penisilin-streptomisin,

6ml sodyum pirüvat,

60 ml fetal bovine serum,

3ml L- glutamin veya 6 ml NEAA (non esansiyel amino asit) eklenerek hazırlanmıştır.

3.2.2.Hidrojen Peroksit (H₂O₂) hazırlanması

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

3.2.3.XTT testi

XTT çözeltilisinin hazırlanması

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

3.2.4.Komet testi

Lamlar için agar hazırlanması

0,75 g melting agar ısıtılarak 100 ml distile su içinde çözülmüştür. Lamlar agara batırıldıktan sonra alt yüzeyi silinip kurumaya bırakılmıştır.

Low Melting Agaroz (LMA) hazırlanması

0,48 g PBS 50 ml distile suda çözülmüştür.

Hazırlanan bu PBS çözeltilisinin 10 ml'sinde 0,065 g low melting agaroz çözülmüştür.

Lizis Buffer hazırlanması

2,5 M (29,22 g) NaCl, 100 mM (7,44 g) Na₂EDTA ve 100mM (0,2422 g) Tris 178 ml distile suya eklenerek manyetik karıştırıcıda ısıtmadan karıştırılıp, pH'ı NaOH yardımıyla 10'a ayarlanmıştır. Komet testi sırasında uygulanmadan önce 2 ml Triton X 100 ve 20 ml DMSO eklenmiştir.

Elektroforez solüsyonu olan Running Buffer hazırlanması

0,56 g Na₂EDTA ve 18 g NaOH 1500 ml distile suya eklenmiş ve pH'ı 13'e ayarlanıp +4 °C'de saklanmıştır.

Nötralizasyon çözeltilisinin hazırlanması

100 ml distile suya 4,8456 g tris tartılıp karıştırılmıştır ve pH'ı HCl yardımıyla 7,5'a ayarlanmıştır.

Etidium Bromür boyama çözeltisinin hazırlanması

0,1 ml etidium bromür 100 ml distile suda çözülmüştür, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklanmalıdır.

3.3. Çalışma Planı

Güneş kremlerinin içinde UVA filtresi olarak bulunan avobenzon ve UVB filtresi olarak bulunan oktokriolen ile tek başlarına ve kombine olarak muamele edilen deri fibroblast hücrelerinde XTT testi ve Komet testleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı ve Pasajlanması

Çalışmada CCD-1094Sk insan deri fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin ATCC katalog numarası CRL 2120'dir.

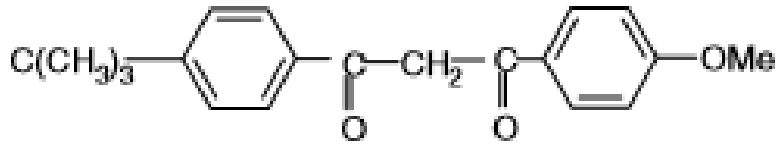
1. T-75 flaskta bulunan kültürün besiyeri aspirasyon yöntemi ile uzaklaştırılmıştır.
2. Flaskın tabanı 5-6 ml PBS ile yıkanmış ve PBS aspire edilmiştir.
3. 4-5 ml tripsin (%0,25'lik) ile 2 dk 'yı geçmeyecek şekilde beklenmiştir.
4. İvert mikroskopta hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı kontrol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

3.3.2. Çalışmada kullanılan UVA ve UVB filtrelerinin özellikleri ve hazırlanışı

Avobenzon (Butil metoksidibenzoilmetan(BMDM), Parsol 1789)

Ma: 310,39 g/mol

Solvent: DMSO



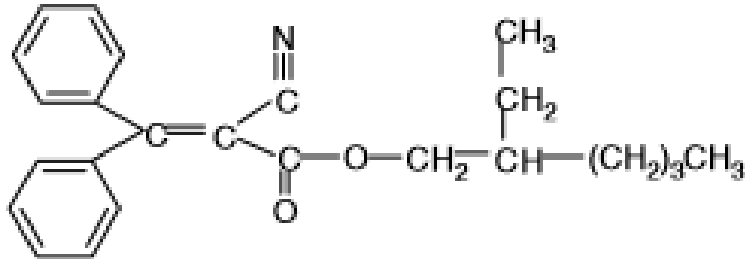
Şekil 3.1. Avobenzonun kimyasal yapısı (Damiani ve ark. 2006)

0,001 g avobenzon tartılıp, 100 µl %100 DMSO'da çözüldü.

Oktokrilen (2-etilheksil-2-siyano-3, 3diphenylacrylate)

Ma: 361,48 g/mol

Solvent: dH₂O (distile su)



Şekil 3.2. Oktokrilenin kimyasal yapısı (Damiani ve ark. 2006)

Viskoz bir madde olduğundan bir miktar oktokrilen serolojik pipetle çekilerek darası alınmış eppendorfa konulup tartıldı.

Yoğunluk(d): 1,051g/ml'den hesaplama yapılarak yeterli miktar distile suda çözüldü.

3.3.3. Çalışmada kullanılan kontrol ve doz grupları

Kontrol grupları

Pozitif Kontrol (PK): Kullanılan test yöntemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını belirlemek için hücreler hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilmiştir.

Büyüme Kontrol (GC): Herhangi bir ajan kullanılmamış olup sadece hücreler ve besiyeri kullanılmıştır.

Solvent Kontrol (SK): Besiyeri, hücre ve oktokrilen için dH₂O, avobenzon için DMSO kullanılmıştır.

Doz grupları

Çizelge 3.3. XTT testinde kullanılan avobenzon dozları

32 µM	200 µM
65 µM	400 µM
130 µM	800 µM

Çizelge 3.4. XTT testinde kullanılan oktokrilen dozları

130 µM	2600 µM
260 µM	3900 µM
750 µM	5200 µM
1300 µM	6500 µM
1950 µM	

Çizelge 3.5. Komet testinde avobenzon ve oktokrilenin tek başına ve kombin dozları

Avobenzon dozları	Oktokrilen dozları	Kombin dozlar
100 µM (IC50)	1390,955 µM (IC50)	IC25 + IC25
50 µM (IC25)	695,477 µM (IC25)	IC12,5 + IC12,5
25 µM (IC12,5)	347,738 µM (IC12,5)	

3.3.4. XTT testi

Yapılan bu test, güneş kremlerinin içinde UV foto koruyucu olarak bulunan avobenzon ve oktokrilenin sitoksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Test protokolü;

1. 96 kuyucuklu plakanın ilk ve son sırası boyunca 100µl distile su eklenir.
2. Blanklar dahil olmak üzere diğer tüm kuyucuklara 100 µl besiyeri eklenmiştir.
3. Blanklar dışındaki besiyeri içeren her bir kuyucuğa 4000'er hücre ekilmiştir.
4. Hücreler 37 °C'de, % 5 CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir.
5. Ekimden 3 gün sonra çizelge 3.3 ve çizelge 3.4'de belirlenen miktarda dozlama yapılmıştır ve plaka tekrar inkübatöre kaldırılmıştır.
6. 24 saat sonunda kuyucuklar aspire edilip PBS ile yıkanması sonrası kuyucuklara besiyeri eklenmiştir.
7. Her bir kuyucuğa 50 µl XTT ölçüm solüsyonu eklenmiştir.
8. XTT solüsyonu konulmasının 2 saat sonrasında Elisa cihazında 450nm ve 630nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.
9. Absorbans sonuçlarına göre % canlılık hesaplanmıştır.

İnhibisyon değeri hesaplanması şöyledir:

$$\text{İnhibisyon} = (1 - \text{inhibisyonu hesaplanan doz ort.} / \text{büyüme kontrol ort.}) * 100$$

$$\% \text{ Canlılık} = 100 - \text{hesaplanan doz inhibisyonu}$$

% canlılık sonucuna göre dağılım grafiği çizilmiştir ve grafik üzerinden 3 nokta seçilmiştir. $Y=aX+b$ formülünde Y yerine 50 yazılarak, X değeri hesaplanmıştır. Böylece IC50 değeri bulunmuştur.

3.3.5. Komet testi

Sitotoksisite testinden elde edilen IC50 değeri kullanılarak deri fibroblast hücrelerine genotoksisite testi olan komet testi uygulanmıştır.

Test protokolü;

1. T-12,5 flasklara 2,5ml besiyeri konulup, içine 54000 hücre atılmıştır.
2. Flasklar hücrelerin çoğalması amacıyla 4 gün boyunca 37 °C, % 5 CO2 inkübatöründe tutulmuştur.
3. Komet testinde kullanılmak üzere agarla kaplı rodajlı lamalar hazırlanmıştır.
4. Hücre çoğalması yeterli olduğunda avobenzon dozları, oktokrilen dozları ve kombin dozlar flasklara dozlanmıştır.
5. Dozlamadan önce gün lizis buffer hazırlanmıştır.
6. Dozlamadan 24 saat sonra hücreler falkon tüpüne toplanıp +4 °C'de, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı aspire edilip, kalan kısım süspansiyon edilmiştir.
7. Santrifüj sırasında LMA hazırlanıp su banyosunda 37 °C'de bulunan ependorfların içine 250 µl aktarılmıştır.
8. Falkonlardaki hücrelerden 100 µl çekip, içinde 250 µl LMA olan ependorfa aktarılmıştır ve süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak agar kaplı lama yayma yapılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır.
9. Hazırlanan preparatlar buz akülerinin üstünde bir müddet soğumaya bırakılmıştır ve sonrasında +4 °C'de 15 dk bekletilmiştir.
10. Soğutucudan çıkarılan preparatların üzerindeki lameller kaydırılarak alınmıştır.
11. Preparatlar alüminyum folyo ile sarılmış olan şaleye dizilip, şale içine lizis buffer solüsyonu konulup bir gece +4 °C'de bekletilmiştir.
11. Lamlar elektroforez tankına dizilmiş ve daha önce hazırlanan Running Buffer solüsyonu lamaların üzerini kaplayacak miktarda tanka dökülmüştür.
12. 20 dk bekleme süresi sonunda güç kaynağı çalıştırılmış ve 25 V, 300 mA'da 25 dk yürütme yapılmıştır.
13. Lamlar toplanıp alüminyum folyo ile sarılı şaleye dizilmiştir ve şale içine nötralizasyon sıvısı konularak +4 °C'de 5dk bekletilmiştir.

14. Süre sonunda lamlar soğuk distile su ile yıkanıp havada kurumaya bırakılmıştır.
15. Kuruma sonrası lamlar soğuk etanolde 5 dk fikse edilerek yine kurumaya bırakılmıştır.
16. İşlemler tamamlandıktan sonra komet lamları etidyum bromür (0,1 ml EtBr çekilip 100ml suya karıştırılmıştır.) ile 1 dk süre ile boyanmış ve üzeri lam ile kapatılmıştır.
17. Floresan mikroskopta 40X büyütmede her lamdan 100 hücre sayılarak ve fotoğraflanarak komet yazılımı ile değerlendirme yapılmıştır.
18. Çalışmada; hücrelerin kuyruk %DNA, Kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momenti değerleri saptanıp istatistiksel analizler SPSS programı ile yapılmıştır.

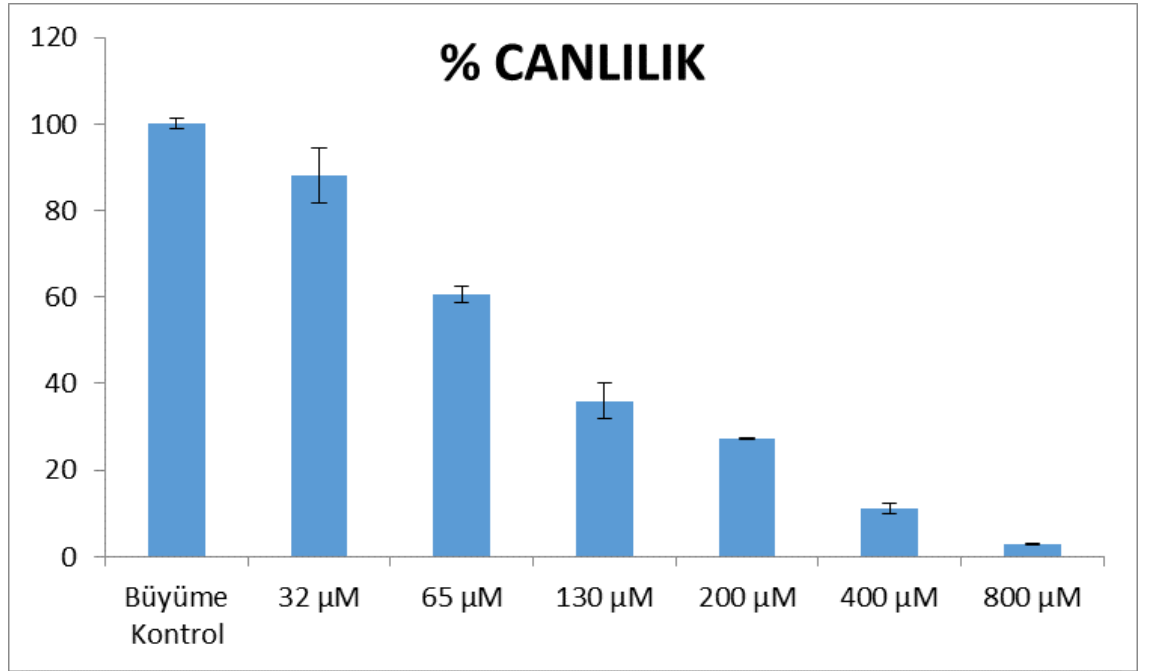
4. BULGULAR

4.1. XTT test bulguları

Çalışmada kullanılan ve güneş kremleri içerisinde kombin olarak bulunan avobenzon ve oktokrilen moleküllerinin IC50 doz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla SF hücrelerine XTT testi uygulanmıştır.

XTT test sonuçlarına göre; avobenzon için IC50 değeri 100,2 μM , oktokrilen için IC50 değeri 1390,955 μM olarak bulunmuştur.

XTT testi ile belirlenen avobenzon ve oktokrilenin % canlılık oranı ve standart hata miktarı şekil 4.1 ve şekil 4.2’de gösterilmiştir.

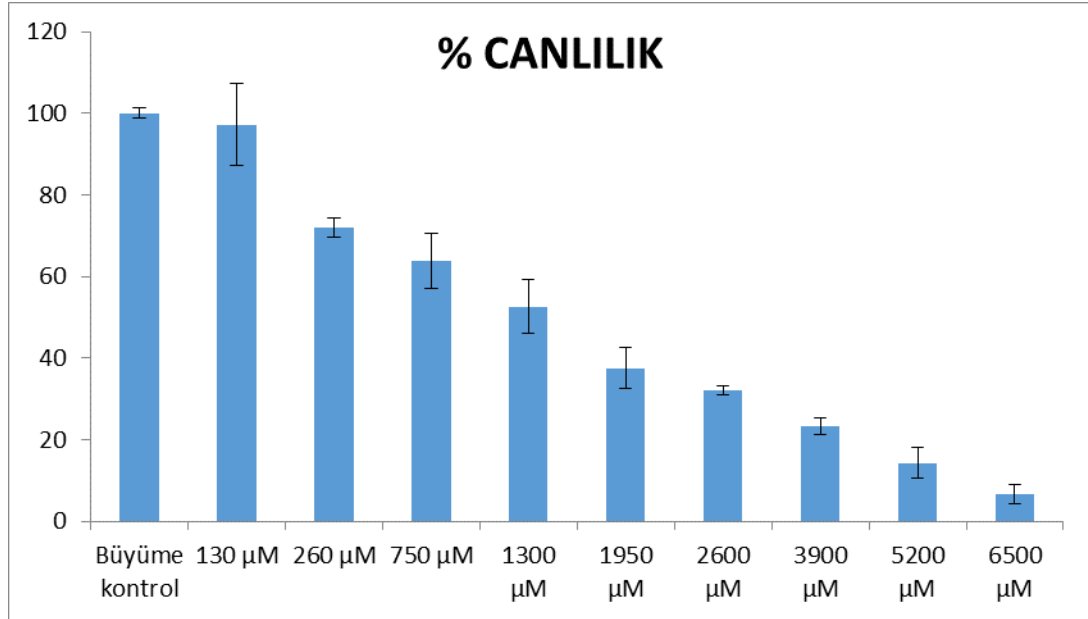


Şekil 4.1. Avobenzonun XTT test sonucu belirlenen % canlılık grafiği (IC50= 100,2 μM)

Şekil 4.1’de avobenzonun skin fibroblast hücreleri üzerindeki XTT testi ile belirlenen canlılık oranları gösterilmektedir. Verilen % canlılık grafiğine göre 32 μM doz canlılığı % 88’e, 65 μM doz canlılığı % 60’a, 130 μM doz canlılığı % 35’e, 200 μM doz canlılığı % 27’ye, 400 μM doz canlılığı % 11’e, 800 μM doz canlılığı % 2’ye kadar düşürmüştür.

Testte % 50 inhibisyona neden olan IC50 dozu 100,2 μM bulunmuştur. Bu sonuca göre

genotoksisite testinde uygulanmak üzere IC50 dozu ve bu dozun yarısı olan IC25 ve onun da yarısı olan IC12,5 olan dozlar seçilmiştir.

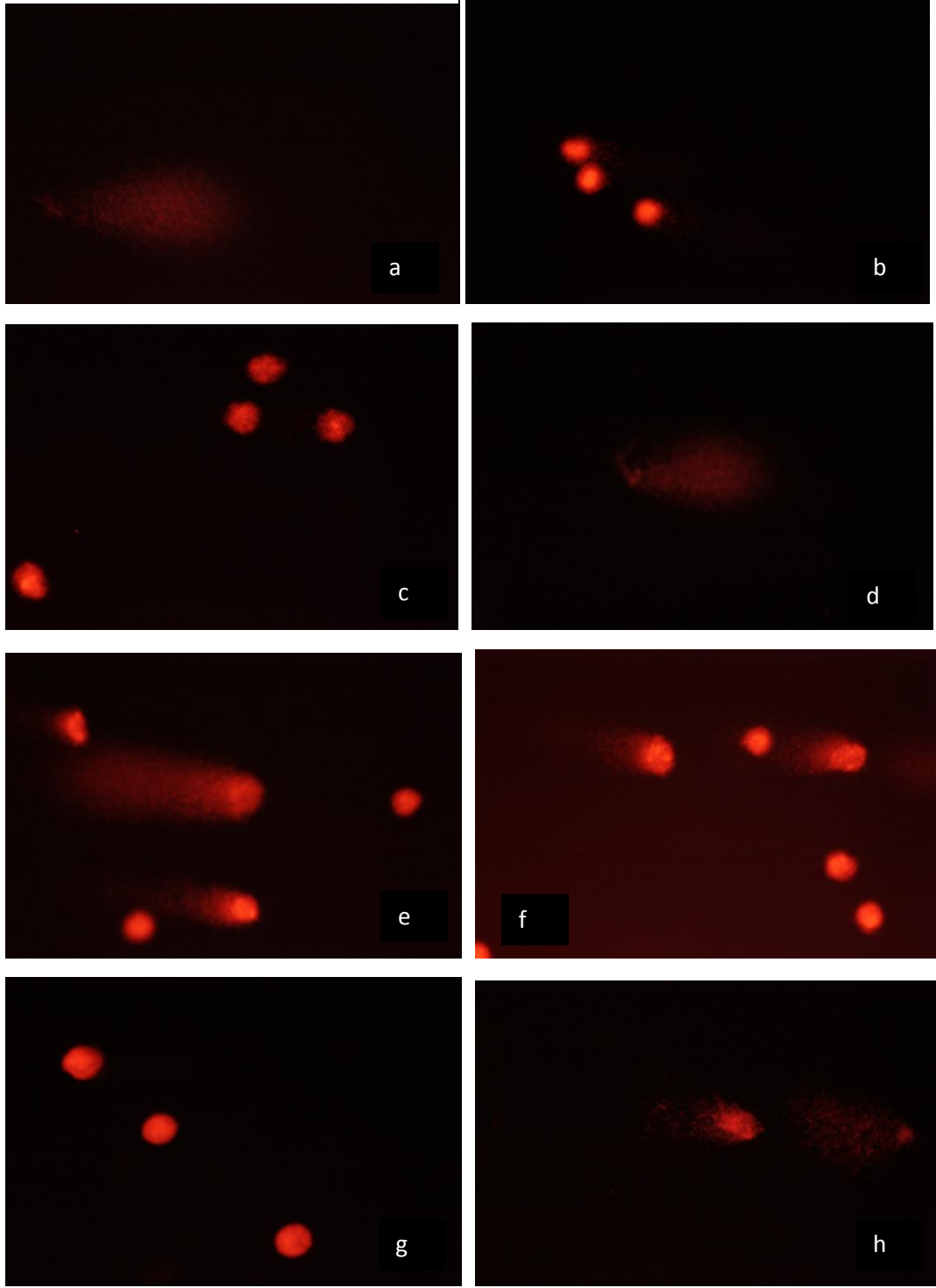


Şekil 4.2. Oktokriolenin XTT test sonucu belirlenen % canlılık grafiği (IC50= 1390,955 µM)

Şekil 4.2’de oktokriolenin skin fibroblast hücreleri üzerindeki XTT testi ile belirlenen canlılık oranları gösterilmektedir. Hazırlanan % canlılık grafiğine göre 130 µM doz canlılığı % 97’ye, 260 µM doz canlılığı % 72’ye, 750 µM doz canlılığı % 63’e, 1300 µM doz canlılığı % 52’ye, 1950 µM doz canlılığı % 37’ye, 2600 µM doz canlılığı % 32’ye, 3900 µM doz canlılığı % 23’e, 5200 µM doz canlılığı % 14’e ve 6500 µM doz canlılığı % 6’ya kadar düşürmüştür. Testte % 50 inhibisyona neden olan IC50 dozu 1390,955 µM bulunmuştur. Bu sonuca göre genotoksisite testinde uygulanmak üzere IC50 dozu, bu dozun yarısı olan IC25 ve onun da yarısı olan IC12,5 olan dozlar seçilmiştir.

4.2. Komet testi bulguları

Komet testi bulguları içinden Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti (OKM) verileri değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil 4.3. Komet testinden elde edilen mikroskobik görüntüler (X20). a) avobenzon IC50, b)avobenzon IC25, c) avobenzon IC12,5, d) oktokrilen IC50 e)oktokrilen IC 25 f) oktokrilen 12,5 g)kontrol h) kombin IC12,5 + IC12,5

Komet testi ile elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri şekil 4.1’de, değerlendirmeye alınan veriler standart hata değerleri ile birlikte çizelge 4.1, çizelge 4.2 ve çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

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

	K.U. ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	6,616 ± 0,916	4,157 ± 0,987	1,027 ± 0,439
Solvent Kontrol	7,233 ± 0,7	6,716 ± 0,581	1,270 ± 0,249
Pozitif Kontrol	20,321 ± 3,109	11,542 ± 1,956	5,405 ± 1,261
IC 12,5	9,706 ± 1,312	7,291 ± 1,410	1,913 ± 0,575
IC 25	10,076 ± 1,631	4,821 ± 0,753	1,448 ± 0,395
IC 50	16,464 ± 2,862	11,602 ± 2,158	4,712 ± 1,275

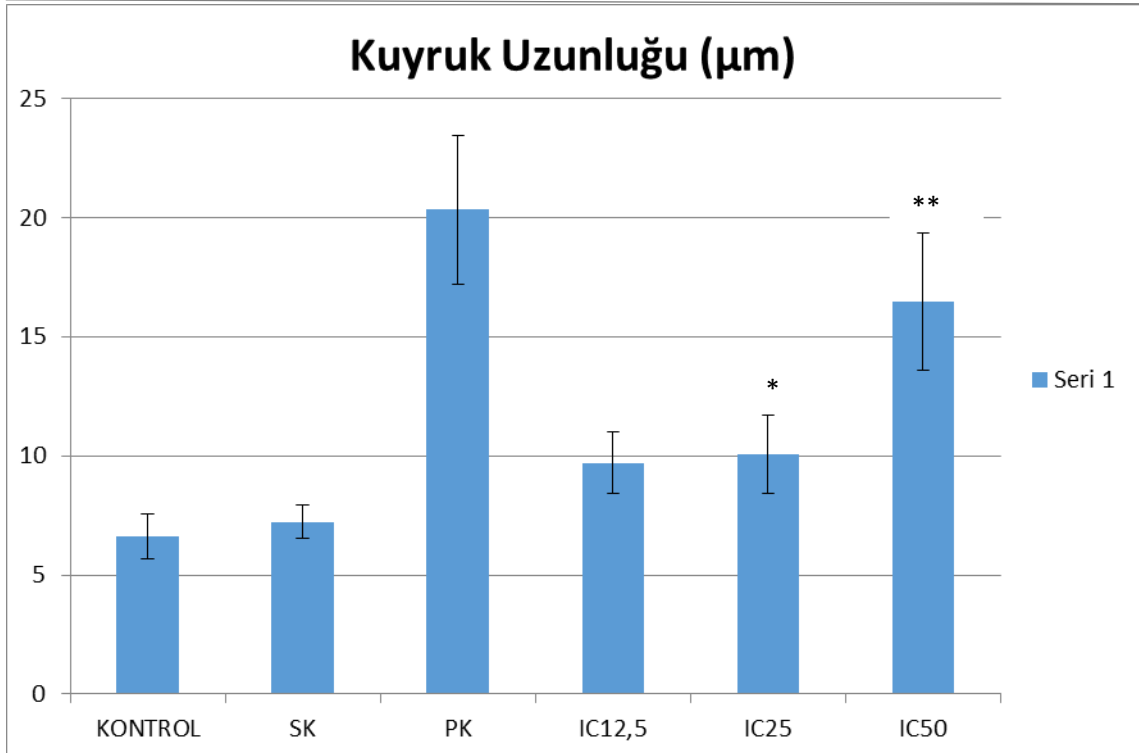
Çizelge 4.2. Oktokrilen için komet testi ortalama değerleri

	K.U. ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	6,616 ± 0,916	4,157 ± 0,987	1,027 ± 0,439
Solvent Kontrol	5,048 ± 0,810	2,712 ± 0,442	0,578 ± 0,175
Pozitif Kontrol	20,321 ± 3,109	11,542 ± 1,956	5,405 ± 1,261
IC 12,5	13,288 ± 1,904	9,264 ± 1,367	3,002 ± 0,601
IC 25	18,962 ± 3,071	10,337 ± 1,823	4,946 ± 1,350
IC 50	22,443 ± 3,220	17,356 ± 2,691	7,551 ± 1,573

Çizelge 4.3. Avobenzon ve oktokrilen kombin dozları için komet testi ortalama değerleri

	K.U. ± S.H. (µm)	K.% DNA ± S.H.	OKM ± S.H.
Büyüme Kontrol	6,616 ± 0,916	4,157 ± 0,987	1,027 ± 0,439
IC 12,5 + IC 12,5	14,183 ± 2,186	15,01 ± 2,789	4,78 ± 1,179
IC 25 + IC 25	26,257 ± 1,996	22,927 ± 2,106	7,107 ± 0,821

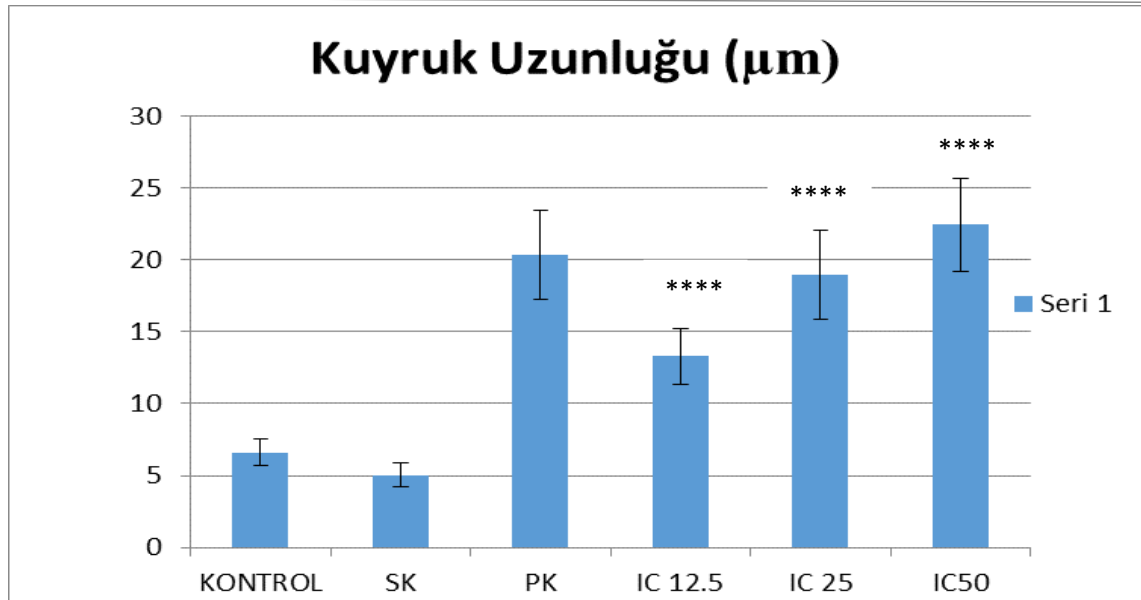
Bu parametreler içerisinde avobenzona ait kuyruk uzunluğu değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.4’de, oktokrilene ait kuyruk uzunluğu değerinden elde edilen grafik şekil 4.5’de ve avobenzon ve oktokrilene kombin dozlarına ait kuyruk uzunluğu değerinden elde edilen grafik şekil 4.6’da gösterilmiştir. Kuyruk Uzunluğu bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.4. Avobenzon için komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri (Solvent kontrole göre fark * $P \leq 0,01$, ** $P \leq 0,05$)

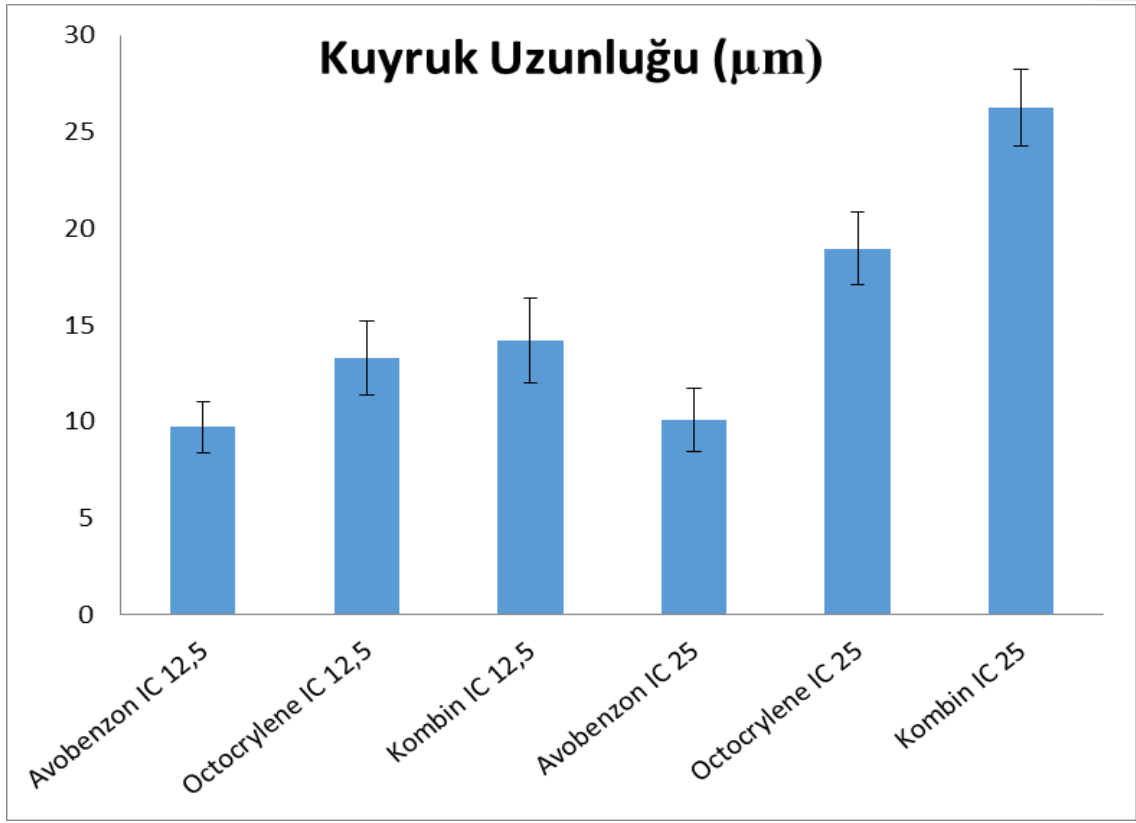
Avobenzon solvent kontrol grubunda Kuyruk Uzunluğu değeri $7,233 \pm 0,7$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $9,706 \pm 1,312$; $10,076 \pm 1,631$ ve $16,464 \pm 2,862$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5 dozunda $9,706 \pm 1,312$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). Avobenzon IC25 dozunda $10,076 \pm 1,631$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,01$). Avobenzon IC50 dozunda $16,464 \pm 2,862$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu

değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.5. Oktokrilen için komet testi kuyruk uzunluğu (μm) değerleri (Solvent kontrole göre fark **** $P \leq 0,0001$)

Oktokrilen solvent kontrol grubunda Kuyruk Uzunluğu değeri $5,048 \pm 0,810$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $13,288 \pm 1,904$; $18,962 \pm 3,071$; $22,443 \pm 3,220$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5 dozunda $13,288 \pm 1,904$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC25 dozunda $18,962 \pm 3,071$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC50 dozunda $22,443 \pm 3,220$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).



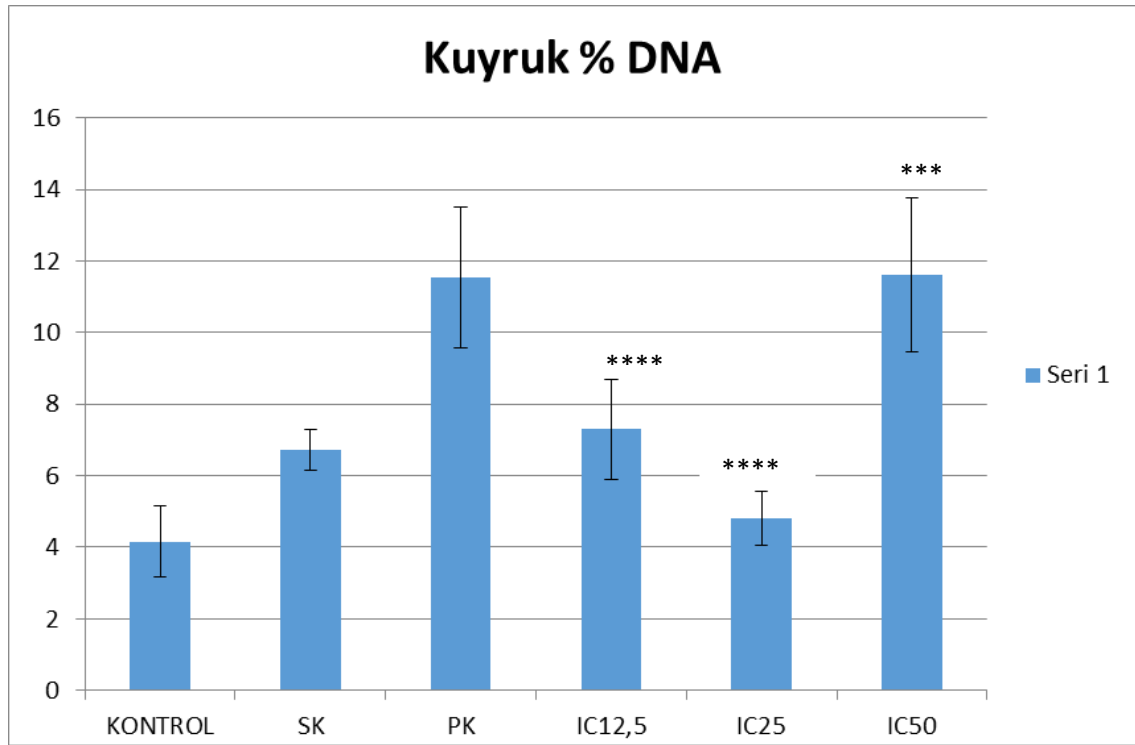
Şekil 4.6. Avobenzon ve oktokrilenin tek doz ve kombin dozları için komet testi kuyruk uzunluğu (µm) değerleri

Avobenzon IC12,5 ve IC25 dozu Kuyruk Uzunluğu değeri sırasıyla $9,706 \pm 1,312$ ve $10,076 \pm 1,631$ bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 + oktokrilen IC12,5 kombin dozu Kuyruk Uzunluğu değeri $14,183 \pm 2,186$ ve avobenzon IC25 + oktokrilen IC25 kombin dozu kuyruk uzunluğu değeri $26,257 \pm 1,996$ bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 dozunda $9,706 \pm 1,312$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri $14,183 \pm 2,186$ olarak belirlenen kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). Avobenzon IC25 dozunda $10,076 \pm 1,631$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri $26,257 \pm 1,996$ olarak belirlenen kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).

Oktokrilen IC12,5 ve IC25 dozu Kuyruk Uzunluğu değeri sırasıyla $13,288 \pm 1,904$ ve $18,962 \pm 3,071$ olarak bulunmuştur. Oktokrilen IC12,5 dozunda $13,288 \pm 1,904$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri $14,183 \pm 2,186$ olarak belirlenen kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).

Oktokrilen IC25 dozunda $18,962 \pm 3,071$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk Uzunluğu değeri $26,257 \pm 1,996$ olarak belirlenen kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).

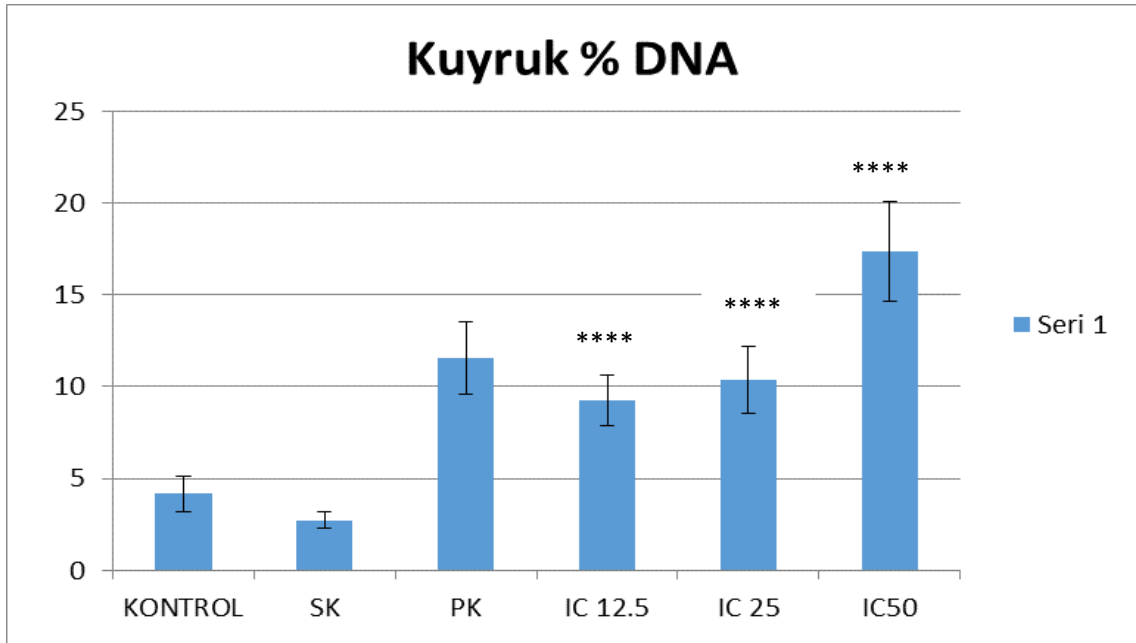
Komet testinde ölçülen parametreler içerisinde avobenzona ait kuyruk % DNA değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.7’de, oktokrilen ait kuyruk % DNA değerinden elde edilen grafik şekil 4.8’de ve avobenzon ve ile kombinlenmiş oktokriline ait kuyruk % DNA değerinden elde edilen grafik şekil 4.9’da gösterilmiştir. Kuyruk % DNA bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.7. Avobenzon için komet testi kuyruk %DNA değerleri (Solvent kontrole göre fark *** $P \leq 0,001$ **** $P \leq 0,0001$)

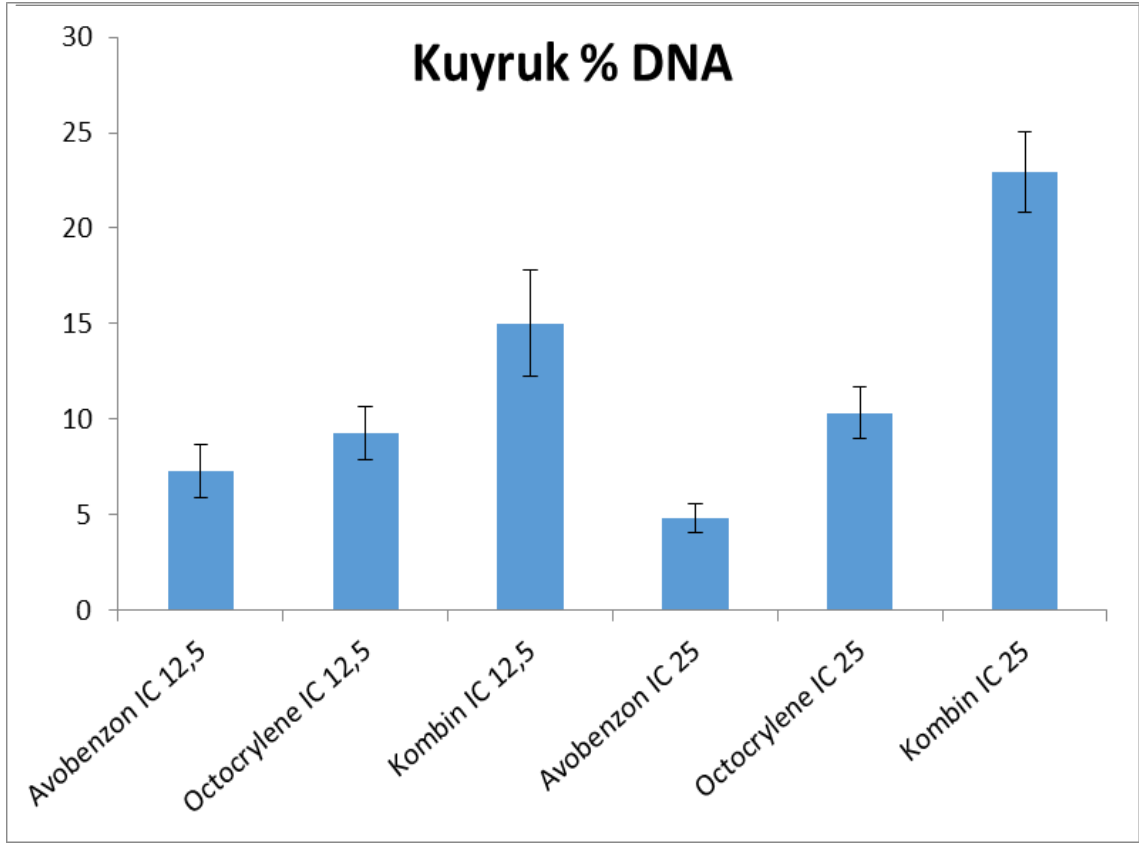
Avobenzon solvent kontrol grubunda kuyruk % DNA değeri $6,716 \pm 0,581$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $7,291 \pm 1,410$; $4,821 \pm 0,753$ ve $11,602 \pm 2,158$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5 dozunda $7,291 \pm 1,410$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Avobenzon IC25 dozunda $4,821 \pm 0,753$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Avobenzon IC50 dozunda $11,602 \pm 2,158$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).



Şekil 4.8. Oktokrilen için komet testi kuyruk %DNA değerleri (Solvent kontrole göre fark **** $P \leq 0,0001$)

Oktokrilen solvent kontrol grubunda kuyruk % DNA değeri $2,712 \pm 0,442$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $9,264 \pm 1,367$; $10,337 \pm 1,823$ ve $17,356 \pm 2,691$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5 dozunda $9,264 \pm 1,367$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC25 dozunda $10,337 \pm 1,823$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC50 dozunda $17,356 \pm 2,691$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).



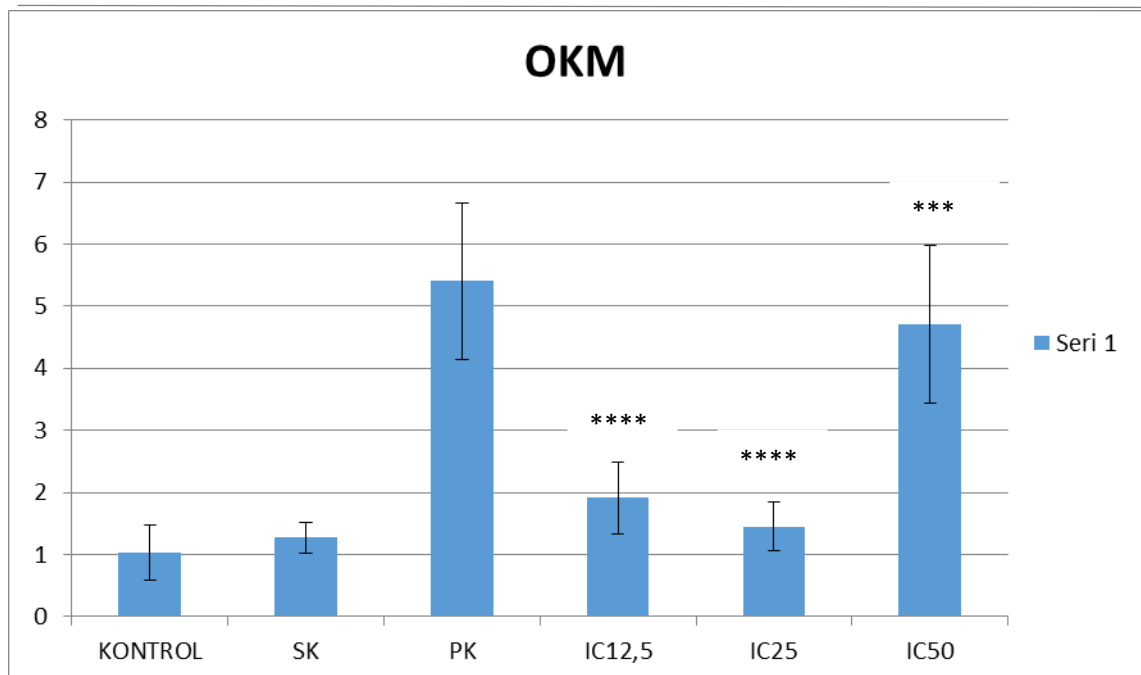
Şekil 4.9. Avobenzon ve oktokrilenin tek ve kombin dozlarını için karşılaştırmalı komet testi kuyruk %DNA değerleri

Avobenzon IC12,5 ve IC25 dozu kuyruk % DNA değeri sırasıyla $7,291 \pm 1,410$ ve $4,821 \pm 0,753$ bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 + oktokrilen IC12,5 kombin dozu kuyruk % DNA değeri $15,01 \pm 2,789$ ve avobenzon IC25 + oktokrilen IC25 kombin dozu kuyruk % DNA değeri $22,927 \pm 2,106$ bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 dozunda $7,291 \pm 1,410$ olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri $15,01 \pm 2,789$ olarak belirlenen kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). Avobenzon IC25 dozunda $4,821 \pm 0,753$ olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri $22,927 \pm 2,106$ olarak belirlenen kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,005$).

Oktokrilen IC12,5 ve IC25 dozu kuyruk % DNA değeri sırasıyla $9,264 \pm 1,367$ ve $10,337 \pm 1,823$ olarak bulunmuştur. Oktokrilen IC12,5 dozunda $9,264 \pm 1,367$ olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri $15,01 \pm 2,789$ olarak belirlenen kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC25 dozunda $10,337 \pm 1,823$ olarak belirlenen ortalama kuyruk

% DNA değeri $22,927 \pm 2,106$ olarak belirlenen kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).

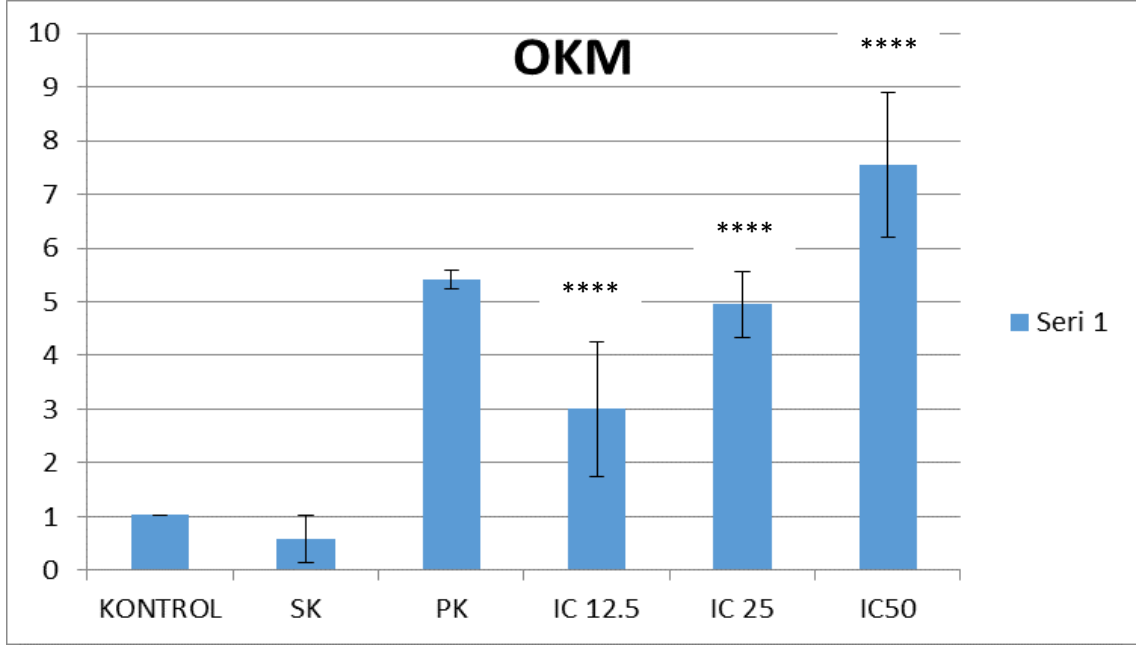
Komet testinde belirlenen parametreler içerisinde avobenzona ait OKM değerlerinden elde edilen grafik şekil 4.10'da, oktokrilen ait OKM değerinden elde edilen grafik şekil 4.11'de ve avobenzon ve oktokrilenin kombin dozlarına ait OKM değerinden elde edilen grafik şekil 4.12'de gösterilmiştir. Olive kuyruk momenti bakımından tüm gruplar kendi aralarında Man Whitney U testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.10. Avobenzon için komet testi OKM değerleri (Solvent kontrole göre fark *** $P \leq 0,001$ **** $P \leq 0,0001$)

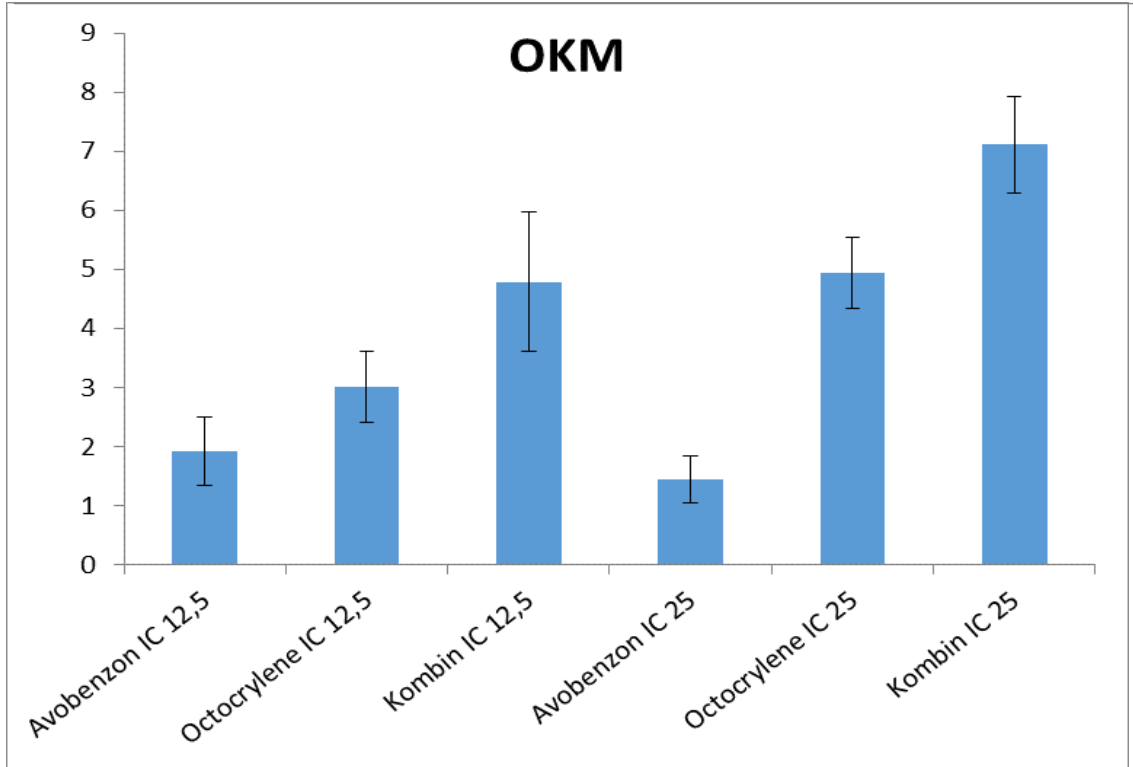
Avobenzon solvent kontrol grubunda OKM değeri $1,270 \pm 0,249$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $1,913 \pm 0,575$; $1,448 \pm 0,395$ ve $4,712 \pm 1,275$ olarak belirlenmiştir. Avobenzon IC12,5 dozunda $1,913 \pm 0,575$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Avobenzon IC25 dozunda $1,448 \pm 0,395$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Avobenzon IC50 dozunda

4,712 ± 1,275 olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,001$).



Şekil 4.11. Oktokrilen için komet testi OKM değerleri (Solvent kontrole göre fark **** $P \leq 0,0001$)

Oktokrilen solvent kontrol grubunda OKM değeri $0,578 \pm 0,175$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5, IC25, IC50 dozlarında ise sırasıyla $3,002 \pm 0,601$; $4,946 \pm 1,350$ ve $7,551 \pm 1,573$ olarak belirlenmiştir. Oktokrilen IC12,5 dozunda $3,002 \pm 0,601$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC25 dozunda $4,946 \pm 1,350$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC50 dozunda $7,551 \pm 1,573$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri solvent kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).



Şekil 4.12. Avobenzon ve oktokrilen kombin dozları için komet testi OKM değerleri

Avobenzon IC12,5 ve IC25 dozu kuyruk OKM sırasıyla $1,913 \pm 0,575$ ve $1,448 \pm 0,395$ olarak bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 + oktokrilen IC12,5 kombin dozu OTM değeri $4,78 \pm 1,179$; avobenzon IC25 + oktokrilen IC25 kombin dozu OTM değeri $7,107 \pm 0,821$ bulunmuştur. Avobenzon IC12,5 dozunda $1,913 \pm 0,575$ olarak belirlenen ortalama OTM değeri kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). Avobenzon IC25 dozunda $1,448 \pm 0,395$ olarak belirlenen ortalama OKM kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).

Oktokrilen IC12,5 ve IC25 dozu OKM değeri sırasıyla $3,002 \pm 0,601$ ve $4,946 \pm 1,350$ olarak bulunmuştur. Oktokrilen IC12,5 dozunda $3,002 \pm 0,601$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri kombin IC12,5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$). Oktokrilen IC25 dozunda $4,946 \pm 1,350$ olarak belirlenen ortalama OKM değeri kombin IC25 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı yüksek bulunmuştur ($P \leq 0,0001$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda güneş kremlerinde güneş koruyucu filtre olarak bulunan avobenzon ve oktokrilen maddelerinin CCD-1094Sk insan sağlıklı deri fibroblast hücre hattında oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik etkiler XTT formazan canlılık testi ve komet testi yöntemleriyle araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda bahsedilen iki kimyasal filtrenin CCD-1094Sk deri fibroblast hücrelerinin yarısını öldürdükleri IC50 dozları bulunmuştur. Her kimyasal için IC50 dozu ve altında iki doz seçilip, tek başlarına ve birbirleriyle kombinlenerek çalışmada kullanılmıştır. Tez çalışmasının hipotezine uygun olarak UVA koruyucusu avobenzon UVB koruyucu ve avobenzon stabilize edici oktokrilen ile kombinlendiğinde tek başlarına oluşturduklarına kıyasla sitotoksik ve genotoksik hasar oluşumunu anlamlı oranda arttırmışlardır.

Güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyon, belli ölçüde herkesin cildini etkiler, ancak cildin vereceği tepki kişiden kişiye değişir (Anonim 2012). Güneş ışınlarının zararlı etkileri; UV' ye maruz kalma süresine ve sıklığına, deri rengi ve fototipine bağlıdır (Kaymak ve İter 2010). Son yıllarda yaşam tarzının değişmesi, bronzlaşma modası ve bu deri rengine ulaşmak için bilinçsizce yapılan uygulamalar ve ozon tabakasının incilmesi sonucu UV ışınlarına maruz kalma süresinin artışına paralel olarak ciltte “foto-hasar” dediğimiz belirgin değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Altuntaş ve ark. 2011). Uzun süreli güneş ışığına maruz kalmanın deride eritem, bağışıklığın baskılanması, erken cilt yaşlanması ve cilt kanserine sebep olacağı bilinmektedir (Armeni ve ark. 2004). Doğal güneş ışığı UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (200-280 nm) ve görülebilir ışık (400-700 nm) içermektedir. UVA radyasyonu cildin dermis tabakasına kadar ulaşabilmektedir. UVB radyasyon ise eritema bölgesi olarak bilinen epidermis tabakasında büyük oranda emilerek az miktarda da üst dermis tabakasında kalabilmektedir. UVC radyasyonu ise Dünya yüzeyine erişemeyen radyasyon olarak bilinmektedir (McGregor ve ark. 1996). Ciltteki foto-yaşlanmanın oluşumunda fotonların hücrel DNA'ya direkt etkisiyle birlikte, UVA ve UVB'nin ortaya çıkardığı serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) indirekt etkisinin de sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nükleik asit ve proteinler UVB'yi absorbe eden major hücrel kromoforlardır. Kollajen ve elastindeki çapraz bağlı aminoasitler de UV

radasyonu absorbe ederler. DNA tarafından UVB'nin absorbe olması pirimidin bazıları arasında çapraz reaksiyona neden olurken kromoforlar tarafından UVA'nın absorbe olması ROT üretimine neden olur (Beak ve ark. 2004; Yetkin ve ark. 2009; Deliconstantinos ve ark. 1996). UVA oluşumlu ROT, kollajenin çapraz bağlanmasına neden olur. UV radyasyonundan 6-24 saat sonra epidermin bazal tabakasında doza bağlı mitotik aktivite azalması görülür (Heck ve ark. 2003; Yetkin ve ark. 2009). Bunu keratinosit, melanosit ve fibroblastlarda programlanmamış DNA sentezindeki artış takip eder. Programlanmamış DNA sentezi, DNA'daki UV ile indüklenen pirimidin dimerlerini uzaklaştıran tamir sürecinin sonucudur. Kalan dimerler hücre ölümüne veya hücre fonksiyonunda bozulmaya yol açar (Clydesdale ve ark. 2001). Benzer şekilde, güneşin uzun süreli etkileri sonucunda derinin üst katmanında bulunan DNA'da meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak deri kanserlerine, deri tümörlerine yatkınlık olabilmektedir (Clydesdale ve ark. 2001). Bu yüzden güneş koruyucu filtreler tüm dünyada kullanılmakta ve uzmanlar tarafından bu filtrelerin kullanılması önerilmektedir. Güneş koruyucu olarak hem doğal hem de kimyasal filtreler kullanılabilir. Doğal filtrelerin koruyuculuğunun sınırlı olduğu, kimyasal olanların ise daha etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmada kullandığımız avobenzon ve oktokrilen kimyasal organik filtrelerdir.

Günümüzde güneş koruyuculara, biri UVA bölgesine karşı diğeri UVB bölgesine karşı olmak üzere UV radyasyona karşı koruyan iki filtre kullanılmaya başlanmıştır (Lhiaubet-Vallet ve ark 2010). Geçmiş yıllarda UVA radyasyonunun cilt kanseri etkisi açıkça bilinmediğinden filtrelerde genelde UVB filtresi tek başına kullanılırdı. Ancak hem doğal hem de kimyasal (organik ve inorganik) UVA filtrelerindeki problem çabuk bozunmaları ve dayanıklı olmamalarıdır. Bu sorun hem UVB filtresi olan hem de UVA filtresinin dayanıklılığını sağlayan UVB filtreleriyle kombinlenmiş güneş koruyucuların geliştirilmesiyle çözülmüştür (Bens 2014). İki UV filtre varlığı aktif maddelerin hem performans hem de stabilizasyon ile ilgili olarak sinerjistik etkilerine yol açar. Ancak bu filtreler arasında bir fotoreaksiyon meydana gelirse hızla ayrışmaya neden olabilir. Bu yüzden UV filtre kombinasyonlarının fotokimyasının anlaşılması güneş koruyucularının foto-dayanıklılığının geliştirilmesi açısından önemlidir (Lhiaubet-Vallet ve ark 2010). Güneş koruyucularının uzun süre doğrudan cilt ile temas halinde olması ve yüksek

oranda kimyasal madde içermesi insanlarda sitotoksik ve genotoksik etkiye yol açabilme riskini arttırmaktadır. Bu sebeple, UV absorblayan tüm kimyasalların, katkı maddeleri ya da kozmetik ürünlerinin foto-toksik ve foto-genotoksik potansiyeli için test edilmeleri önerilmektedir (Lelievre ve ark. 2007).

Çalışmada kullandığımız avobenzon UVA radyasyonu aldığı di-keto formundan uyarılmış bir triplet radikal formuna dönüşür bu da hem avobenzonun bozunmasına hem de yakınındaki biyolojik hedeflere enerji aktararak zararlı etkiler oluşturmaya sebep olur (Paris ve ark. 2009). Gerçekten avobenzonun plazmid DNA'da zincir kırıkları oluşumu (Diamiani ve ark. 1999), albüminin oksidatif hasarlanması (Diamiani ve ark. 2000) ve insan keratositlerinde sitotoksikite ve lipid peroksidasyonu (Armeni ve ark. 2004) gibi olası zararlı etkileri az sayıda çalışmada gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında derinin dermis tabakasında bulunan ve kollajen salgılayan fibroblast hücrelerinde avobenzonun sitotoksik etkisini araştırdık. Avobenzonun IC50 konsantrasyonunu 100,2 µM olarak belirledik. Armeni ve ark. (2004)'ın çalışmasında Avobenzonun cilt keratinositlerindeki sitotoksik etkisi belirlenmemekle birlikte 10 µM'dan yüksek dozları sitotoksik olduğu için sadece bu doz ile çalışıldığı görülmektedir. Çalışmamızda avobenzon için belirlenen IC50 dozu ile IC25 ve IC12,5 dozlarını komet testinde kullanılacak dozlar olarak seçtik. Bu üç doz ile yaptığımız alkalın komet testinde avobenzonun seçilen üç komet parametresi olan kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Olive kuyruk momenti yüzdelerini IC25 ve IC50 dozlarında solvent kontrole göre anlamlı oranda arttırdığını belirledik. Alkalın komet testi kimyasal ve fiziksel maruziyet sonucu tek iplik DNA kırıklarını belirlemede yaygın olarak kullanılan bir genotoksikite test yöntemidir (Tice ve ark. 2000). Komet testindeki bulgularımız avobenzonun UVA radyasyonu ile karşılaştığında bir triplet radikal formuna dönüşmesi ve bu sayede kazanacağı oksidatif hasar potansiyeli ile uyumlu görünmektedir. Fibroblast hücreleri dermis tabakasında yer almakla birlikte avobenzonun topikal uygulamadan sonra derinin alt tabakalarına kadar emildiği öne sürülmektedir. Genel olarak avobenzon gibi yağda çözünen UV filtrelerinin cilde uygulandıktan sonra epidermin üst katmanlarınca daha fazla emildiği ancak uygulanan formulasyondaki konsantrasyonlarına bağlı olarak cildin alt katmanlarına ulaşma potansiyellerinin arttığı öne sürülmüştür (Lazar ve ark. 1996). Avobenzonun, insan stratum corneum ve uygun epidermis içine kayda değer miktarda penetre olduğu Scalia arkadaşlarının çalışmasında gösterilmiştir (Scalia ve ark.

2011). Ayrıca avobenzonun ışıkla karşılaştıktan sonra benzil ve arylglyoxal olarak adlandırılan fotodegradasyon ürünlerinin oluştuğu rapor edilmiş ve sitotoksik ve cilt hassaslaştırıcı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Manová ve ark. 2013).

Avobenzonun kullanıldığı formülasyonlarda konsantrasyon aralığı % 1.5 ile % 2 arasında değişmektedir. Çalışmada belirlediğimiz IC50 konsantrasyonu olan 100 µM, 31 µg/ml şeklinde çevrilebilir. Bu miktar 50 gr'lık bir kremin % 0,003' üne denk gelmektedir. Bulduğumuz 31 µg/ml değeri her sürüşte 2 mg/cm² krem kullanıldığını kabul edersek % 2 oranındaki avobenzona (40 µg) oldukça yakın bir değerdir. Bu durumda avobenzonun sitotoksik olduğunu kabul etmekteyiz. Aynı zamanda avobenzonun bu doz ve altındaki dozlarda DNA hasarına yol açtığına görülmesi bu UVA filtresinin güneş koruyucu kremlerde güvenli kullanımının tekrar araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan diğer kimyasal filtre olan oktokrilen bir UVB filtresi iken aynı zamanda avobenzonun dayanıklılığını artırıcı madde olarak (fotostabil) güneş koruyucu kremlerde birlikte kullanılmaktadır. Oktokrilen varlığında avobenzonun UVA ışınına maruz kaldıktan sonra sadece % 30 oranında bozunduğu gösterilmiştir (Damiani ve ark. 2006) (Şekil 2.19). Oktokrilen ile gerçekleştirilen XTT canlılık testi sonucunda IC50 konsantrasyonu 1390,95 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre oktokrilen, CCD-1094Sk deri fibroblast hücrelerinde düşük sitotoksikite oluşturmuştur. Oktokrilenin IC50, IC25 ve IC12,5 dozları hesaplanarak alkali komet testinde kullanılmıştır. Komet testinde belirlenen üç parametre olan kuyruk uzunluğu, % kuyruk DNA ve olive kuyruk momenti oranlarında kontrole göre her üç dozda da anlamlı artış saptanmıştır. Bu organik bileşik yağlı viskoz bir yapıya sahiptir ve bu özelliği sayesinde derinin alt tabakalarına kadar ulaşabilmektedir. Hanson ve arkadaşlarının (2006) bir çalışmasında oktokrileni de içeren üç güneş koruyucu filtre ile cilt epidermis tabakasında serbest radikal oluşumuna sebep olup olmadıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda üç filtrenin de cildin epidermis tabakasına geçtiklerinde yüksek oranda ROT oluşumuna sebep oldukları gösterilmiştir.

Tez çalışmasında oktokrilenin deri fibroblast hücrelerinde komet testi sonucunda her üç dozda da DNA hasar oranını yükselttiği görülmektedir. Oktokrilenin IC50 ve altındaki

iki dozda güçlü genotoksik hasar oluşturmalarının epidermal hücrelerde ROT oluşturabilme etkisinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Reaktif oksijen türevlerinin DNA ve protein gibi makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturma etkileri iyi bilinmektedir. Oktokrilenin güneş koruyucu krem ve losyonlarda % 10 oranında kullanıldığı görülmektedir. 1,7 Oz miktarındaki kremler 50 gr gelmektedir. Bu kremlerde % 10 oranında oktokrilen bulunması 5 gr' a denk gelmektedir. Çalışmada oktokrilen için belirlediğimiz IC50 değeri olan 1390,95 µM, 534 µg/ml şeklinde çevrilebilir. Bu miktar 50 gr'lık bir kremin % 0,05' ini oluşturmaktadır ve % 10'luk oranın altında kalmaktadır. Bu kadar düşük miktarda % 50 hücre ölümüne sebep olan oktokrilen yine bu dozda ve altındaki dozlarda yüksek DNA hasarına sebep olmuştur. UV hasarından korunmak için önerilen krem miktarı 2 mg/cm² şeklindedir. Bu miktarın krem içinde oktokrilen oranı 200 µg'dır. Bu oran da yine IC50 dozunun yarısının da altındadır. Bu durumda çalışmamızda oktokrilen sitotoksik görünmemekle birlikte düşük dozlarda DNA hasarı oluşturmaları bakımından dikkatle yaklaşılması gereken bir UVB filtresi gibi görünmektedir.

Çalışmada bulduğumuz anlamlı sonuçlardan biri güneş koruyucu kremlerde birlikte kullanılan avobenzon ve oktokrilenin birlikte kombinlenerek komet testinde kullanıldığında gözlenen DNA hasar oranının tek başlarına oluşturduklarına kıyasla daha yüksek olmasıdır. Komet testinde kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti değerleri açısından kombin verilerini tek başına avobenzon ve oktokrilenin verileri ile karşılaştırdığımızda IC12,5 + IC12,5 ve IC25+ IC25 kombinlerinin yüksek oranda DNA hasarı oluşturduğunu belirledik. Kombin uygulamalarında IC50+ IC50 kombin grubunu fazla sitotoksik olacağı için komet testinde kullanılmamıştır. Kombin uygulamasında elde edilen komet verileri tek başına oktokrilen uygulamasında elde edilen verilerle büyük oranda örtüşmekle birlikte oktokrilene oranla daha fazla hasar oranı gözlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Bu durumun avobenzonun oluşturduğu hasarın katkısı ile gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla çalışmada bulduğumuz kombin doz ile uygulama sonuçları avobenzonun tek başına oktokrilene oranla daha az DNA hasarı oluşturduğunu göstermektedir. Oktokrilenin ise kombin uygulamalarda avobenzon ile sinerjistik etki göstererek genotoksik hasar miktarının çok fazla artışına sebep olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak çalışmada kullandığımız UVB filtresi olan oktokrilenin düşük sitotoksik etkisi olmasına rağmen avobenzonla kullanıldığında genotoksik etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bileşimimiz UVA filtresi olan avobenzon ise deri fibroblast hücrelerinde hem sitotoksik hem de genotoksik etki göstermiştir. Bu iki bileşimin kullanıldığı güneş koruyucu kremlere karşı dikkatli yaklaşılmalıdır. Genel olarak, detaylı detaylı ürün içeriği listelerini anlamak tüketiciler için zor olsa da, bilinçli karar verebilmek için tüketicilerin genellikle hangi UV filtre bulunduğunu fark etmeleri ve ürün içeriği listelerini ayrıntılı okumaları gerektiğini düşünmekteyiz (Manová ve ark. 2013). Ayrıca çalışmada kullandığımız iki UV filtresi ile in vivo hayvan modelleri üzerinde sitotoksikite ve genotoksikite çalışmaları ile bu etkilerini aydınlatacak mekanizma belirleme çalışmalarının da gerçekleştirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

Akalın, A.C. 2011. Nar Şaraplarında Antioksidan Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

Altuntaş, M., Güçlü, A., Yilmazer, T.T., Öngel, K. 2011. Birey Sağlığı Açısından Ultraviyole Işımlar. *Turkish Family Physician*, 2(2):8-12.

Anonim 2002. World Health Organization (WHO), 2002, Geneva,Switzerland.

Anonim, 2006. International Sun Protection Factor (Spf) Test Method, 2006, Brussels.

Anonim 2012. Skin Cancer and Sunlight, Canadian Centre For Occupational Health and Safety. [http://www.ccohs.ca/oshanswers/diseases/skin cancer.html](http://www.ccohs.ca/oshanswers/diseases/skin%20cancer.html) (Erişim Tarihi: 03.03.2014).

Anonim. Ultraviyole Radyasyon, [www.mgm.gov.tr/FILES/arastirma/ozonuv/Ultraviyole Radyasyon.pdf](http://www.mgm.gov.tr/FILES/arastirma/ozonuv/Ultraviyole%20Radyasyon.pdf) (Erişim Tarihi: 03.09.2013).

Armeni, T., Damiani, E., Battino, M., Greci, L., Principato, G. 2004. Lack of in vitro protection by a common sunscreen ingredient on UVA-induced cytotoxicity in keratinocytes. *Toxicology*, 203(1-3):165-78.

Beak, S.M., Lee, Y.S., Kim, J. 2004. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor-kB in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie*, 86:425-429.

Bens, G. 2014. Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer, Second Edition, edited by Jörg Reichrath.pp 527.

Berkow, R. 1997. The Merck Manual of Medical Information, Ed: Berkow, R., U.S., pp:985-988.

Bernerd, F., Vioux, C., Lejeune, F., Asselineau, D. 2003. The sun protection factor (SPF) inadequately defines broad spectrum photoprotection: demonstration using skin reconstructed in vitro exposed to UVA, UVBor UV-solar simulated radiation. *European journal of dermatology*, 13(3):242-9.

Büyükuslu, H. 2007. Isparta'nın Yalvaç İlçesi Ve Çevresinin Doğal Fon (Background) Radyasyon Düzeylerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Isparta.

Clydesdale, G.J., Dandie, G.W., Muller, H.K. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology*, 79:547-568.

Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S. 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation Research*, 759:27-39.

Çakmakoğlu, B. 2012. Kanser Oluşumunda DNA Tamir Mekanizmalarının Önemi. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Uludağ Üniversitesi, Bursa.

Damiani, E., Greci, L., Parsons, R., Knowland, J. 1999. Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated in vitro in the presence of dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient. *Free Radic. Biol. Med.* 26(7-8):809-16.

Damiani, E., Carloni, P., Biondi, C., Greci, L. 2000. Increased oxidative modification of albumin when illuminated in vitro in the presence of a common sunscreen ingredient: protection by nitroxide radicals. *Free Radic Biol Med.*, 15;28(2):193-201.

Damiani, E., Rosati, L., Castagna, R., Carloni, P., Greci, L. 2006. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreen after UVA irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, 82(3):204-13.

Debeleş-Bütüner, B., Kantarcı, G. 2006. Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları Ve Kanserle İlişkisi. *Ankara Ecz Fak Derg*, 35 (2) 149 – 170.

DeLeo, V.A., Clark, S., Fowler, J., Poncet, M., Loesche, C., Soto, P. 2009. A new ecamsule-containing SPF 40 sunscreen cream for the prevention of polymorphous light eruption: a double-blind, randomized, controlled study in maximized outdoor conditions. *Cutis*, 83(2):95-103.

Deliconstantinos, G., Villiotou, V., Stavrides, J.C. 1996. Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. *Biochemical Pharmacology*, 51:1727-1738.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi İle Dna Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(2): 77-89.

Diñer, Y., Kankaya, S. 2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 30(4):1365-73.

Dong, Z., Ma, W., Huang, C., Yang, C.S. 2007. Inhibition of Tumor Promoter-induced Activator Protein 1 Activation and Cell Transformation by Tea Polyphenols, (-)-Epigallocatechin Gallate, and Theaflavins. *Cancer Res*, 57:4414-4419.

Fourtanier, A., Moyala D., Seiteb S. 2012. UVA filters in sun-protection products: regulatory and biological aspects. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1):81-9.

Gao, L., Yuan T., Zhou, C., Cheng, P., Bai, Q., Ao, J., Wang, W., Zhang, H. 2013. Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 93(10):2507-13.

Gençay, Ş. 1994. Nükleer Elektrik ve Çevre. Elektrik Enerjisi ve Teknolojileri Sempozyumu, İTÜ Yayınları, İstanbul.

González, S., Fernández-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y. 2008. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, 26(6):614-26.

Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L., Stevanato, R. 2011. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International journal of pharmaceutics*, 405(1-2):97-101.

Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kroupova H. K., Grabic R, Randak T. 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96:41-7.

Griffiths, A., Wessler, S., Lewontin, R., Gelbart, W., Suzuki, D., Miller, J. 2004. An Introduction to Genetic Analysis, 8th edition. W.H. Freeman, New York, 782 pp.

Grujil F.R. 1999. Skin cancer and solar UV radiation. *European journal of cancer*, 35(14):2003-9.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. 1994. Elektromanyetik Radyasyon. Aydoğdu Ofset, Ankara. 28pp.

Hanson, K.M., Gratton E., Bardeen, C.J. 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(8):1205-12.

Harmanşah, C. 2008. UV-B radyasyonun çevresel etkileri ve ölçüm teknikleri. *C B Ü Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*. 1(9):58-68.

Heck, D.E., Vetrano, A.M., Mariano, T.M., Laskin, J.D. 2003. UVB light stimulates production of reaction oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:22432-22436.

Jancin, B. 2009. Two UVA Sunscreen Filters Are Better Than One. *Cutaneous Oncology*, 19.

Karaduman, A. , 1999. Solar Radyasyon ve Deri Üzerine Etkileri, www.sağlık.tr.net.

Katiyar, S.K., Mukhtar, H. 1997. Inhibition of phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused inflammatory responses in sencar mouse skin by black tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 1911–1916.

Kaymak, Y., İlter, N. 2010. Güneşten Koruyucu Ürünler. *Türkiye Klinikleri Kozmetik Dermatoloji Özel Dergisi*, 3(3):34-9.

Köklü, N. 2006. Radyasyonun İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri Ve Tıpta Uygulama Alanları. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Konya.

Kulaksız, G., Sansar, A. 2007. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, 32 (3); 104–111.

Kullavanijaya, P., Lim, H.W. 2005. Photoprotection: *Journal of American Academy of Dermatology*, 52(6):937-58.

Krutmann, J., Hönigsmann, H., Elmetts, C.,A. 2009. Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods. Verlag Berlin Heidelberg, 57pp.

Lautenschlager, S., Wulf H.C., Pittelkow M.R. 2007. Photoprotection. Outpatient Clinic of Dermatology, Triemli Hospital, Herman Greulich-Strasse 70, CH-8004 Zurich, Switzerland. <http://www.thelancet.com> vol370 (Erişim tarihi: 16.04.2014).

Lazar, G.M., Baillet, A., Fructus, A.E. 1996. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of UV filters used in sunscreen formulations. *Drug and Cosmetic Industry*, 50–62.

Lelièvre, D., Justine, P., Christiaens, F., Bonaventure, N., Coutet, J., Marrot, L., Cotovio, J. 2007. The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an in vitro tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicology In Vitro*, 21(6):977-95.

Lhiaubet-Vallet, V., Marin, M., Jimenez, O., Gorchs, O., Trullas, C., Miranda, M.A. 2010. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(4):552-8.

Liao W., McNutt, M.,A., Zhu, W.,G. 2009. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1):46-53.

Lodovici, M., Raimondi, L., Guglielmi, F., Gemignani, S., Dolara, P. 2003. Protection against ultraviolet B-induced oxidative DNA damage in rabbit corneal-derived cells (SIRC) by 4-coumaric acid. *Toxicology*, 184(2-3):141-7.

Lubin, D., Jensen, E.,H. 2002. Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature*, **377**, 710 – 713.

Manová, E., Von Goetz, N., Hauri, U., Bogdal, C., Hungerbühler, K. 2013. Organic UV filters in personal care products in Switzerland: a survey of occurrence and concentrations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(4):508-14.

Madronich, S., de Gruijl, F.R. 1993. Skin cancer and UV radiation. *Nature*, 366(6450):23.

Marrot, L., Belaidi, J.P., Meunier, J.R. 2005. Importance of UVA photoprotection as shown by genotoxic related endpoints: DNA damage and p53 status. *Mutation Research*, 571(1-2):175-84.

McGregor, J.M., Young, A.R. 1996. Sunscreens, suntans, and skin cancer. *Br. Med. J*, 312(7047): 1621–1622.

Moussa, S.H., Tayel, A.A., Al-Hassan, A.A., Farouk, A. 2013. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Journal of Mycology*,7.

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

Nizamhoğlu, N.M., Nas, S. 2010. Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1):20-35.

Nohynek, G. J., Schaefer, H. 2001. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33(3):285-99.

Okcu, G., Altuntaş E.G., Ayhan K. 2011. Laktik Asit Fermentasyonunda Fenolik Bileşikler Ve Önemi. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, 1(1):50-63.

Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F. 2009. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7(2): 61-70.

Paris, C., Lhiaubet-Vallet, V., Jimenez, O., Trullas, C., Miranda, M. 2009. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. *Photochemistry and Photobiology*, 85 (1): 178–184.

Petrova, A. 2009. Modulation Of Ultraviolet Light-Induced Skin Carcinogenesis By Extracts Of Rooibos And Honeybush Using A Mouse Model: Elucidating Possible Protective Mechanisms. *Yüksek Lisans Tezi*, Cape Peninsula University Of Technology, Cape Town.

Polonini, H.C., Dias, R.M., Souza, I.O., Gonçalves, K.M., Gomes, T.B., Raposo, N.R., Silva, A.D. 2013. Quinolines derivatives as novel sunscreens agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(16):4506-10.

Saygi, Ş. 2003. Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri Ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3) : 291 – 298.

Sambandan, D.R., Ratner, D. 2011. Sunscreens: An overview and update. *Journal of American Academy of Dermatology*, 64(4):748-58.

Scalia, S., Coppi, G., Iannuccelli, V. 2011. Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane: in vivo skin penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2):345-50.

Schulman, J. M., Fisher, D.E. 2010. Indoor UV tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Current opinion in oncology*, 21(2):144-9.

Seité, S., Reinhold, K., Jaenicke, T., Brenden, H., Krutmann, J., Grether-Beck, S. 2012. Broad-spectrum moisturizer effectively prevents molecular reactions to UVA radiation. *Cutis*, 90(6):321-6.

Setlow, R.B., Grist, E., Thompson, K., Woodhead, A.D. 1993. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14):6666-70.

Seyrek, E. 2007. Radyoizotopların Üretimi Ve Radyoterapide Kullanılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Fizik Eğitimi Anabilim Dalı, Ankara.

Sinha, R.P., Häder, D.P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4):225-36.

Soehnge, H., Ouhtit, A., Ananthaswamy, H.N. 2007. Mechanisms of induction of skin cancer by uv radiation. *Frontiers in bioscience*, 2:d538-51.

Söylemezoğlu, G. 2003. Üzümde Fenolik Bileşikler. *Gıda*, 28(3):277-285.

Şeker, S., Çerezci, O., 2000. Radyasyon Kuşatması, Boğaziçi Üniversitesi Yayınevi, İstanbul, 189s.

Tekbaş, Ö.F., Evcı, D., Özcan, U. 2005. Yaklaşan Yaz Mevsimi İle Artan Bir Tehlike: Güneş Kaynaklı Ultraviyole Işınları, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 2(4):98-110.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3):206-21.

Tümer, Ö.L. 2006. Bazı Nar Çeşitlerinin Olgunlaşma Aşamalarında Fenolik Bileşik Miktarındaki Değişimler. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.

Türsen, Ü. 2006. Deri Yaşlanmasının Topikal Ajanlarla Önlenmesi. *Dermatose*, 5(4): 267-283.

Uylaşer, V., İnce, K. 2008. Şaraptaki Antioksidanlar ve Fenolik Bileşikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.

Vostálová, J., Zdarilová, A., Svobodová, A. 2010. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*. 302(3):171-81.

Wang, Z.Y., Huang, M.T., Lou, Y.R, Xie, J.G., Reuhl, K.R., Newmark, H.L., Ho, C.T., Yang, C.S., Conney, A.H. 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Research*, 54(13):3428-35.

Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J.K. 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology In Vitro*, 25(8):2147-51.

Wang, S.Q., Tanner, P.R., Lim, H.W., Nash, J.F. 2013. The evolution of sunscreen products in the United. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(1):197-202.

Yaren, H., Karayılanoglu T. 2005. Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 4 (4): 199-208.

Yetkin, H., Ceyhan, A.M., Yıldırım M. 2009. Deri Yaşlanması ve Tedavisi. *SDÜ Tıp Fakültesi*, 16(2):32-38.

Yılmaz, İ. 2010. Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2):143-153.

Zhang, Y., Smuts, J.P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J.C., Armstrong, D.W. 2012. Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36):9305-14.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu SEVİNÇ

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa/TÜRKİYE – 01.01.1989

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi (UHAL) / 2003 – 2007

Lisans : U.Ü. F.E.F. Biyoloji Bölümü / 2007 – 2011

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D. / 2011 – 2014