

**İYONİZE RADYASYONUN OTOFAJİ YOLAĞINDA
BULUNAN BAZI GENLERİN EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF EFFECTS OF IONIZING
RADIATION ON SOME GENES EXPRESSION IN
AUTOPHAGY PATHWAY**

EMEL SAĞLAR ELÇİ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

İYONİZE RADYASYONUN OTOFAJİ YOLAĞINDA BULUNAN BAZI GENLERİN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Emel Sağlar Elçi

ÖZ

Gelişen teknoloji ile birlikte her alanda radyasyonun kullanımının artması canlıların doğal radyasyonun yanı sıra yapay radyasyona da maruz kalma miktarını arttırmıştır. Bu durum radyasyona maruz kalma sonucunda canlılarda meydana gelen hasarı tespit edebilecek hızlı, hassas ve radyasyona özgül sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç doğurmuştur. Bu çalışmanın amacı, herhangi bir kaza veya radyasyona maruz kalma durumunda maruz kalınan radyasyonun dozuna ve etkisine en kısa sürede karar verebilmek amacıyla biyolojik dozimetre olarak kullanılacak bir deney sisteminin geliştirilmesidir.

Bu amaçla radyoterapi gören 50 kanser hastasının her birinden radyoterapi görmeden önce ve radyoterapinin 5., 15. ve 25. günlerinde kan örnekleri alınmıştır. Aynı zamanda doz cevap eğrisi oluşturabilmek amacıyla genç ve sağlıklı 10 gönüllünün her birinden 5 adet olmak üzere toplamda 50 kan örneği toplanmıştır. Her bir gönüllünün ilk tüpü kontrol olarak ayrılmış, diğer dört tüp sabit gama kaynağı kobalt 60 (Co⁶⁰) kullanılarak 0,1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy ve 3 Gy dozlarda ışınlanmıştır. Radyoterapi hastalarında ve in vitro ışınlama yapılan örneklerde kantitatif reverse transkripsiyon PZR ile B2M ve GAPDH genleri referans genler olarak kullanılarak, otofaji yolağında rol aldığı bilinen GRP78, ATG5, LC3, ATF4, XBP1 ve GADD153 genlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

Analiz sonuçları hem radyoterapi hastalarında hem de in vitro ışınlama yapılan örneklerde artan doza bağlı olarak tüm genlerin ifadesinin arttığını, dolayısıyla gen ekspresyon analizlerinin radyasyon hasarını tespit etmekte kullanılacak biyolojik dozimetreler için umut vaat edici olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İyonize Radyasyon, Otofaji, Q-RT PZR

Danışman: Prof. Dr. Hatice MERGEN, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

INVESTIGATION OF EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON SOME GENES EXPRESSION IN AUTOPHAGY PATHWAY

Emel Sağlar Elçi

ABSTRACT

Utilization of radiation widely due to the progress in technology resulted in the increased exposure to artificial radiation in addition to natural radiation. Under the circumstances, there has been a demand for the development of fast, sensitive, and radiation specific systems that could evaluate the damage on living organisms caused by the exposure to radiation. Aim of this study is to develop an experimental system that could be used as a biological dosimeter in order to evaluate the dose and the effect of an exposure to radiation as soon as possible.

For this purpose, blood samples were collected from 50 cancer patients before radiotherapy and on the 5th, 15th, 25th days of the radiotherapy. At the same time, 5 samples were collected from each of the 10 young and healthy volunteers in order to form the dosage-response curve. First tube from each of the volunteers is assigned as controls; four tubes left are irradiated respectively using constant gamma source of cobalt 60 (Co60) at 0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy, and 3 Gy. For the radiotherapy patients and the in-vitro irradiated samples, gene expression profiles of GRP78, ATG5, LC3, ATF4, XBP1, and GADD153 genes, which are known to take part in the autophagy pathway, were analyzed by Quantitative Reverse Transcriptase PCR using B2M and GAPDH genes as reference genes.

Analysis results reveal that both in the radiotherapy patients and in-vitro irradiated samples expression of all the genes have increased; pointing out that gene expression analysis is a promising tool for biological dosimeters in the detection of radiation damage.

Key Words: Ionizing radiation, Autophagy, Q-RT PCR

Advisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Section

BU TEZ ÇALIŞMASI, “GEN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BİYOLOJİK DOZİMETRE OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI” (PROJE NO: TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU (TAEK), A3.H2.P1.03) PROJESİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, hoşgörüsüyle bana destek olan, daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmam için bana cesaret ve güven veren sayın danışman hocam Prof. Dr. Hatice Mergen'e

Doktora çalışmam boyunca bilimsel katkısı ile çalışmama yön veren, mesleki bilgi ve tecrübelerimi kazanmamda katkısı olan değerli arkadaşım Dr. Sibel Ünlü'ye

Tez izleme komitemde yer alarak, bilimsel tecrübelerinden yararlanmama izin veren sayın hocalarım Prof. Dr. Rıza Köksal Özgül ve Prof. Dr. Erol Aksöz'e ve yine tez dönemimde bilgi ve desteği ile yanımda olan Prof. Dr. Ay Ögüş'e,

Deneyisel aşamalarda bana destek vererek, beni yüreklendiren sevgili Uzm. Bio. Gamze Umulu'ya, bu süreçte bana destek vererek yanımda olan arkadaşlarım Beril Erdem, Tuğçe Karaduman ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Sevgisi, sabrı ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olup, tüm zorlukları aşmam için beni yüreklendiren eşim Doğa Elçi'ye,

Attığım her adımda arkamda olup, desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili kardeşlerim Kamer Sağlar, Melis Sağlar, Volkan Türk ve Umut Tekgüç'e

Hayatıma anlam katan canım yeğenlerim Nehir ve Toprak Tekgüç'e

Her koşulda sevgi ve şefkatini benden esirgemeyen canım Annem ve Babam'a

Teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite.....	3
2.1.1. Radyasyonun Çeşitleri.....	3
2.1.2. Radyasyon Dozu ve Birimleri.....	8
2.1.3. Radyasyon Dozunun Hızı ve Aralıklarla Verilmesi.....	10
2.2. Radyasyonun Tıbbi Amaçla Kullanımı.....	12
2.2.1. Tanısal Radyoloji.....	12
2.2.2. Radyoterapi.....	12
2.2.2.1. Radyoterapi Sonrasında Hücrelerde Gözlenen Etkiler.....	13
2.3. İyonize Radyasyonun Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	14
2.3.1 İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	14
2.3.1.1. İyonize Radyasyonun Dolaysız Etkisi.....	16
2.3.1.2. İyonize Radyasyonun Dolaylı Etkisi.....	16
2.3.1.3. İyonize Radyasyonun Somatik Etkisi.....	17
2.3.1.4. İyonize Radyasyonun Genetik Etkisi.....	18
2.3.1.5. Deterministik Etkiler.....	18
2.3.1.6. Stokastik Etkiler.....	19
2.3.2. Radyasyon Hasarına Etki Eden Faktörler.....	19
2.4. İyonize Radyasyona Cevap Olarak Aktif Hale Gelen Yolaklar.....	20
2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı.....	20
2.4.1.1. PERK Sinyal İletim Yolağı.....	21
2.4.1.2. ATF6 Sinyal İletim Yolağı.....	22

2.4.1.3.	IRE1 Sinyal İletim Yolağı.....	22
2.4.2.	Apoptoz ve Otofaji Arasındaki Moleküler Bağlantılar	25
2.4.3.	Otofaji	29
2.4.3.1.	Otofagozom Oluşumu	30
2.4.3.2.	Otofaji ve Radyoterapi.....	32
2.5.	Biyolojik Dozimetre ve Biyobelirteçler	32
2.6.	Kantitatif Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu	34
2.6.1.	İnterkalatör Boya Metodu	36
2.6.2.	TaqMan Prob Metodu.....	38
2.6.3.	FRET Boya Metodu	39
2.6.4.	Moleküler Boncuk (Molecular Beacon) Yöntemi	40
2.6.5.	Scorpions Boya Metodu	40
3.	MATERYAL VE METOT.....	41
3.1.	Kan Örneklerinin Toplanması.....	41
3.2.	Kandan Lenfositlerin Ayırıştırılması.....	41
3.3.	mRNA İzolasyonu.....	42
3.4.	RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	44
3.5.	Q-RT PZR için Genomik DNA Eliminasyonu.....	44
3.6.	cDNA eldesi için Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu.....	45
3.7.	Çift İşaretli Problar Kullanarak Q-RT PZR ve İki Basamaklı RT-PZR Protokolü	47
3.8.	Q-RT PZR ile Elde Edilen Verilerin Analizi.....	50
3.8.1	REST 2009 Yazılımı	50
4.	SONUÇLAR	55
4.1.	Q-RT PZR Analiz Sonuçları	55
4.1.1.	Radyoterapi Gören Hastaların Q-RT PZR Analizi	55
4.1.1.1.	5. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen Ekspresyon Raporu	55
4.1.1.2.	15. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen Ekspresyon Raporu	57
4.1.1.3.	25. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen Ekspresyon Raporu	59
4.1.2.	Doz Cevap Eğrisi İçin Q-RT PZR Analizi	61
4.1.2.1.	0,1 Gy Örneklerinin Relatif Gen Ekspresyon Raporu.....	61
4.1.2.2.	0,5 Gy Örneklerinin Relatif Gen Ekspresyon Raporu.....	63
4.1.2.3.	1 Gy Örneklerinin Relatif Gen Ekspresyon Raporu.....	65
4.1.2.4.	3 Gy Örneklerinin Relatif Gen Ekspresyon Raporu.....	67

5.	TARTIŞMA	69
6.	KAYNAKLAR.....	77
EK	Q-RT PZR ile Amplifiye Edilen Genlere Ait Primer ve Prob Dizilerinin cDNA ve DBA Sekansları Üzerinde Gösterilişi.....	85
	ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Alfa Bozunumu	4
Şekil 2.2. Beta ışınımı	5
Şekil 2.3. X-ışınları	5
Şekil 2.4. Gama ışınımı	6
Şekil 2.5. Nötron yayınıcı	7
Şekil 2.6. Alfa, beta, gama, X ışınları ve nötron ışınmasının çeşitli malzemeler içerisine nüfus etme durumları	7
Şekil 2.7. Radyasyon ile ışınlanma sonrası DNA hasarı.....	15
Şekil 2.8. Radyasyonun dolaylı ve dolaysız etkileri.....	17
Şekil 2.9. Deterministik doz Tepki Eğrisi	18
Şekil 2.10. Stokastik Doz-Tepki Eğrisi	19
Şekil 2.11. Katlanmamış protein cevabından sorumlu olan sinyal iletim yollarının şematik olarak gösterilmesi	24
Şekil 2.12. Radyasyon tarafından indüklenen apoptoz ve otofaji arasındaki dengenin şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.13. Otofajinin düzenlenmesi, sinyal molekülleri ve apoptotik araçlar ile bağlantısı	28
Şekil 2.14. Otofajinin moleküler bileşenleri	30
Şekil 2.15. Otofagozom oluşumu	31
Şekil 2.16. Q-RT PZR cevap eğrileri	36
Şekil 2.17. Syber Green I yöntemi	37
Şekil 2.18. TaqMan prob metodu	39
Şekil 4.9. Hasta grubuna ait <i>RASSF1A</i> U amplifikasyon sonuçları.....	38
Şekil 3.1. Kutu diyagramı (whisker-box plots).....	54
Şekil 4.1. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 5. güne ait örneklerde genlerin ekspresyon oranlarına ait kutu grafiği	56
Şekil 4.2. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 15. güne ait örneklerde genlerin ekspresyon oranlarına ait kutu grafiği	58
Şekil 4.3. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 25. güne ait örneklerde genlerin ekspresyon oranlarına ait kutu grafiği	60

Şekil 4.4. Radyoterapi tedavisi gören hastalardan alınan 5. 15. ve 25. gün örneklerinde çalışılan genlerin relatif ekspresyon oranları	60
Şekil 4.5. 0.1 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği.	62
Şekil 4.6. 0.5Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği..	64
Şekil 4.7. 1 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği...	66
Şekil 4.8. 3 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği....	68
Şekil 4.9. 0,1 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy ve 5 Gy in vitro ışınlama yapılan örneklerde genlerin doz cevap eğrisi çizilmiştir	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Özel birimler ve SI birimlerinin özetlenmesi.....	9
Çizelge 3.1. Genomik DNA eliminasyon reaksiyon bileşenleri.....	45
Çizelge 3.2. Reverse-Transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.....	46
Çizelge 3.3. Q-RT PZR için kullanılan primer ve prob dizileri.....	48
Çizelge 3.4. Q-RT PZR reaksiyon hazırlığı	49
Çizelge 3.5. Q-RT PZR döngüleyici koşulları	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α :	Alfa
β :	Beta
γ :	Gama
μ l:	Mikrolitre
95% C.I:	%95 Güven aralığı
Akt:	A serine/threonine protein kinase
ATF4: A	Activating transcription factor 4
ATF6:	Activating transcription factor 6
Atg:	Autophagy related protein
B2M:	Beta 2 mikroglobulin
BIP:	Binding immunoglobulin protein
Bq:	Becquerel
C:	Coulomb
CHOP:	CCAAT/ enhancer binding protein homologous protein
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Ci:	Curie
Cs^{137} :	Sezyum 137
Co^{60} :	Kobalt 60
CT:	Eşik-değer döngü (Threshold Cycle)
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSB:	DNA çift zincir kırığı
ER:	Endoplazmik retikulum
EtBr:	Etidyum Bromür
FAM:	Carboxyfluorescein
FE:	Fosfotidiletanolamin
FIP200:	Mayada Atg13-Atg17-Atg101
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GADD153:	Growth arrest and DNA damage inducible gene 153

GADD45A:	Growth arrest and DNA-damage-inducible gene 45 alpha
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
gDNA:	Genomik DNA
GOI:	Gene of interest
GRP78:	78 kDa glucose-regulated protein
Gy:	Gray
HSPA5:	Heat shock 70 kDa protein 5
IAEA:	Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı
ICRU:	Uluslararası Radyasyon Birimleri Komitesi
IR:	İyonize radyasyon
IRE1:	İnositol requirement 1
JNK:	Jun kinaz yolağı
LC3:	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LET:	Lineer enerji transferi
MN:	Mikronükleus
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
nm:	Nanometre
PERK:	interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PRKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PBS:	Phosphate Buffered Saline
P(H1):	Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Q-RT PZR:	Kantitatif reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
R:	Röntgen
REF:	Referans gen
REST:	Relative expression software tool
RNA:	Ribonükleik Asit

ROS:	Reaktif oksijen türleri
RPM:	Rotation per minute (dakikadaki devir)
RT:	Reverse transkripsiyon
S.H.:	Standart hata
SI:	Uluslararası Birimler Sistemi
Sv:	Sievert
ULK1:	Atg1
TAEK:	Türkiye Atom Enerjisi Kurumu
TAMRA:	Carboxy-tetramethyl-rhodamine
TRG:	Hedef gen
UPR:	Katlanmamış protein cevabı
UV:	Ultraviyole
XBP1:	X-box binding protein 1

1. GİRİŞ

Dünyanın oluşumuyla birlikte milyarlarca yıl ömrü olan radyoaktif elementler yaşadığımız çevrede doğal bir radyasyon düzeyi oluşturmuştur ve canlılığın varoluşundan bu yana yaşam zincirindeki tüm canlılar bu radyasyonla iç içe yaşamak zorunda kalmıştır.

Dünya atmosferine giren yüksek enerjili kozmik ışın ve parçacıklardan ve yerkabuğu orjinli radyoaktif elementlerden de kaynaklanan doğal radyasyonun yanı sıra, nükleer bomba denemeleri, nükleer reaktörlerin geliştirilmesi ve bazı teknolojik ürünlerin kullanımı da yapay radyasyona sebep olmaktadır. Canlıların yaşam süreçleri boyunca doğal veya yapay yollarla radyasyona maruz kalmaları bu sebepten dolayı kaçınılmaz bir süreç olmuştur.

Son yarım yüzyıl içerisinde gelişen teknoloji ile birlikte çevredeki radyoaktivite küresel düzeyde artmış, ekosisteme ve canlılığa zarar verecek düzeye gelmiştir. Canlılar sürekli olarak enerji üretimi, tıp, endüstri, araştırma, tarım, hayvancılık gibi pek çok alanda kullanımı kaçınılmaz olan yapay kaynaklardan doz almaktadır. Ancak tıbbi alanda radyasyon uygulamaları, tanısal radyolojide görüntüleme ve kanser hastalarında radyasyonun hücre ve tümörler üzerindeki öldürücü etkisinden dolayı hastaların teşhis ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir.

İyonize radyasyon canlılarda moleküler ve hücresel düzeyde birçok biyolojik hasar meydana getirmektedir. Bu hasar radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre geçici veya kalıcı olmakla birlikte dokuya aktarılan enerjinin büyüklüğü ile orantılıdır. Radyasyonun canlıda hasar meydana getirebilmesi için hücreler ve dokular tarafından soğurulması gerekmektedir. Soğurulan bu radyasyon, içinden geçtiği hücrelerde molekülleri ve atomları iyonize ederek uyarır. Bu radyasyonun dolaysız etkisidir. Bu durum molekülün inaktivasyonuna ve fonksiyonel değişikliğine neden olur. Dolaylı etkide ise radyasyon soğurulması sonucunda oluşan reaktif serbest radikaller gibi bazı araürünler bir dizi başka kimyasal reaksiyona girerek moleküllerin değişmesine sebep olur ve bu şekilde moleküllerde toksik hasarlar meydana gelir (Kaya, 2002; Günalp, 2003).

Radyasyonun oluşturduğu dolaysız etkilerden biri de genetik materyale verdiği zarardır. DNA'da, nispeten kolay olan tek zincir kırıklarına yol açtığı gibi, onarımı oldukça güç olan ve çoğunlukla onarımı mümkün olmadığı için hücre ölümüne neden olan çift zincir kırıkları, alkali-labil lezyonlar, protein çapraz bağlanmaları ve pürin-pirimidin bazlarının hasarı gibi çok çeşitli lezyonlara yol açabilmektedir (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2004; Jeggo and Lobrich, 2006). İyonlaştırıcı radyasyon maruziyetinin ardından DNA'da meydana gelen hasarlardan dolayı memeli hücrelerinde birçok yolak devreye girmektedir (Zdzienicka, 1995). Bu hasarlar hücre kontrol noktalarında işlev gösteren yolakları aktive eder ve hücrelerin G1 ve G2 fazına doğru ilerlemesini inhibe ederek S fazına geçiş sürecini geciktirir (Iliakis et al., 2003). Eğer radyasyonun dozu düşükse ve hasar onarılabilir düzeydeyse hasarın boyutuna ve tipine göre çeşitli onarım mekanizmaları devreye girer. DNA'da oluşan hasar onarıldıktan sonra ise hücre tekrar döngüye girebilir.

Hücrelerde radyasyonun yol açtığı endoplazmik retikulum stresi hücreyi apoptoz veya otofajiye sürüklemekte ve bu yolaklarda rol oynayan birçok genin de ifadesi değişmektedir. Bu çalışmada, iyonize radyasyona maruz kalma sonucunda DNA'da oluşan hasara cevap olarak aktif hale gelen otofaji yolağında rol oynayan *GRP78*, *ATG5*, *LC3*, *ATF4*, *XBP1* ve *GADD153* genlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Genlerin ifadesine, *B2M* ve *GAPDH* genleri referans gen olarak kullanılarak Kantitatif Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile flöresan işaretli problarla bakılmıştır. Bu amaçla radyoterapi hastalarından ve in vitro ışınlama amacıyla sağlıklı bireylerden örnekler toplanmış, farklı dozlardaki gen ifade profilleri belirlenmiştir.

Çalışmada hedeflenen, herhangi bir kaza veya radyasyona maruz kalma durumunda maruz kalınan radyasyonun dozuna ve etkisine en kısa sürede karar verebilmek ve fiziksel dozimetrelerin yetersiz kaldığı alanlarda gen ifade değişikliklerinin incelenmesi sonucunda oluşturulan deney sisteminin biyolojik dozimetre olarak kullanımını sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite

Çekirdeğin kararlı durumdan kararsız duruma geçerken enerjisini ışınım salarak vermesi basitçe radyasyon olarak tanımlanır. Atomların çoğu kararlı olmakla birlikte birçoğu da kararsız yada aktif durumdadır. Atomun kararlı veya kararsız olmasını çekirdeğinde bulunan nötron ve proton sayılarının denge durumu belirlemektedir. Nötron ve proton sayıları eşit olmayan çekirdekler kararsız çekirdekler olarak isimlendirilir. Atomlar enerjilerini dışarı vererek kararlı duruma geçme eğilimindedirler. Proton sayısına göre çok fazla nötronu bulunan atom çekirdeklerinde bulunan nötronlar alfa, beta, gama gibi çeşitli ışınlar yaymak suretiyle parçalanırlar. Atom çekirdeğinde meydana gelen bu dönüşüm radyoaktivite olarak adlandırılır. Nükleer dönüşüm radyoaktif bozunma veya nükleer parçalanma olarak, bu dönüşüm sonucu meydana gelen radyasyon yayılımı ise radyonüklit olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon, parçacık veya dalga tipinde olabilmektedir (Aydın, 2004).

2.1.1. Radyasyonun Çeşitleri

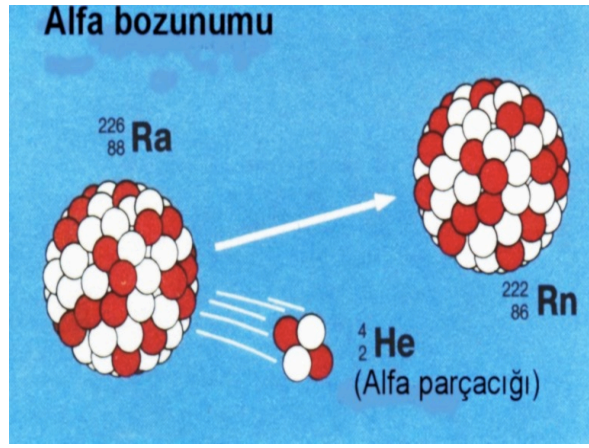
Radyasyonlar maddenin üzerinde gösterdikleri etkiye göre iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olarak sınıflandırılırlar.

Düşük enerjili veya iyonize olmayan radyasyon yeteri kadar enerji barındırmadığı için etkileştiği madde içindeki atomları iyonize edemez ancak, sadece uyarabilir. Bu radyasyon tipi, ışık hızında seyahat eden, titreşen elektrik ve manyetik alanlardan oluşan enerji dalgalarıdır. İyonize olmayan radyasyon kapsamına mikrodalgalar, görünür ışık, radyo dalgaları, bilgisayar ve televizyonların çalıştığı elektromanyetik dalgalar, cep telefonlarından yayılan elektromanyetik dalgalar, radar dalgaları, baz istasyonlarından yayılan elektromanyetik sinyaller, kızılötesi, ultraviyole ışık (morötesi ışık) ve güneş ışınları girer.

İyonize veya yüksek enerjili radyasyon ise enerjisi çok fazla olduğu için atomdan elektron koparabilir ve bu şekilde atomu iyonize edebilir (EPA-402-F-06-061, 2007). Kozmik ışınlar (uzaydan gelen X ve gama ışınları), röntgen ışınları olarak adlandırdığımız X-ışınları ve radyoaktif maddelerden çıkan alfa, beta, nötron ve

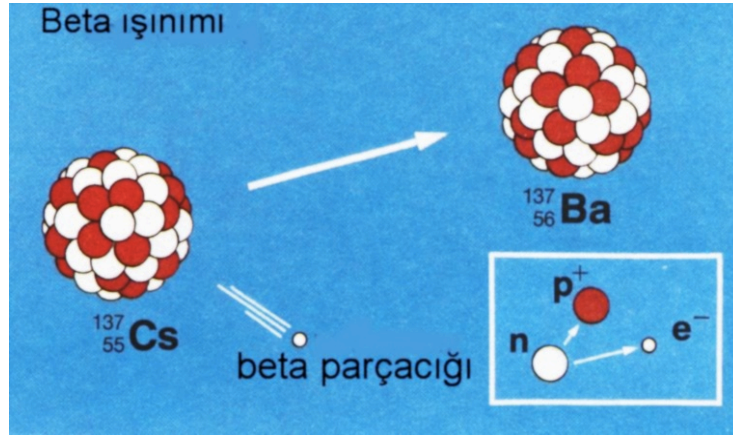
gama ışınları gibi radyasyonlar iyonize radyasyonlardır.

Şayet çekirdeğin kararsızlığı proton ve nötron fazlalığından kaynaklanıyorsa çekirdek iki proton iki nötrondan oluşan bir alfa parçacığı yayarak bozunur (Şekil 2.1). Alfa parçacıklarının erişme uzaklıkları bir iki cm'lik kısa bir mesafedir ve bir kağıt parçası durdurabilmektedir. Dış radyasyon tehlikesi yaratmazlar. Alfa parçacıkları solunum veya sindirim yoluyla vücuda girdiklerinde büyük hasarlar oluşturabilir (Dicle, 1991).



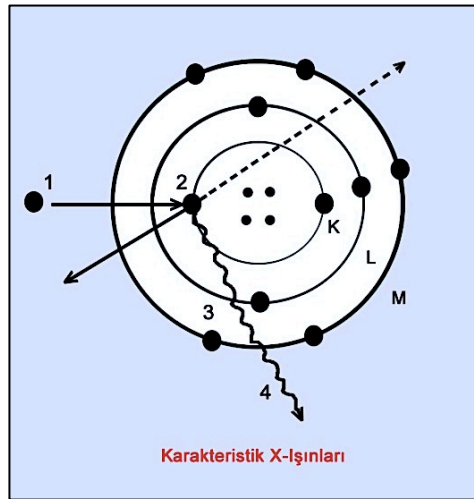
Şekil 2.1. Alfa bozunumu (www.taek.gov.tr)

Çekirdekdeki enerji proton fazlalığından ileri geliyorsa artı yüklü betalar yani pozitronlar oluşur. Şayet nötron fazlalığı söz konusu ise eksi yüklü betalar yani negatronlar oluşur (Şekil 2.2). Yüksek enerjili olanlar havada birkaç metre yol alabilirken az enerjili olanlar deriyi aşamazlar ve plastik, cam veya metal tabakalar tarafından tamamen soğurulabilmekte ya da absorblanabilmektedir. İyonlaşmaları alfa parçacığının oluşturduğu iyonlaşmadan daha azdır, çünkü daha hafif ve daha giricidirler (Aydın, 2004).



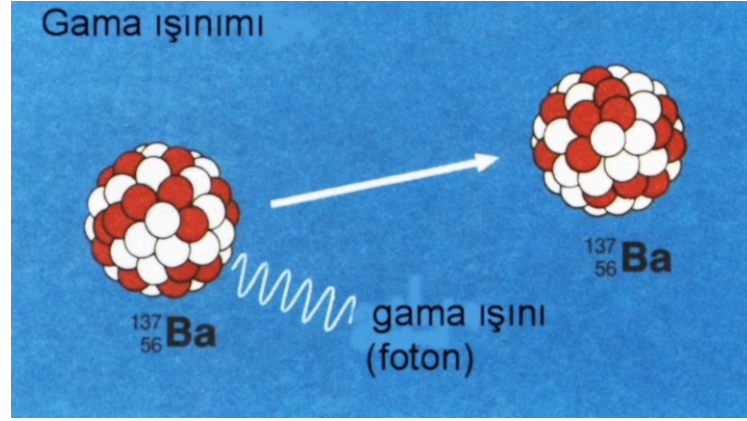
Şekil 2.2. Beta ışınımı (www.taek.gov.tr)

X ışınları ya da röntgen ışınları dalga şeklinde olan ışınlardır. Atoma dışarıdan gelen yüksek enerjili bir elektron o atomun ilk halkasından elektron koparmakta ve kopan elektronun yerindeki boşluğu doldurmak için bu elektronun yerine üst halkalardan elektronlar atlamaktadır. Bu sırada ortaya çıkan enerji X-ışını olarak salınır (Şekil 2.3). Bu ışınlar ışığa benzeyen fakat görülmeyen, maddelerin içinden kolay geçebilen ışınlardır.



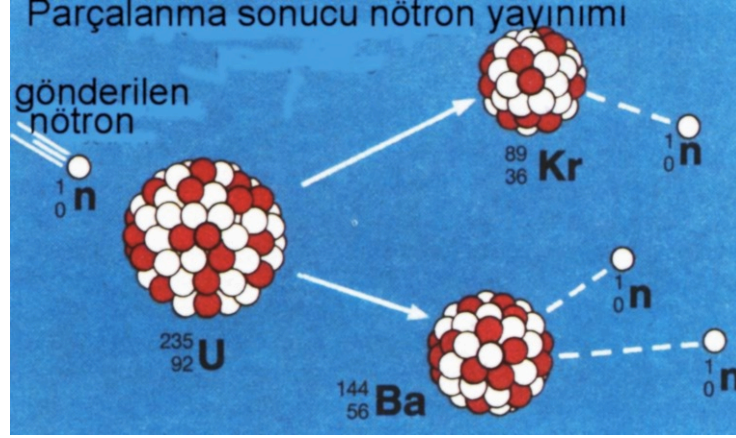
Şekil 2.3. X-ışınları (http://goruntulemeteknikleri.wordpress.com)

İyonize edici elektromanyetik radyasyon yörüngeden yayımlanıyorsa X ışını, çekirdekten yayımlanıyorsa gama radyasyonu adını alır. Gama ışınları kısa dalga boyuna sahiptir ve atom çekirdeğinin enerji seviyelerindeki farklılıklardan meydana gelir (Şekil 2.4). Çok girici ışınlardır ve tüm maddelerde büyük menzile sahiptirler ancak, yüksüz oldukları için alfa ve beta parçacıklarına göre iyonlaşmaya sebep olma etkileri daha azdır (Ünlü, 2011) ve kurşun levhalar ile durdurulabilirler.



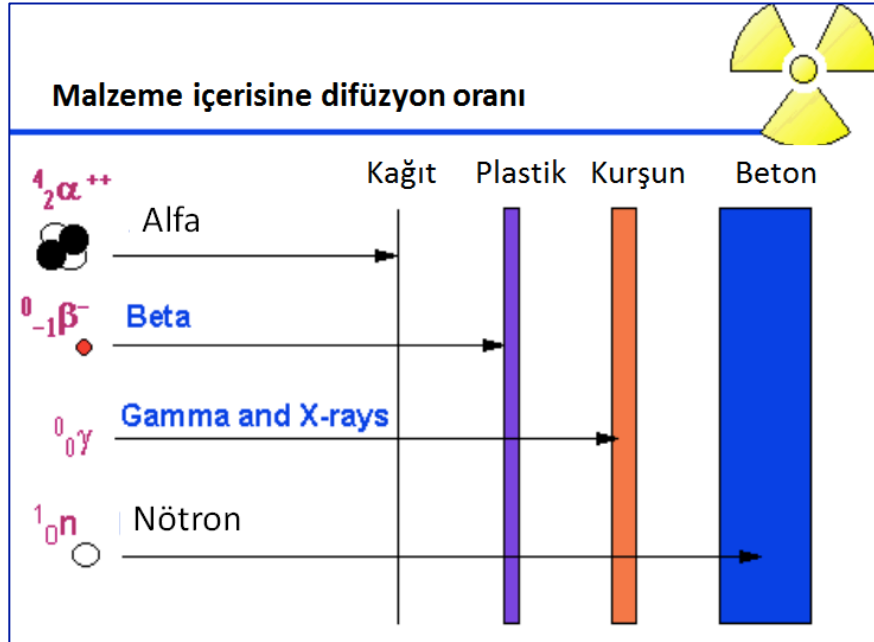
Şekil 2.4. Gama ışınımı (www.taek.gov.tr).

Diğer bir radyasyon olan nötron radyasyonu veya nötron ışını ise nükleer parçalanma ve nükleer birleşme esnasında kararsız ya da aktif atom çekirdeği tarafından bir nötronun yayımlanmasıdır (Şekil 2.5). Çok girici olmakla birlikte madde veya doku ile etkileştiklerinde alfa, beta gama veya X ışınlarının yayılmasına neden olmaktadır. Nötron ışınları sadece kalın beton, su veya parafin kütleleriyle durdurulabilirler.



Şekil 2.5. Nötron yayını (www.taek.gov.tr)

Alfa, beta, gama, X ışınları ve nötron ışınlarının çeşitli malzemeler içerisinde nüfus etme durumları Şekil 2.6'da şematize edilmiştir.



Şekil.2.6. Alfa, beta, gama, X ışınları ve nötron ışınlarının çeşitli malzemeler içerisinde nüfus etme durumları (http://www.tamsat.org.tr)

2.1.2. Radyasyon Dozu ve Birimleri

Radyasyon dozu, kişi tarafından belli bir sürede soğurulan veya alınan radyasyon miktarıdır. Dozun verdiği hasarın büyüklüğü o maddenin cinsi, vücuda alınış şekli, süresi ve miktarına bağlıdır. İyonize radyasyonun verdiği hasarı ve biyolojik etkilerin anlayabilmek için radyasyonun miktarını tespit etmek gerekir. Bu amaçla geliştirilecek ölçüm yöntemleri için birimlerin tanımlanması şarttır (www.taek.gov.tr).

Uluslararası Radyasyon Birimleri Komitesi (ICRU), aktivite, ışınlama dozu, soğurulma dozu ve doz eşdeğerleri için özel birimler tanımlamıştır. Bunlar sırasıyla; Cruie (Ci), Röntgen (R), rad ve rem'dir. Ancak 1986 yılından itibaren bu birimler yerine tüm dünyada aynı birimlerin kullanılması amacıyla "Uluslararası Birimler Sistemi (SI)" kullanılmaya başlanmıştır. SI birimleri sırasıyla Becquerel/kg (Bq/kg), Coulomb/kg (C/kg), Gray (Gy) ve Sievert (Sv) olarak isimlendirilmiştir.

Aktivite; verilen bir zaman aralığında belirli bir enerji düzeyindeki radyoaktif maddenin bozunma miktarıdır. Aktivitenin özel birimi olan Curie (Ci) saniyede 3.7×10^{10} bozunmadır. SI birimi ise bir saniyedeki bozunma sayısı olan Becquerel (Bq)'dir. $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ veya $1 \text{ Bq} = 2.703 \times 10^{-11} \text{ Ci}$ olarak tanımlanır.

Normal hava şartlarında havanın 1 kg'ında 2.58×10^{-4} Coulomb'luk elektrik yükü değerinde pozitif ve negatif iyonlar oluşturan x ve gama ışını miktarı ise ışınlama birimini ifade eder. $1 \text{ Röntgen (R)} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$ 'dır. SI birimi C/kg olarak gösterilir ve $1 \text{ C/kg} = 3.88 \times 10^3 \text{ R}$ eşitliğine karşılık gelir.

Soğurulmuş doz, birim kütle başına depolanan enerjinin ölçüsü veya iyonize radyasyonun herhangi bir maddeye verdiği enerjinin miktarı olarak tanımlanabilir ve her tür radyasyona uygulanabilir. Özel birimi olan Rad 1 gr maddeye 100 erg'lik enerji verebilen radyasyon miktarı olarak tanımlanır. $1 \text{ Rad} = 0.01 \text{ Gy}$ 'dir. SI birimi olan Gray 1 kg maddeye 1Joule'luk enerji verebilen radyasyon miktarı olarak tanımlanır ve $1 \text{ Gy} = 100 \text{ Rad}$ 'dir.

Eşdeğer doz ise vücutta toplanan enerjiyi ifade eder. Radyasyondan soğurulan enerjiler eşit olsa bile bunlardan kaynaklanan biyolojik etkiler farklı olabilmektedir. Yani, biyolojik etki sadece soğurulan doza bağlı değildir. İyonize radyasyonun

geçtiği ortamın birim uzaklıktaki yolu boyunca kaybettikleri enerji kaybına (LET) bağlı olmakta ve LET değeri arttıkça biyolojik etki de artmaktadır. Eşdeğer doz ise bu sebeple soğurulmuş dozun bir takım faktörlerle çarpılması sonucu elde edilir. Özel birimi olan Rem 1 Röntgenlik X ve gama ışını ile aynı biyolojik etkiyi oluşturan herhangi bir radyasyon miktarı olarak tanımlanır. 1 Rem = 0.01 Sv olarak gösterilir. SI birimi olan Sievert (1 Joule/kg) 100 röntgenlik X ve gama ışını ile aynı biyolojik etkiyi oluşturan radyasyon miktarı olarak tanımlanmakta 1 Sv=100 Rem olarak geçmektedir. X ışınları, gamma ışınları ve beta ışınları için 1 Gy = 1 Sv'dir.

Etkin doz terimi, doku veya organların aldığı dozun tüm vücut için yüklediği riski ifade etmek için kullanılan bir kavramdır. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nun dünya genelinde doğal radyasyon kaynakları nedeniyle alınan yıllık etkin dozu 2.4 mSv, tıp alanında çalışan radyasyon görevlilerinin aldıkları dozun yıllık ortalamasını 1 - 5 mSv civarında olduğunu belirtmiştir (www.taek.gov.tr).

Çizelge 2.1. Özel birimler ve SI birimlerinin özetlenmesi (Aydın, 2004)

Büyükük	Özel Birim	SI Birimi	Dönüşüm
Aktivite	Ci	Bq	1Ci=3.7x10 ¹⁰ Bq 1Bq=27.03x10 ⁻¹² Ci
Işınlama	R	C/kg	1R=2.58x10 ⁻⁴ C/kg 1C/kg=3.876x10 ³ R
Soğurulma	Rad	Gy=J/kg	1rad=10 ⁻² Gy 1Gy=100 rad
Doz Eşdeğeri	rem	Sv=J/kg	1rem=10 ⁻² Sv 1Sv=100 rem

2.1.3. Radyasyon Dozunun Hızı ve Aralıklara Verilmesi

Radyasyon Dozu cGy/dakika ya da R/dakika ile tanımlanmaktadır. Soğurulan dozun hızı radyasyonun vereceği biyolojik etkiyi büyük ölçüde değiştirmektedir. Aynı doz radyasyonun düşük doz hızlarında uygulanması sonucu ortaya çıkan biyolojik etkinin yüksek doz hızlarında uygulanmasına oranla daha az olduğu belirlenmiştir. Bu durumun biyolojik sistemlerdeki tamir sistemleri ile ilgisi vardır. Düşük doz hızında uygulanan radyasyon sonucu canlılar oluşan hasarı onarabilirken yüksek doz hızında uygulanan radyasyon, hasar onarımını mümkün kılmayabilmektedir.

Radyobioloji veya radyoterapide uygulanan radyasyon hızı, günde birkaç rad ile saniyenin kesirleri içinde birkaç bin rad gibi değişebilen geniş aralıklarda kullanılmaktadır (Hall et al., 1972). Doz hızları yönünden radyasyonlar dört grupta toplanır. Birinci grup saniyenin kesirleri içinde ani ışınlamalar şeklinde uygulanan çok yüksek doz hızlarıdır. İkinci grup birkaç dakika süren akut ışınlamalar şeklinde uygulanan yüksek doz hızlarıdır. Üçüncü grup saatler ya da günler boyunca süren ışınlamalar şeklinde uygulanan düşük doz hızları ve dördüncü grup ise haftalar, aylar hatta yıllar boyunca süren ışınlamalar şeklinde uygulanan çok düşük doz hızlarıdır.

Klinik radyoterapide yüksek ve düşük doz hızları sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulanan radyasyon dozunun toplam dozu küçük ve eşit dozlara bölünerek belirli aralıklarla uygulanır. Bu uygulamaya fraksinyasyon denmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, bir defa uygulanan 1000 Rad'lık bir doz hücre popülasyonunun hepsini öldürürken bu dozun 24 saat arayla 500 Rad'lık iki seferde uygulanması ölüm oranını hücre popülasyonunda %40'a kadar indirmiştir. Bu durum, geçen süre içerisinde hücrelerde onarım mekanizmalarının çalışmaları ile ilgilidir (Dirican, 2002).

Radyoterapide tedavinin fraksiyonel verilmesindeki amaç; oksik hücrelerin ölmesi ile hipoksik hücrelerde oksijenlenmenin sağlanması (reoksijenasyon), radyasyona duyarlı fazdaki hücrelerin ölmesi ile S fazındaki hücrelerin G2/M fazına geçmelerinin sağlanması (redistribüsyon) ve tümör hücresindeki hasarın arttırılmasıdır. Buna karşılık, fraksiyonasyon DNA'da yol açtığı subletal ve

potansiyel letal hasarın onarımı ve repopulasyon ile de normal doku iyileşmesine izin verir (Tokatlı, 2008). Subletal hasar, radyasyon uygulaması sonrası saatler içinde onarılan hasarlar iken, potansiyel letal hasar hücrelerin bulunduğu ortamın değiştirilmesi (ısının azaltılması, dengeli tuz eriyiğinin katılması gibi) ile onarılan hasarlardır.

Fraksiyonel radyoterapide normal ve tümörlü dokuların yanıtını etkileyen biyolojik faktörler 'Repair' (Onarım), 'Reassortment' ya da 'Redistribution' (Yeniden dağılım), 'Repopulation' (Yeniden çoğalma), 'Reoxygenation' (Yeniden oksijenlenme)'ye ve dokunun radyasyon duyarlılığı (Radiosensitivity) olarak 5 R diye sınıflandırılır (Withers, 1975, Dirican, 2002).

'Repair' (Onarım), Lee tarafından geliştirilen hücre hasarı ve ölümü olasılık prensibine göre hedef teorisi temel alınarak açıklanmıştır. Bu teori hücre içerisinde bulunan çeşitli kritik moleküllerin veya hedeflerin radyasyon tarafından bir vuruşa maruz kalmasını ve inaktif olması gerektiğini kabul eder. Virüsler ve bakteriler için "tek hedef tek vuruş" geçerli iken hücre ölümü için memeli hücrelerinde "çok hedef tek vuruş" geçerlidir. Memeliler söz konusu olduğunda, tüm hücrelerin düşük dozda ölmesi söz konusu olmadığından hücrelerin bir kısmının hasar gördüğü kabul edilir ve bu hasara da subletal hasar denir. Bu hücreler doz uygulamaları arasında onarım imkanı bulabilirler (Lee, 1946)

Reassortment, Redistribution (Yeniden dağılım) mitotik döngü ile ilgilidir. Mitotik döngünün her fazında radyasyona yanıt farklı olmaktadır. Mitoz ve G2 fazları duyarlı fazlardır ancak, sentez fazı en dirençli olan fazdır. Fraksiyone dozlar uygulandığı sırada ve fraksiyonlar arasında canlı kalan hücreler hücre döngüsünün daha duyarlı olan fazlarına doğru ilerler. S fazında bulunan hücrelerin duyarlı olan G2 ve mitoz fazına doğru ilerlemesi tüm hücre popülasyonunun tek doz uygulamasına göre daha duyarlı olan fazda doz almasını sağlar. Bu durum hücre ölümünün artmasına sebebiyet verir (Withers, 1975).

Radyoterapi fraksiyonları arasında hücrelerde repopülasyon yani yeniden çoğalma meydana gelir. Hızla proliferen olan tümörde radyodirençli olan S fazındaki hücre sayısı fazladır. Bir dokuda proliferasyon evresinde hücreler radyasyona uğrar ve ölürlerse onların yerini tamamlamak için yeni hücreler meydana gelir. Bölünen kök

hücreler sayısını yeniden arttırırlar. Fraksiyonlar arasında hipoksik hücrelerin oksijenlenmesi sonucunda hücreler radyasyona daha duyarlı hale gelir ve oksijenlenmiş hücrelerin X ışınlarına duyarlılığı 2-3 kat artmış olur.

Hücrelerin iyonlaştırıcı radyasyona olan duyarlılığı radyosensitivite ya da radyasyon duyarlılığı olarak adlandırılır. Bu durum verilen fraksiyon dozunda veya tek bir ışınlamada bazı tümörlerin diğerlerine göre radyasyona daha duyarlı olma nedenini açıklar (Dirican, 2002). Yapılan çalışmalar lenfoid ve küçük intestinal epitel hücrelerinin vücutta en radyoduyarlı hücreler olduğunu göstermiştir (Kitada et al., 1996).

2.2. Radyasyonun Tıbbi Amaçla Kullanımı

İyonize radyasyon tıpta, tanı ve terapi olmak üzere iki farklı alanda kullanılmaktadır (Silari, 2011). Tıbbi amaçlı uygulama alanları görüntüleme ve radyasyonun hücre ve tümörleri yok edebilme yeteneğine sahip olmasına dayanmaktadır. Tanı yöntemleri ile lezyonlar tespit edilerek, bu lezyonların lokalizasyonu, yayılımı ve zamana bağlı olarak nasıl değiştiği gözlenir.

2.2.1. Tanısal Radyoloji

Tanısal radyolojide iyonize radyasyonun kullanım alanları teknolojiyle beraber gittikçe genişlemektedir. Günümüzde tanısal radyolojinin konvansiyonel radyografi (röntgen), ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve radyonüklit görüntüleme (Nükleer Tıp) gibi farklı uygulama alanları vardır. Bu yöntemlerden röntgen ve bilgisayarlı tomografide X ışınları, ultrasonografide ses dalgaları, manyetik rezonans görüntüleme ve radyonüklit görüntülemelerde ise gama ışınları kullanılır.

2.2.2. Radyoterapi

İyonize radyasyonun hücreleri ölüme götürerek birçok kanser tipinde etkili bir şekilde tedavi amaçlı kullanıldığı iyi bilinen bir olaydır. Radyoterapi veya diğer bir adıyla radyasyon tedavisi; yüksek enerjili X ışını, elektron yayan lineer hızlandırıcılar veya gama ışını yayan radyoaktif maddeler kullanılarak anormal gelişim gösteren kanser hücrelerinin ve hedef tümörlü dokunun yok edilmesi amacıyla uygulanır. Yüksek enerjili radyasyon hücrelerin genetik materyaline zarar

vererek hücre mitotik ölümüne yol açar ve böylece hücrenin daha fazla bölünmesi engellenmiş olur (Jackson and Bartek, 2009).

Radyoterapide hedef anormal hücrelerin maksimum radyasyon dozuna maruz kalmasını sağlarken, radyasyonun geçeceği yolda bulunan veya kanser hücrelerinin yakınında bulunan normal hücrelerin minimum radyasyona maruz kalmasını sağlamaktır (Emami et al., 1991). Kanserli hücrelerin yanı sıra radyoterapi sırasında sağlıklı hücrelerin genetik materyalleri de zarar görmektedir ancak, buradaki temel varsayım sağlıklı hücrelerin kanserli hücrelere göre kendilerini çok daha hızlı tamir ederek tekrar fonksiyonel hale getirebilmesine dayanır (Baskar et al, 2012). Kanser hücreleri, farklılaşmış hücrelerin ölmesi ile sonuçlanan radyasyon tedavisinin yol açtığı hasarı tamir etmekte normal hücreler kadar etkili değildir (Begg et al., 2011).

Radyoterapi diğer antikanser tedavileri gibi terapötik etkisini hücre ölümlerinin farklı tiplerini indükleyerek gösterir (Verheij, 2008; Baskar et al., 2012). Terapi, kanserli hücreyi doğrudan öldürmez. Kanserli hücrenin ölebilmesi için saatler, günler hatta haftalarca tedavi gerekir ve kanser hücreleri radyasyon terapisi sona erdikten sonra bile haftalar, hatta aylarca ölmeye devam edebilir. Radyoterapinin apoptoz, mitotik hücre ölümü, nekroz, senesens ve otofaji gibi farklı tiplerde hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir (Baskar et al., 2012). Radyoterapinin biyolojik etkileri doz dağılımına, tedavi volümüne, doz hızına, fraksinasyon ve tedavi süresine bağlıdır (Özbay, 2012).

2.2.2.1. Radyoterapi Sonrasında Hücrelerde Gözlenen Etkiler

Radyoterapi sonrasında hücrelerde gözlenen iki önemli etki vardır:

1. Fonksiyon kaybı: Birçok, bölünmeyen veya bölünme kabiliyeti kısıtlı hücreler sonuçta fonksiyon kaybına uğrayarak interfaz ölümüne giderler. Bölünmeyen hücrelerde (farklılaşmış sinir ve kas hücreleri) interfaz ölümü sadece yüksek doz (100 cGy'den yüksek) radyasyon verilmesinden sonra görülür. Lenfositler ise küçük dozlarda (100 cGy'den az) interfaz ölümüne giderler.

2. Reprodüktif ölüm (Üreme kabiliyetinin kaybı): Bölünen hücrelerde radyasyonun yaptığı en önemli etkidir. Hücrelerin devamlı reprodüksiyon ile canlı yeni nesil

yapabilme kabiliyetinin ortadan kalkması ile sonuçlanır.

2.3. İyonize Radyasyonun Canlılar Üzerindeki Etkileri

İyonize radyasyon biyolojik bir maddeden geçtiğinde o maddeyle etkileşir ve bu etkileşme sırasında birçok fiziksel, fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik olaylar zinciri sonucunda asıl biyolojik cevap meydana gelir.

Radyasyon etkisine bağlı olaylar 4 evreden oluşmaktadır:

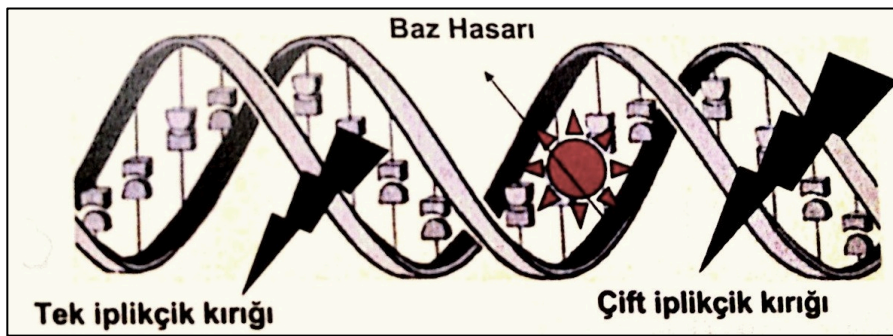
1. Fiziksel evre: Radyasyon tarafından uyarılmış olan ve iyonize moleküller oluşur. Ortalama süresi 10^{-18} saniyedir.
2. Fiziko-kimyasal evre: Primer maddeler, kimyasal olarak reaktif serbest atomlar ve serbest radikaller meydana getirmek için, stabil molekül oluşturmak üzere sekonder reaksiyona girerler. Ortalama süresi 10^{-13} saniyedir.
3. Kimyasal evre: Kimyasal olarak reaktif olan maddeler ortam içinde birbirleriyle reaksiyona girerler. Ortalama süresi 10^{-6} saniyedir.
4. Biyolojik evre: Organizmanın ışınlama sonucu meydana gelen kimyasal ürünlerine vermiş olduğu biyolojik cevaptır. Ortalama süresi 10^{-6} saniyeden başlayıp yıllarca sürebilir.

2.3.1. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonize radyasyonun canlıda hasar meydana getirebilmesi için ister elektromanyetik ister partiküler olsun hücreler ve dokular tarafından soğurulması gerekmektedir. Radyasyon sonucu canlıda oluşan cevaplar subsellüler cevap, hücresel cevap, doku cevabı ve tümör cevabı başlıkları altında toplanabilir. Elektronlar ve protonlar gibi yüklü parçacıklar yeterli kinetik enerjileri sayesinde kimyasal bağları koparabilir ve dolaysız yolla iyonizasyona yol açarlar. X ve gamma gibi elektromagnetik ışınlar ve nötronlar ise dolaylı olarak iyonizasyon yapabilirler. Nötronlar ise emildikleri maddedeki atomların çekirdekleriyle etkileşerek kinetik enerjilerini protonlara aktarıp iyonizasyona neden olurlar.

Radyasyon hücrenin kritik moleküllerine etki eder ve molekülde meydana gelen hasar, ya molekülün dolaysız olarak iyonizasyonu veya dolaylı olarak etkisi ile ortaya çıkar. Genelde dolaylı etki büyük hasarlar oluşturur. Radyasyona maruz kalan hücrelerde en belirgin etkinin gözlendiği hedef makromoleküller nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbonhidratlardır.

DNA radyasyonda en önemli hedeftir. Radyasyonla ışınlanma sonucunda bazlarda değişiklik veya yok olma, hidrojen bağlarının kopması, tek ve çift iplikçiklerde kırılma, dimerizasyon gibi değişikliklere sebep olur (Şekil 2.7). Kromozomal değişmelerin çoğu DNA zincirindeki ani kırılmalardan meydana gelmektedir. Çift zincir kırıkları en önemli lezyonlardandır ve özellikle onarılamayan kırıklar birbirine yakın meydana gelen iki kırıktır. Radyasyonun etkisi ile DNA'nın tek ipliğinde kopma olasılığı çift ipliğinde kopma olasılığından fazladır. Onarılmayan çift zincir kırıkları hücre için ölümcül olabilmektedir, yanlış eşleşen kırıklar ise mutajenik lezyonlar göstermektedir. Radyasyon DNA zinciri boyunca nükleotidlerin ayrışmasına neden olur. Bazen bir iyonize radyasyon, nükleotiddeki azotlu bazın değişmesiyle, genlerde nokta mutasyonlara neden olabilir ve genetik şifre değişmiş olur. Bazen baz DNA molekülünden tamamen ayrılabilir (Kaya, 2002). Hücre ölümü, mutagenез ve malignan dönüşüm gibi toksik etkilerin hücrede DNA'da meydana gelen hasar sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir (Nias, 1998). Meydana gelen bu kırıklar genetik kodun transkripsiyonunu değiştirebilmektedir. Aynı zamanda radyasyonun etkisiyle şeker-fosfat bağlarında kopma, bazların zincirden koparak serbest kalmaları ve yüksek dozlarda parçalanmalar meydana gelebilmektedir. Bu parçalanmalar sonucu çok küçük moleküller tekrar gelişmiş güzel birleşerek birçok küçük DNA parçasından oluşan bozukluklar ortaya çıkarabilir.



Şekil 2.7. Radyasyon ile ışınlanma sonrası DNA hasarı (TAEK, 2011)

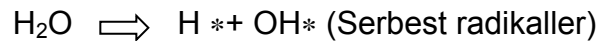
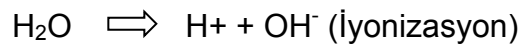
Radyasyon proteinlerde yan zincir gruplarında tahribat ve konformasyon değişikliğine neden olurken lipitlerde doymamış yağ asitlerin peroksitleri meydana gelir. Karbonhidrat zincirlerinde ise kopmalar görülür.

2.3.1.1. İyonize Radyasyonun Dolaysız Etkisi

Radyasyon enerjisinin DNA ve enzimler gibi biyolojik moleküllere transfer edilmesi moleküllerin iyonizasyonuna ve uyarılmasına sebep olur (Şekil 2.7). Bu duruma radyasyonun direkt veya dolaysız etkisi denir ve sonuçta hücrede ölüm ya da fonksiyon değişikliği (mutasyon) meydana gelebilir. Kısa ömürlü ve çok reaktif olan molekül ve atomlar birden fazla kimyasal bağın kırılmasına sebebiyet verir. Bu radikallerin oluşumu fotonun geçişinden sonra pikosaniyeler içerisinde gerçekleşir. Radyasyon sonucu meydana gelen hasarın 1/3'ünün fotonun doğrudan DNA ile etkimesi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (Tokatlı, 2008).

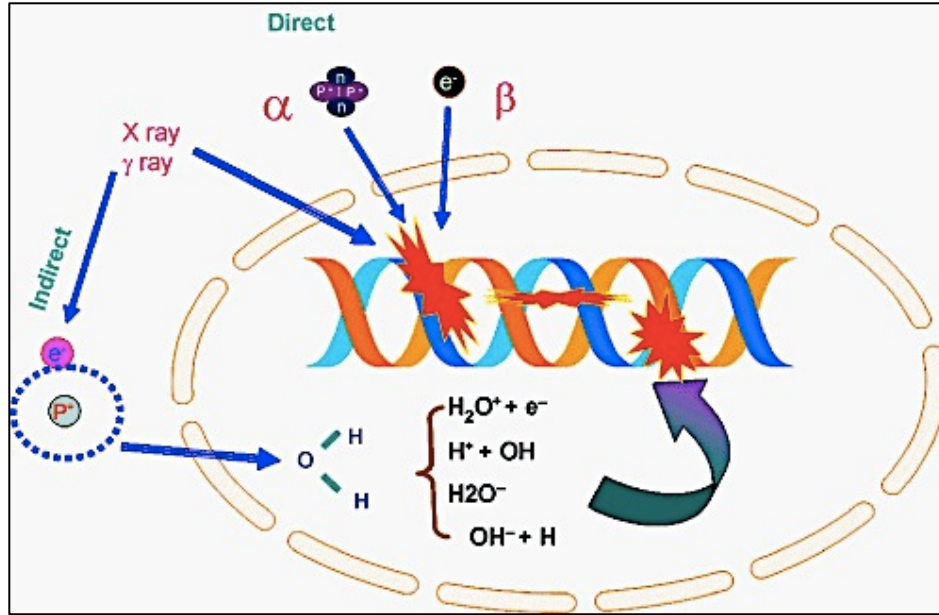
2.3.1.2. İyonize Radyasyonun Dolaylı Etkisi

İyonize radyasyonun DNA'da yol açtığı subletal ve potansiyel letal hasarın 2/3'ü indirekt ya da dolaysız yani su molekülü ile reaksiyona girerek ortaya çıkan reaktif serbest radikaller yoluyla meydana gelir. Hücrenin yaklaşık %80'ni sudan oluşur ve hücrenin yapıtaşları olan enzim, protein, RNA ve DNA gibi makromoleküller, mitokondri gibi organeller sudan oluşan ortamlarda bulunurlar. Ancak, radyasyonun biyolojik etkisini gösterebilmesi için ortamda moleküler oksijen olmalıdır.



Fiziko-kimyasal evrede meydana gelen serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir yörünge elektronu bulunduran serbest atom veya moleküllerdir ve elektriksel açıdan yüksüzlerdir. Radyasyon enerjisinin ışınlama durumlarında su molekülleri tarafından soğurulma olasılığı çok yüksektir. Su molekülleri bu durumda iyonlaşır, pozitif yüklü su molekülü ile hızlı bir serbest elektron oluşturur. Bu serbest elektron su içinde bir başka su molekülü ile birleşir ve onu negatif bir su molekülü haline getirir. Meydana gelen pozitif ve negatif yüklü su molekülleri reaksiyonlarıyla serbest hidroksil ve hidrojen radikallerini oluşturur. (Kaya, 2002).

Oksijen ortamda arttıkça radyasyonun verdiği hasarda artmaktadır. Serbest radikaller oksijen molekülleri ile reaksiyona girdiğinde hidrojen ve bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur (Günel, 2003).



Şekil 2.8. Radyasyonun dolaylı ve dolaysız etkileri (Tuorkey, 2012)

2.3.1.3. İyonize Radyasyonun Somatik Etkisi

Somatik etkiler ışınlanan kişide yaşam boyu ortaya çıkabilecek biyolojik etkilerdir. Somatik etkinin cinsi ve önemi, maruz kalınan toplam radyasyon dozu, radyasyon dozunun alındığı zaman süresi, radyasyonlara maruz kalan vücut kısmı ve alanına bağlıdır.

Büyük bir radyasyon dozuna bir defada maruz kalma sonucu ortaya çıkan biyolojik etkiler yani “Erken Etkiler (Akut Işınlanma Etkileri)”, kişiden kişiye önemli ölçüde değişmektedir. Ancak bu durumda genel olarak birkaç gün veya birkaç hafta içerisinde şiddetli hasarlar, hastalıklar ve hatta ölüm meydana gelebilir.

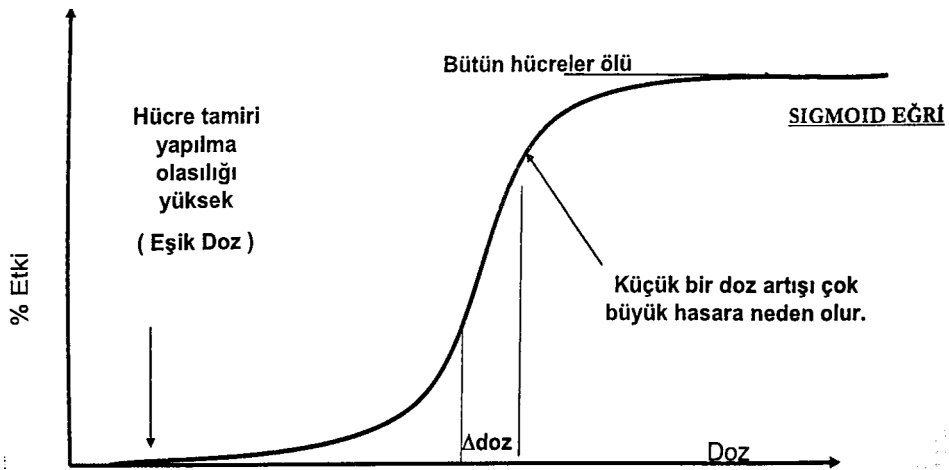
Gecikmiş Etkiler (kanserojen etkiler) yani kronik ışınlanma etkileri kişilerin uzun bir süre içinde aralıklı olarak düşük dozlara maruz kaldığında yıllar sonra ortaya çıkan etkilerdir. Doz düşük olsa da tekrarlanan ışınlamalar sonraki ışınlamaya kadar hasar tamirinin gerçekleşmesine engel olacağı için hasarın gittikçe artmasına, birikmesine ve yıllar sonra kanser, katarak veya ömür kısalması gibi durumların ortaya çıkmasına sebep olur (Algüneş, 2002).

2.3.1.4. İyonize Radyasyonun Genetik Etkisi

Alınan radyasyon dozu somatik etkilere ilave olarak üreme hücrelerini etkileyebilir. Bu durum radyasyona maruz kalan kişilerin sonraki nesillerinde görülebilir. Bu duruma radyasyonun genetik etkisi denir. Üreme hücrelerinde meydana gelen gen mutasyonları veya kromozom kırıkları sonraki nesillerde ortaya çıkacak olan kalıtsal değişiklikleri meydana getirir. Radyasyonun kalıtsal etkisi ile tavşan dudaklı altı parmaklı bebeklerin meydana geldiği saptanmıştır. Gelecek nesillerde ortaya çıkması olası etkiler stokastik etkilerdendir.

2.3.1.5. Deterministik Etkiler

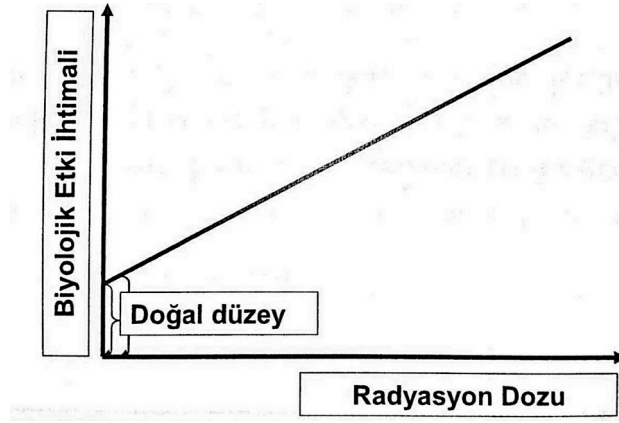
Deterministik etkilerin eşik dozu vardır. Etkinin şiddeti doz ile artmaktadır. Çok yüksek bir doz bir anda alındığında birkaç hafta içinde ölüme neden olabilmektedir. 5 Gy'e kadar olan dozlarda uygun tedavi yapıldığı takdirde kişilerin hayatı kurtarılabilir, ancak 50 Gy'lik doz alındığında medikal tedavi yapılsa bile kesinlikle ölüm gerçekleşir. Tüm vücudun değil de, vücudun belirli bir bölgesinin çok yüksek bir doz alması halinde ölüm olmasa da ışınlanan bölgede erken etkiler görülecektir. Benzer dozun üreme organları tarafından alınması halinde kısırlık meydana gelir. Bu tip etkiler radyasyonun deterministik etkileri olarak isimlendirilir. Bu tür etkiler ancak doz ve doz hızı bir eşik değeri geçtiği takdirde meydana gelir (www.taek.gov.tr).



Şekil 2.9. Deterministik doz Tepki Eğrisi (www.taek.gov.tr).

2.3.1.6. Stokastik Etkiler

Eşik doz, etkinin çıkması için söz konusu değildir ve etkinin olasılığı doz ile artar. Düşük dozlarda ortaya çıkması olası etkilerdir. Stokastik etkiler nedeniyle kanser olma olasılığının saptanmasında belirsizlikler vardır. Kanser düşük dozdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek mümkün değildir. Bunu ortaya koyacak somut veriler yoktur. Stokastik etkilerin olasılığı yüksek doz almış kişiler ve hayvan deneylerinin sonuçlarına dayanılarak tahmin edilmektedir (www.taek.gov.tr).



Şekil 2.10. Stokastik Doz-Tepki Eğrisi (www.taek.gov.tr).

2.3.2. Radyasyon Hasarına Etki Eden Faktörler

Radyasyonun biyolojik etkilerini maruz kalınan toplam doz, maruz kalınma süresi, maruz kalınma şekli (iç ve dış ışınlanma), dozun hangi aralıklarla alındığı (fraksiyonasyon), radyasyonun türü ve enerjisi (LET) gibi faktörler belirler. Aynı enerjideki farklı radyasyonlardan soğurulan enerji miktarı aynı olsa bile bunların meydana getirdiği biyolojik etkiler farklı olabilir. Ancak canlıların bu etkilere karşı duyarlılıkları ve dirençleri farklılık gösterir. Kişinin yaşı, cinsiyeti genel sağlık durumu radyasyona karşı oluşan biyolojik hasarları etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Sık sık bölünen hücreler ara sıra bölünen hücrelere göre radyasyondan daha fazla etkilenmektedir. Ayrıca canlılar dokunun oksijen yoğunluğuna, ışınlanma sırasında hücrelerin bölünme safhasına, kan ve besin durumuna bağlı olarak radyasyona farklı duyarlılıklar gösterebilirler.

2.4. İyonize Radyasyona Cevap Olarak Aktif Hale Gelen Yolaklar

Hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin son 20-30 yılda hızla gelişmesiyle birlikte hücrede iyonize radyasyona cevap olarak devreye giren yolaklar da aydınlatılmaya başlanmıştır. Hücreler radyasyonun yol açtığı plazma membran lipitleri ve DNA hasarına karşı karmaşık protein sinyal sistemleri kullanırlar (Lewanski and Gullick 2001). İyonize radyasyon hücre içerisinde meydana gelen birçok önemli hücresel süreçte (DNA hasarı ve tamiri, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi ve oksidatif strese cevap gibi) bir seri biyokimyasal olayı tetikler (Zhang et al., 2010). Bu durum çok fazla sayıda hedef molekülün radyasyon cevabının oluşması için upregüle veya downregüle olmasını sağlar (Lewanski and Gullick 2001).

2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı

Radyasyona maruz kalmış hücrelerde hangi tip hücre ölümünün gerçekleşeceği hücresel gen ifadesi ve sinyal iletimi tarafından belirlenir. Yapılan çalışmalar, radyasyon tarafından indüklenen hücre ölüm süreçlerinden her birinin hücresel endoplazmik retikulum (ER) ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Zhang et al., 2010). Bunun yanı sıra in vivo çalışmalarda radyasyona maruz kalma süresi boyunca ER'da yapısal modifikasyonların olabileceği gösterilmiştir (Boraks et al., 2008; Hussein et al., 2008). Bütün bu veriler ER'un IR hedefi olduğunu göstermektedir.

ER, salgılanan proteinlerin sentezlendiği ve katlandığı yerdir. Aynı zamanda Ca^{+2} depolayan organel olup kalsiyum sinyallerinin kaynağıdır. ER, çevresel uyarılara karşı çok hassastır. Fonksiyonlarını bozacak ya da aksatacak durumlar söz konusu olduğunda artan protein sentezinden dolayı ER lümeninde yeni sentezlenen fazla miktarda katlanmamış protein birikir. Bu durum katlanmamış protein cevabı yolağının (UPR) aktivasyonuna sebep olur (Hotamışılıgil, 2010). UPR yolağı translasyonu azaltarak ve protein katlanması, sekresyonu ve degradasyonunu teşvik ederek ER'da birikmiş olan proteinlerin azalmasını sağlar (Zhao and Ackerman, 2006). Bu süreç, hücrenin hayatta kalması için adaptif bir tepki oluşmasına neden olur.

ER stresi altında, üç ana sinyal iletim yolağı uyarılır: PERK (interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase(PRKR)-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) ve IRE1 (inositol requirement 1). ER stresinin sinyal iletim yolağı (PERK, ATF6 ve IRE1) iyi bir şekilde anlaşılmıştır. (Şekil 2.11). IRE1, PERK ve ATF6, ER stresi söz konusu olduğunda çekirdekte UPR hedef genlerinin transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlar. Bir moleküler şaperon olan GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein) veya diğer adlarıyla BIP (Binding immunoglobulin protein) veya HSPA5 (heat shock 70 kDa protein 5), stresin olmadığı koşullarda bu üç proteine bağlıdır ve bu proteinlerin fosforilasyonunu engeller. Stres koşullarında ise katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarı artacağından dolayı bu proteinleri serbest bırakarak aktive olmalarını sağlar.

GRP78, ER lümeninde lıyerleşmiş olan bir HSP70 moleküler şaperondur. Yeni sentezlenen proteinlere bağlanarak proteinlerin sonraki katlanmaları veya oligomerizasyonu için onları ER içine yönlendirir. Katlanmamış proteinlerin proteozom tarafından degradasyonu için ER membranından ters taşıma görevini de gerçekleştirir ve aynı zamanda Ca^{+2} dengesini düzenler. Şaperon fonksiyonuna ilaveten GRP78, ER stresinde anahtar bir düzenleyicidir. Hücrede fazla miktarda bulunan bir protein olmasına rağmen stres koşullarında biriken katlanmamış protein cevabına karşı fazla miktarda üretilir (Healy et al., 2009).

2.4.1.1. PERK Sinyal İletim Yolağı

PERK bir endoplazmik retikulum membran protein kinazdır ve ER stresine cevap olarak eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha) fosforilasyonunu sağlamaktadır. eIF2 α fosforilasyonu, AUG başlama kodonlarının tanınmasını azaltarak translasyon başlama kompleksinin oluşumunu azaltır. Bu durum da hücrede genel translasyonun azalmasına sebep olur. Bu translasyonel kontrol, ER'de katlanmamış proteinlerin sayısını azaltmak için etkili bir yoldur. Buna zıt olarak, ATF4 (Activating transcription factor 4) gibi eIF2 α 'ya ve translasyon başlama kompleksine çok daha az ihtiyacı olan bazı seçici mRNA'ların translasyonları artar (Liu and Kaufman, 2003).

Yapılan çalışmalar ER stresi yaratılan hücrelerde ATF4'ün amino asit metabolizmasını ve transportunu kontrol ettiğini göstermiştir ve ATF4 içermeyen hücrelerde ise ER ve diğer streslere karşı (amino asit eksikliği, oksidatif stres) yatkınlığın arttığı görülmüştür. ATF4'ün kodlanmayan bölgesindeki upstream açık okuma çerçevesi mRNA'sı, ATF4'ün translasyonunu baskılar. Standart ER stresi boyunca, fosforile olmuş eIF2alfa, ATF4 mRNA'sının upstream açık okuma çerçevesinin bypass şeklinde geçilmesine izin verir ve böylece etkili bir şekilde ATF4 translasyonu gerçekleşir. ATF4 transkripsiyonel olarak ER şaperonlarının ve aynı zamanda proapoptotik genler olan GADD153 (growth arrest and DNA damage 153), diğer adıyla CHOP (CCAAT/ enhancer binding protein homologous protein) ifadesinde artışa neden olur (Harding et al., 2000).

GADD153 veya CHOP endoplazmik retikulum stresinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür ve endoplazmik retikulum stresinde ifadesi en çok artan genlerden birisidir. GADD153'ün artan ifadesinin hücre döngüsünün durmasına ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir.

ATF4 ayrıca LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) promotorunda siklik AMP cevap elementi bağlanma bölgesine dolaysız bağlanarak otofajiyi kolaylaştırmaktadır (Rzymiski et al,2010).

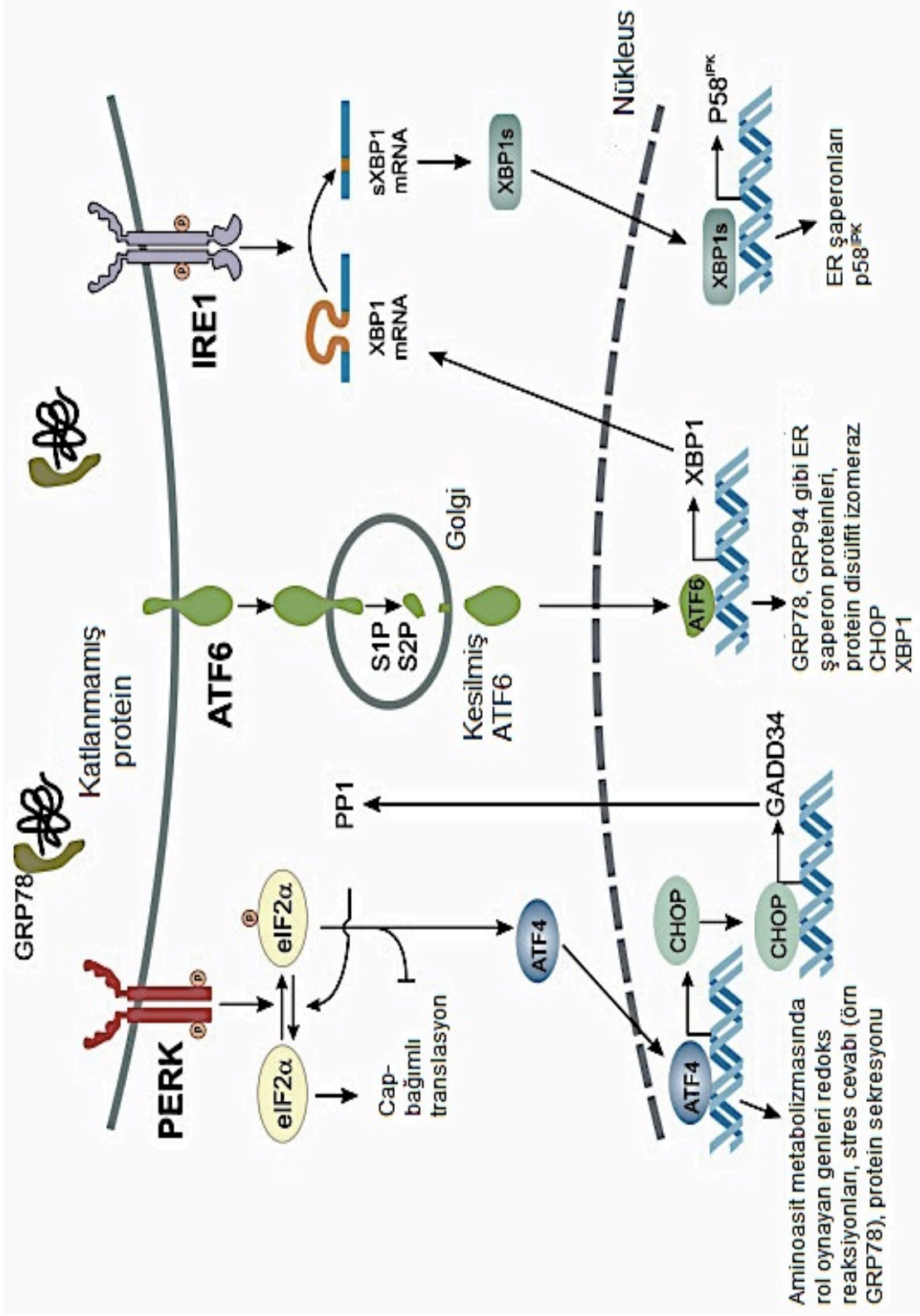
2.4.1.2. ATF6 Sinyal İletim Yolağı

Diğer bir sinyal iletim yolağı olan ATF6 ER transmembran-aktive edici transkripsiyon faktörüdür. ER stresine bağlı olarak ATF6 α ve ATF6 β , sitozolik bir fragment vermek için S1P ve S2P proteazları tarafından kesildikleri golgi kompartmanına geçer. Serbest olan ATF6 fragmenti, transkripsiyonu aktive etmek için buradan çekirdeğe göç eder (Liu and Kaufman, 2003).

2.4.1.3. IRE1 Sinyal İletim Yolağı

IRE1 sinyal iletim yolağı ise bir ER transmembran glikoproteinidir ve sitoplazmik domaininde hem kinaz hem de RNaz aktivitesi göstermektedir. ER stresi IRE1'in otofosforilasyonuna yol açarak RNaz aktivitesinin başlamasına sebep olur (Liu and Kaufman,2003).

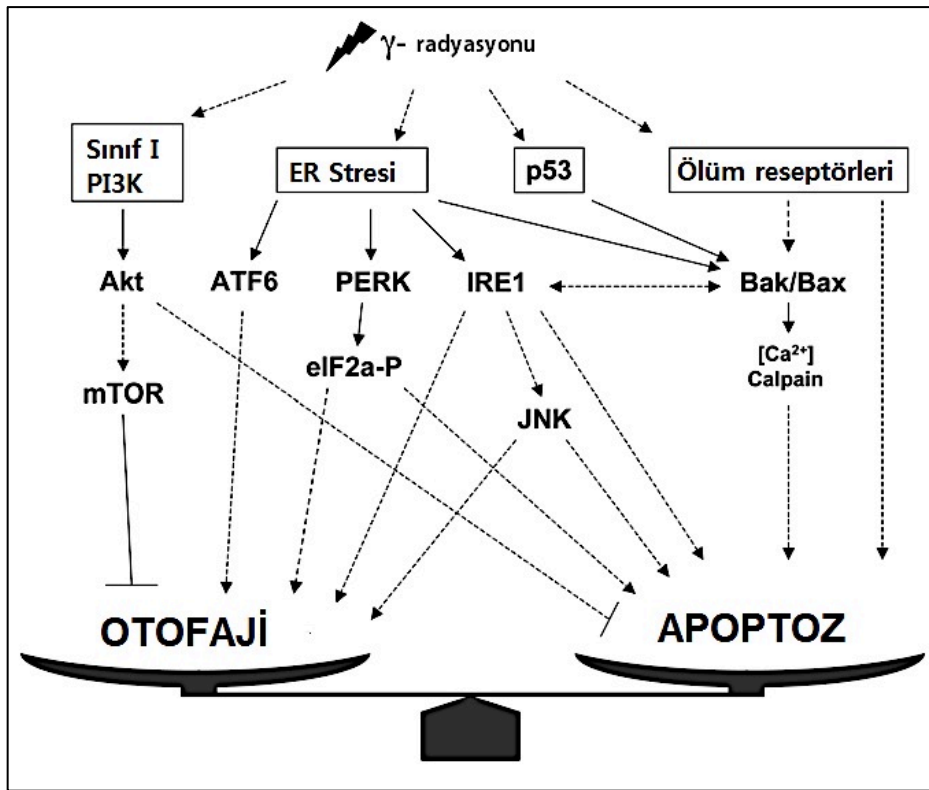
Memelilerde IRE1 α and IRE1 β 'nin substratı, bazik-lösin-fermuar domaini içeren transkripsiyon faktörü XBP1 (X-box binding protein 1)'in mRNA'sıdır. XBP1 önemli genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. XBP1 mRNA'sı normalde sitoplazmada bulunmaktadır. IRE-1'in RNAaz aktivitesi ile XBP1 mRNA'sından 26 nükleotit uzaklaştırılır ve oluşan kırpılmış XBP1 mRNA translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşür. Transkripsiyon faktörü olarak ER genişlemesinde, katlama kapasitesinin artmasında ve ER ilişkili yıkım yolunun aktivasyonunda rol alan genlerin transkripsiyonunu uyarır. ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin upregulasyonuna neden olur ve böylece ER homeostazı korunmuş olur (Kaufman, 2002a; Kaufman et al., 2002b; Schröder and Kaufman, 2005).



Şekil.2.11. Katlanmamış protein cevabından sorumlu olan sinyal iletim yollarının şematik olarak gösterilmesi

2.4.2. Apoptoz ve Otofaji Arasındaki Moleküler Bağlantılar

ER stresi, temel olarak hücre stres altında hücre sağkalımı ile bağlantılıdır ancak, hücre stresinin deregülasyonu apoptozu ve aynı zamanda spesifik bir yoldan da otofajiyi tetiklemektedir (Şekil.2.12). Memeli hücrelerinde, ER stresörleri, otofagozom oluşumunu ve ER stresi sonrasında otofaji aktivasyonu için gerekli olan IRE1-Jun kinaz (JNK) yolağını önemli derecede indükler (Ogata et al., 2006).



Şekil.2.12. Radyasyon tarafından indüklenen apoptoz ve otofaji arasındaki dengenin şematik gösterimi (Moretti et al., 2007).

Otofaji daha çok sitoplazmada gerçekleşen bir hücre ölümüken, apoptozda hedef, hücre çekirdeğindeki DNA'dır (Öz Arslan vd., 2011). İki tip hücre ölümü morfolojik olarak birbirinden farklılık gösterir. Apoptozda sistein proteazlar olan kaspazların etkinliğine bağlı olarak hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın bozulması ve sonunda apoptotik cisimlerin

parçalara ayrılması gözlenirken otofajide, Atg proteinleri ile kontrol edilen, sitoplazmada oluşan birden fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/ya mitokondri, ER gibi organelleri içeren veziküller gözlenir (Zois et al., 2009).

Radyasyona maruz kalma sonrasında apoptoz temel ölüm şekli olarak düşünülmüşse de yapılan çalışmalar, özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda otofajinin aktive olarak, apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrelerin ölümüne yol açabildiğini göstermiştir (Eisenberg-Lerner et al., 2009). Otofajinin apoptoza paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağladığı veya apoptoz için bir ön koşul olduğu gibi en az üç farklı bağlantı gözlenmiştir (Öz Arslan vd., 2011). Son elde edilen veriler, bazı ortak faktörler ve ortak paylaşılan bileşenlerle bu iki yolağın beraber düzenlendiğini ve her bir yolağın bir diğerinin aktivitesini düzenleyip modifiye edebildiğini göstermiştir. Başlangıçta apoptoz aktivasyonu kapsamında çalışılan çoğu sinyalin otofajiyi de beraberinde indüklediği, bununla beraber apoptozu inhibe eden sinyallerin otofajiyi de inhibe ettiği bulunmuştur (Hsieh et al., 2009). Bütün bu olaylara bakıldığında apoptoz ve otofaji yollarının birbirleri tarafından sinyal olarak uyarılabileceği yani ilişkilerini beraber düzenleyebilecekleri sonucuna varılmıştır.

Otofaji ile ilişkili proteinler olan Atg proteinlerinin aynı zamanda apoptoz yolları tarafından da kullanılabilirdiği ve düzenleyici rolleri olduğu gözlenmiştir (Gordy and He, 2012). Apoptoz ve otofajiyi beraber düzenleyen yollardan biri Bcl-2 protein ailesidir. Bcl-2 protein ailesinin apoptozla birlikte otofajinin de önemli düzenleyicileri olduğu gözlenmiştir. (Hsieh et al., 2009). Antiapoptotik Bcl-2 protein ailesi hem apoptozu hem de otofajiyi baskılayarak ikisini bir arada koordine etmektedir. Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin otofagozom oluşumu için gerekli olan Becin-1 proteini ile ilişkiye girerek otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir (Pattingre et al., 2005).

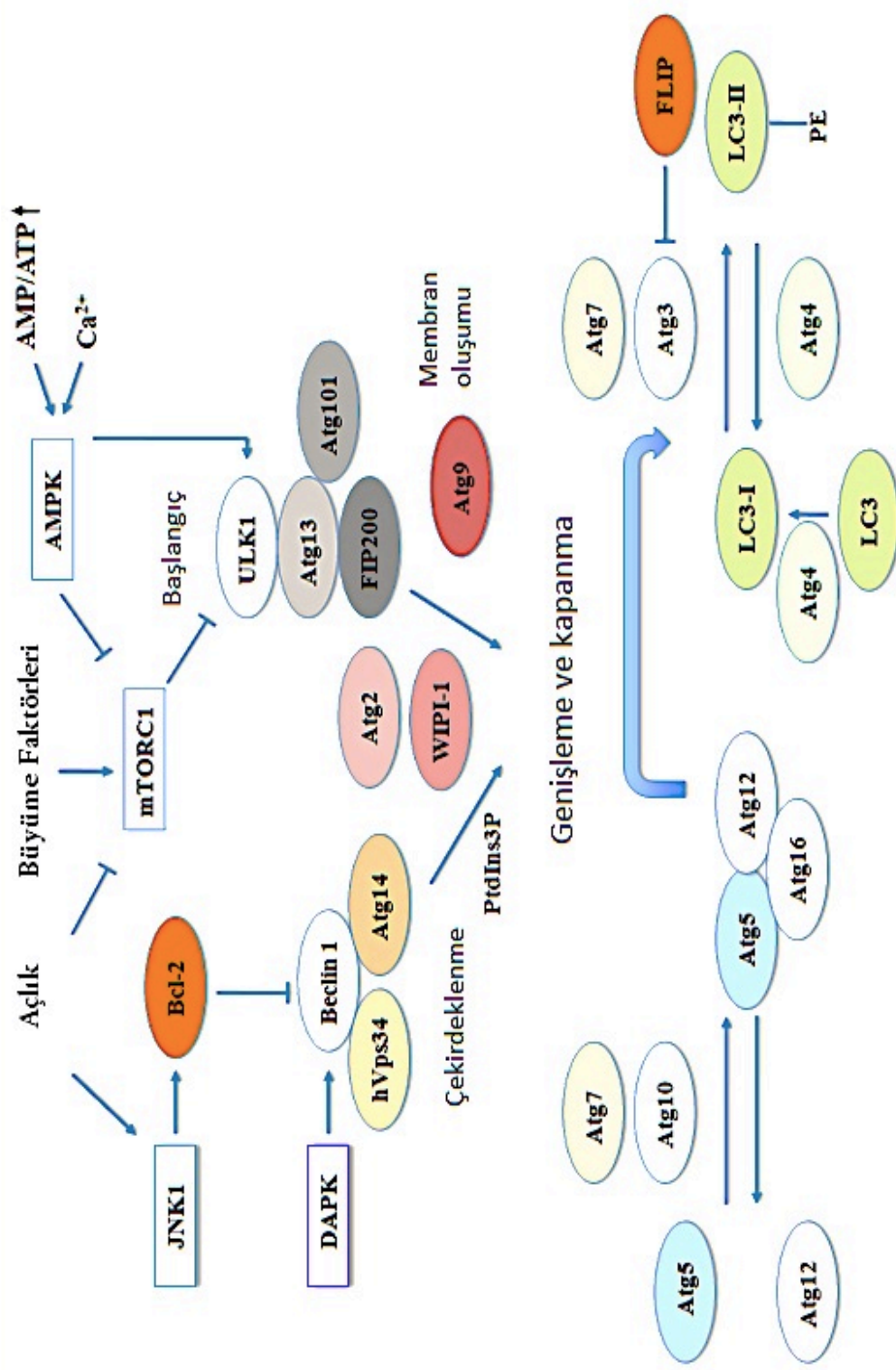
Kalsiyum/kalmodulin bağlanmasıyla düzenlenen bir serin/treonin kinaz olan DAPK'nında apoptoz ve otofajiyi düzenlediği gözlenmiştir. Onkogenler tarafından p53 aktivasyonu ve apoptotik hücre ölümü uyarımı için gerekli bir protein olan DAPK Beclin-1'e doğrudan bağlanıp onu fosforilemekte ve Beclin-1 bu fosforillenme sonucunda Bcl-XL'den ayrılıp otofajinin aktive olmasında görev

almaktadır. Yapılan çalışmalar DAPK'nın aynı hücrede hem apoptoz hem de otofaji uyarımına yol açtığını ve iki hücre ölümü arasında bir moleküler anahtar olduğunu göstermiştir (Öz Arslan vd., 2011).

JNK1/2 adlı hücresel stres ve hücre ölümü ile bağlantılı kinazlar ise DAPK'ya benzer aktivite göstererek yine Bcl-XL'in fosforillenmesini sağlamakta bu durum Beclin-1'e bağlanmayı zayıflatmakta ve otofajiyi aktive etmektedir. Son çalışmalar kaspaz aktivitesiyle Beclin-1'in parçalanmasının apoptoz sırasında otofajiyi sınırlandırabileceği üzerinde yoğunlaşmıştır (Gozuacik vd., 2008; Norman et al., 2010).

Diğer bir önemli düzenleyici olan P13K/Akt/mTOR yolağında, evrimsel olarak korunmuş bir protein kinaz olan mTOR (mammalian target of rapamycin)'un otofaji üzerindeki inhibitör etkisi ve Akt(A serine/threonine protein kinase)'ın apoptoz üzerindeki inhibitör etkisi hayatta kalmayı sağlamaktadır. mTOR otofaji ve hücre büyümesi arasındaki dengenin ana düzenleyicilerinden biridir (Paglin and Yahalom, 2006). Hücrede herhangi bir stres söz konusu olmadığında mTOR, ULK1 (mayada Atg1) kompleksinin kinaz aktivitesini inhibe ederek otofajiyi baskılar. Stres koşullarında ise mTOR inhibe olarak ULK1 kompleksi ile otofajinin başlamasını uyarır. Bu komplekste Atg13 ve FIP200 (mayada Atg13-Atg17-Atg101) ULK1 kinaz aktivitesinin substratlarıdır (Mehrpour et al., 2011).

Yine apoptozu uyarıcı bir protein olan p53'ün hücredeki yerine bağlı olarak, çekirdekte bulunduğu transkripsiyonel etkiyle otofajiyi indüklediği, sitoplazmada ise baskıladığı gösterilmiştir (Taşdemir vd., 2008; Öz Arslan vd., 2011).



Şekil. 2.13. Otofajinin düzenlenmesi, sinyal molekülleri ve apoptotik araçları ile bağlantısı (Mehrpour et al., 2011)

2.4.3. Otofaji

Otofaji evrimsel olarak korunmuş, sitoplazmik proteinleri ve peroksisomlar, mitokondriler, endoplazmik retikulum gibi organelleri lizozomal yolla degradasyona uğratan bir süreçtir (Mathew et al., 2007). Otofajinin temel fizyolojik fonksiyonu hücrel protein ve organel kalitesinin kontrolünü sağlayarak, katlanmamış ve anormal proteinlerin birikimini engellemek, bu şekilde de hücre içi metabolik homeostazı sağlamaktır (Zeng and Kinsella, 2011). Otofaji metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede genomik DNA'nın hasardan korunmasını da sağlar. Otofaji ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, hücrelerin besin yokluğunda hücredeki stresi azaltmak ve homeostazı sağlamak için hücre içi molekülleri otofaji ile yıktığını göstermiştir. Ancak son on yılda görülmüştür ki otofaji, hücrel metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi proteinlerin yıkımında etkili rol oynamaktadır (Öz Arslan vd., 2011).

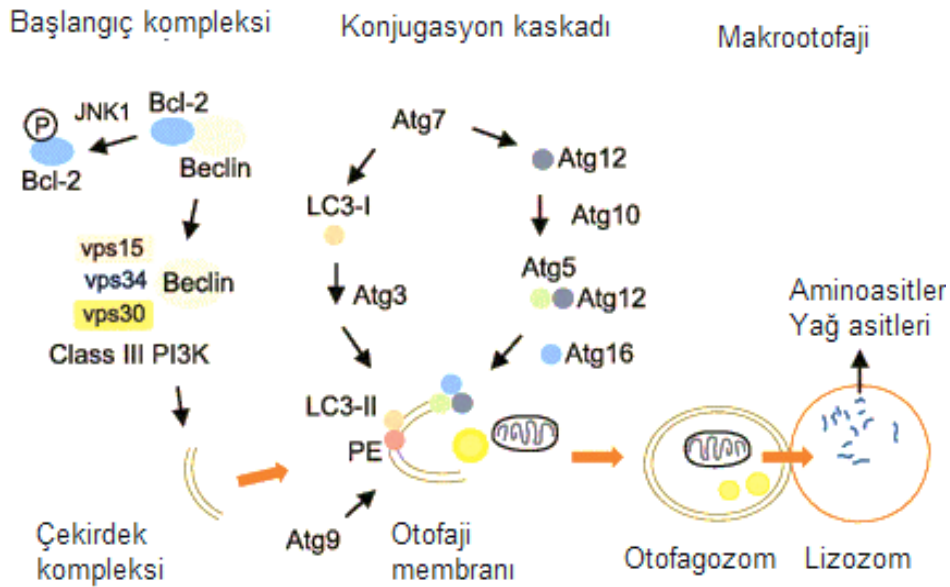
Memeli hücrelerinde otofaji üç farklı mekanizma ile gerçekleşir (Yamada and Singh, 2012). Bunlardan biri sitozolik kargonun (protein, organeller vb.) lizozoma taşındığı, pek çok hücrede bazal düzeyde gerçekleşen, protein parçalarının ve hasarlı organellerin sindirilmesinde asıl görevi üstlenen makrotofajidir. Diğer mekanizma olan mikrotofaji sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesidir. Şaperon aracılı otofaji ise KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınmasını sağlar. Makrotofajide ilk önce otofagozomlar meydana gelir. Otofagozomlar, izolasyon membranları adı verilen küçük membran yapılarının uzamasıyla meydana gelen çift katlı membran yapısındaki veziküllerdir. Bu membranlar ER'den, mitokondrilerin dış membranından ya da plazma membranından meydana gelirler ve içlerine parçalanacak olan molekülleri alırlar. Daha sonra otofagozomlar lizozomlarla birleşirler ve otolizozomları meydana getirirler ve böylece içerik, lizozomal enzimler tarafından yıkıma uğrar.

Otofaji ile bağlantılı proteinlerin büyük bir kısmı Atg (Autophagy related proteins) olarak adlandırılmıştır ve mayalar üzerinde yapılan detaylı çalışmalar sonucu günümüzde 30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır (Xie and Klionsky, 2007; Yamada and Singh, 2012). Bu Atg proteinleri, otofajinin uyarılması, çekirdek kompleksinin oluşumu, otofagozom oluşumu ve kargo tanımlanması gibi adımları düzenleyerek

temel otofaji fonksiyonlarını gerçekleştirirler (He and Klionsky, 2009). Otofaji çoğu memeli hücrelerinde temel seviyede gerçekleşmekte, stres ve açlık durumlarında ise çok kuvvetli bir şekilde upregüle olmaktadır.

2.4.3.1. Otofagazom Oluşumu

Otofajinin gerçekleşmesi ve otofagozom oluşumu için Beclin'in (mayada Atg6) bağlı olduğu partneri Bcl-2'den ayrılması ve yeni bir çekirdek kompleksinin oluşması gerekir (He and Klionsky, 2009; Singh and Cuervo, 2011). Beclin'inin serbest kalması Atg14 (Vps15) ve lipid kinaz Vps 34 ile geçici bir kompleksin oluşmasına sebep olur. Böylece fonksiyonel fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksi oluşmuş olur. Bu kompleksin lipid kinaz aktivitesi ile diğer Atg moleküllerinin çekirdek kompleksini hedeflemesine olanak sağlayan fosfotidilinositol 3-fosfat ürünü oluşur (Şekil 2.12).

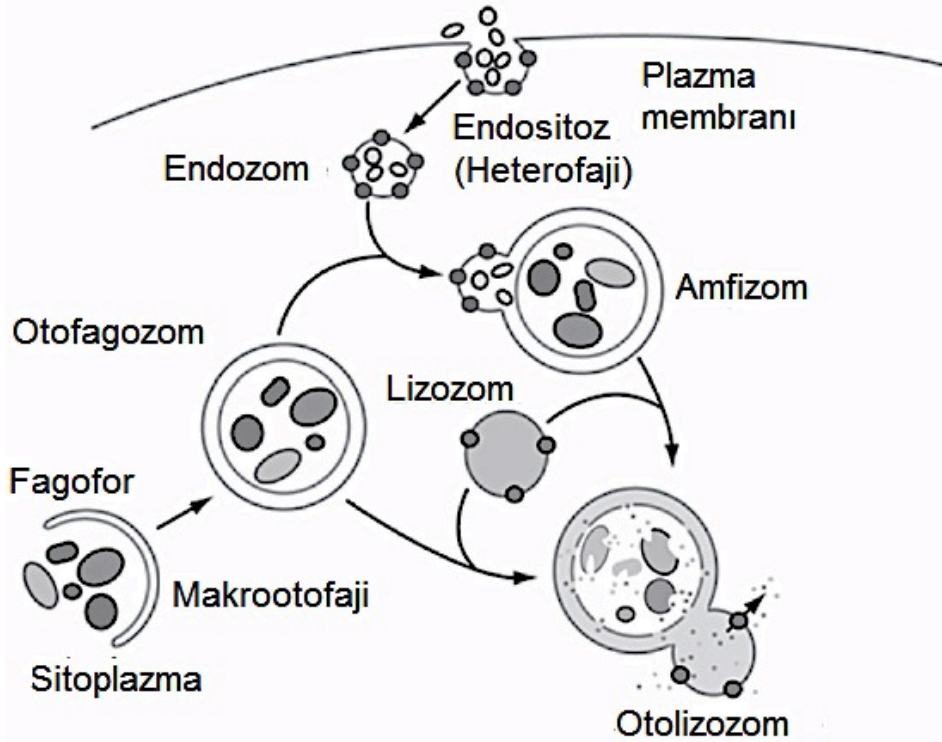


Şekil 2.14. Otofajinin moleküler bileşenleri (Yamada and Singh, 2012)

Bir transmembran olan Atg9 çekirdek kompleksine katılarak membran oluşumuna katkı sağlar (Chang and Huang, 2007). Bağımsız iki ubiquitin benzeri sistem Atg5-Atg12 ve Atg8 veya memelilerde LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3)'ün aktivasyonu membran uzamasına ve otofagozomun oluşumuna katılır.

Ubikitin benzeri Atg12, Atg5 ve Atg12'nin kovalent olarak birbirine bağlanmasını sağlayan Atg7'nin varlığına ihtiyaç duyar. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır.

Buna paralel olarak otofagozom oluşumu için LC3 proteininin, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanması söz konusudur ve Atg12, Atg5 ve Atg16'nın oluşturduğu kompleks LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. Öncelikle LC3'ün karboksil ucundaki beş amino asit Atg4 proteazı tarafından kesilir ve sondan 6. amino asit olan glisin ortaya çıkar. Atg7'nin aktive ettiği LC3 Atg3'e transfer edilir ve FE ile bağlanır. LC3'ün FE'ye bağlanması otofaji oluşum merkezine zar taşınması ve membran uzaması için gereklidir. Atg4 kesecik oluşumu gerçekleştikten sonra LC3 proteinlerini yağdan kopartarak tekrar kullanıma hazırlar. Otofagozom oluşuktan sonra geç endozom ve lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar. Kargo içeriği lizozomal enzimler tarafından yıkıldıktan sonra sindirim sonrası ortaya çıkan aminoasitler, yağ asitleri gibi yapıtaşları tekrar kullanım için hücreye kazandırılır (Öz Arslan vd., 2011; Yamada and Singh, 2012).



Şekil.2.15. Otofagozom oluşumu (Cao and Klionsky, 2007)

2.4.3.2. Otofaji ve Radyoterapi

İyonize radyasyon ve kemoterapi gibi günümüzde uygulanan kanser terapilerinin tümör hücrelerinde otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Ancak otofajinin, hücrenin içeriğine ve tedavinin tipine bağlı olarak, kanser tedavisine cevapta hücrenin hayatta kalmasını ya da hücrenin ölümünü teşvik edici çift yönlü bir rolü vardır (Zeng and Kinsella, 2011). Otofaji, yaşlanmış protein ve sitoplazmik organellerin degradasyonu sonucu hücrede geri dönüşümü sağlayarak hücresel homeostazın sağlanmasında görevli olması sebebiyle, tümör hücrelerinin dönüşümü gibi bazı stres koşullarında hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır (Palumbo and Comincini, 2013). Kanser hücrelerindeki otofajinin bazal seviyede artmasının terapi direncine katkı sağladığı düşünülse de, otofajinin uzun süreli aktivasyonunun hücresel degradasyonu sağlayarak hücrenin ölümüne yol açtığı sonucuna varılmıştır (Yao et al., 2003; Shintani and Klionsky, 2004; Apel et al., 2009; Kuwahara et al., 2011). İyonize radyasyona maruz kalma sonucunda insan glioblastoma hücrelerinin apoptotik olmasından ziyade otofajik olmaları, otofajinin radyasyonla indüklenen diğer bir hücre ölüm tipi olduğunu ortaya çıkarmıştır.

2.5. Biyolojik Dozimetre ve Biyobelirteçler

Radyasyonun varlığı bilinen duyu organları ile algılanamaz. Radyasyonun varlığının algılanması için radyasyonu ölçen hassas cihazların varlığına ihtiyaç vardır. Radyasyon miktarının belirlenmesi için kullanılan cihazlara genel olarak dozimetre denilmektedir.

Dozimetreler fiziksel ve biyolojik dozimetreler olarak ayrılır. Radyasyonla çalışan grupların mutlaka fiziksel dozimetre çeşidi olan Film, Cep ve Termoluminesan dozimetrelerden birini taşımaları gerekmektedir. Bu dozimetrelerin ölçüm yapabilmesi için kişilerin bu dozimetreleri üzerlerinde bulundurması gerekir. Ancak herhangi bir radyasyon kazası sonucu büyük kitlelerin maruz kaldığı radyasyon durumlarında bu fiziksel dozimetrelerin kişilerin üzerinde bulunmaması ve canlıların radyasyona olan duyarlılıklarının farklı olması biyolojik dozimetreyi önemli kılmaktadır. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA) radyasyon kazası durumlarında, fiziksel dozimetre ile birlikte biyolojik dozimetrenin de bağımsız olarak kullanılmasını önermiştir (Coşkun, 2003). Biyolojik dozimetre, kişilerin

absorbe ettikleri radyasyon dozunun biyolojik belirleyiciler kullanılarak ortaya çıkarılmasına denir.

Periferel kan lenfositlerinin iyonize radyasyona çok duyarlı olduğu bilinmektedir (Amaral, 2005). Periferel kan lenfositlerinin kromozom aberasyon çalışmaları en sık kullanılan yöntemler arasındadır (Bender, 1964; Bender et al., 1988; Lloyd et al., 2000). Hücre siklusunun bölünmeyen bir fazında (G0) bulunan ve uzun ömürlü olan T lenfositler radyasyona maruz kalma sonrasında doğru sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır (Ramalho et al., 1995). Lenfositler biyolojik dozimetre çalışmaları için; örnek almanın kolay olması ve tüm vücudu temsil etmesi, radyasyona karşı çok duyarlı olmaları, vücudun herhangi bir yerinde oluşan hasarı dolaşan kana taşımaları, dolaşımda bölünme olmayan G0 fazında olmaları, doku kültürü ortamında kolayca blnebilmeleri ve senkronize (aynı anda aynı fazda) hücreler olarak bölünmeye geçebilmeleri açısından önem taşımaktadır (Moorhead et al., 1960; Köksal et al., 1996; Awa et al., 1991).

Herhangi bir radyasyon kazası sonrasında veya radyasyon tedavisi uygulamalarında bireylerde meydana gelen hücresel cevabı anlamak ve maruz kalınan dozu ve dozun biyolojik etkisini tespit etmek açısından biyobelirteçler oldukça önemli olabilir. Güncel alışmalar bu doğrultada biyobelirteçleri tespit etmeye yöneliktir (Blakely et al., 2001, Amundson et al., 2012). Bu amaçla en sık kullanılan biyobelirteçler olan sitogenetik analizler hızlı sonuçlar vermemekte, ancak bu durumlar için uygunluğu sebebiyle daha hızlı sonuç verebilecek testler geiştirilmeye çalışılmaktadır (Amundson et al., 2001). Diğer bir analiz olan mikronükleus (MN) analizi ise halen biyoizleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Thierens et al., 2002).

Yapılan yeni çalışmalar kişinin radyasyon duyarlılığına bağlı olarak hızlı sonuçlar verebilmesi açısından gen ifadesi biyobelirteçlerinin ve biyobelirteç olarak kullanılacak gen setlerinin geliştirilmesi üzerinedir (Grace et al., 2002; Amundson et al., 2012). Cucinotta iyonize radyasyona maruz kalmış hücrelerin kaderinin gen ifadesindeki değişikliklere bağlı olabileceğini öne sürmüştür (Cucinotta, 2002).

2.6. Kantitatif Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizinden farklı olarak, Kantitatif reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (QRT PZR) hedef nükleik asitlerin miktarı için gerekli verileri sunmaktadır. QRT PZR sonucunda oluşan ürün miktarı, reaksiyon süresince oluşan ürün miktarı ile orantılı olarak artar ve bu miktar flöresan boya ve probların verdiği sinyalin monitörden izlenmesiyle anlaşılır. Flöresan sinyalinin ilk önemli artışı, hedef DNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir (Ahmed, 2002). Son yıllarda artan cihaz sayısı ve flöresan prob sistemi ile QRT PZR teknolojisi de sürekli olarak yenilenmekte ve gelişmektedir. Q-RT PZR moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar başta olmak üzere:

- Biyolojik materyallerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değere dönüştürme ve mRNA'ların düzeyini sayısal olarak belirlenmesinde,
- Gen ifadesinin belirlenmesinde,
- Kanser araştırmalarında ve tanısında, kanserle bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanmasını içeren onkolojik çalışmalarda,
- DNA hasarının belirlenmesinde,
- Metilasyon araştırmalarında,
- Tek nokta mutasyonlarının belirlenmesinde,
- SNP analizinde,
- Patojen tespitinde,
- İlaç endüstrisinde,
- Genotiplemede ve adli tıpta,
- Genetiği değiştirilmiş organizmaların tanımlanabilmesinde,
- Doğum öncesi tanı çalışmalarda,
- Kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizinde

- Biyoterörist saldırıların erken saptanmasında kullanılmaktadır (Kubista et al., 2006, Midilli ve Türkoğlu, 2008; Günel ve Aydın, 2009).

Q-RT PZR'da iki kantitasyon tipi vardır. Bunlar relatif (Göreceli) ve Absolut (Mutlak) kantitasyondur.

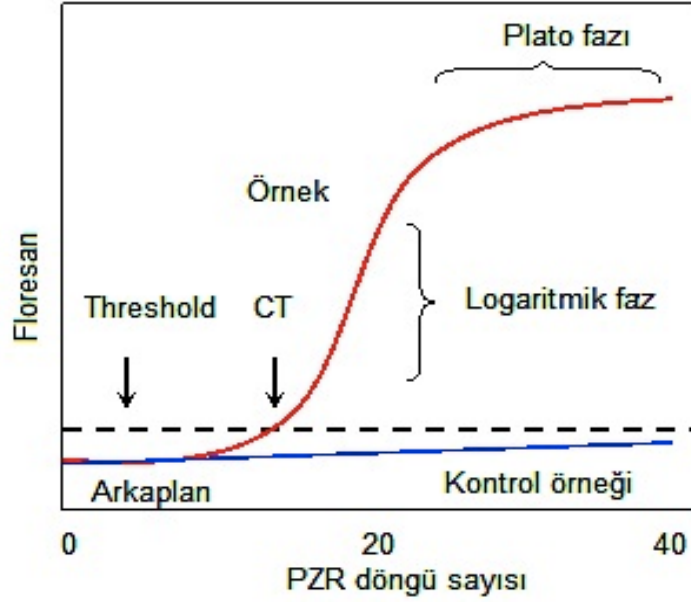
Relatif (Göreceli) Kantitasyon, hedef genin referans gene göre relatif ifadesine dayanır. Gen ifadesindeki fizyolojik değişiklikleri araştırmak için relatif ifade oranı çoğu durum için uygundur (iç kontrol).

Absolut (Mutlak) Kantitasyon, bilinen konsantrasyonda standart DNA molekülüne (rekombinant plazmid DNA'sı, genomik DNA vs.) dayanan kalibrasyon eğrileri kullanılır (dış kontrol).

Q-RT PZR'ın farklı evreleri vardır (Şekil 2.15). Bu evreler:

- Ürünün oluştuğu ancak flöresan arka plan seviyesinin altında kaldığı başlangıç fazı;
- Ürünün üssel birikimiyle flöresans arkaplan seviyesinin üzerine çıktığı ve flöresan miktarının amplifiye olan ürün miktarıyla doğru orantılı olarak yükseldiği logaritmik faz;
- DNA veya flöresan miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükenmesinden dolayı anlamlı artışın olmadığı plato fazıdır (Ginzinger, 2002).

Q-RT PZR ürünündeki ilk anlamlı artışın olduğu nokta eşik-değer döngü (Threshold Cycle= CT) olarak adlandırılır ve istatistiksel olarak arkaplan flöresanının önemli ölçüde üstünde flöresan oluşan noktadır (Şekil 2.15). Kantifikasyonda önemli bir parametre olan CT, üssel fazda tespit edilir. Amplifikasyon logaritmik çizildiğinde lineer kısmın ortasına denk gelir. Arkaplan flöresanın biriktiği ancak cihazın tespit edebileceği değerlerin altında kaldığı PZR döngülerinin olduğu kısımdır. Threshold değeri ise eşik değeridir ve eşik değeri üzerindeki sinyaller bir örnek için eşik değeri döngüsü üzerinde düşünülen gerçek sinyaller olarak ifade edilir.



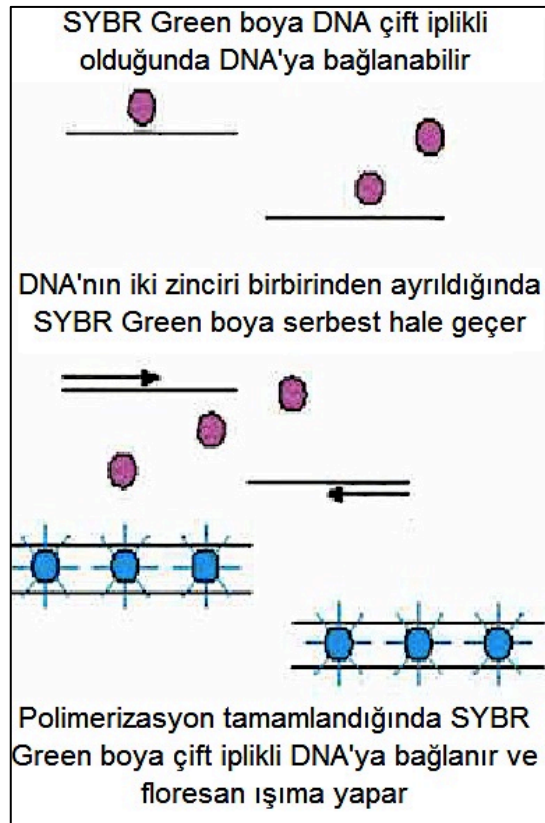
Şekil 2.16 Q-RT PZR cevap eğrileri. Arkaplanın üzerinde bir eşik seviyesi ve eşığe ulaşmak için gereken döngülerin sayıları gösterilmiştir (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml).

Yöntemin hassasiyeti, amplifikasyon reaksiyonunu oluşturmak ve izlemek için kullanılan kimyasal yöntemlere ve oluşan sinyali gözlemlemek için kullanılan cihaza bağlıdır. Ticari olarak sayısı artan cihazların arasındaki temel fark “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir (Günel, 2007). Bu amaç için geliştirilmiş pek çok kimyasal vardır: İnter kalatör boyalar (etidiyum bromür, SYBR Green I), hidroliz problemleri (TaqMan Prob), hibridizasyon problemleri (FRET problemleri, moleküler fenerler, scorpions vb.).

2.6.1. İnterkalatör Boya Metodu

Etidiyum bromüre göre daha az toksik, daha spesifik, ve daha duyarlı flöresan bir dsDNA interkalatör ajanı olan SYBR Green I boyası ilk olarak etidiyum bromür yerine, Higuchi ve arkadaşları tarafından (1992, 1993) Q-RT PZR reaksiyonunda kullanılmıştır (Haugland, 2002). Boya ssDNA'ya bağlanamazken dsDNA'ya bağlanır ve sonuçta flöresan yayımı (eksitasyon

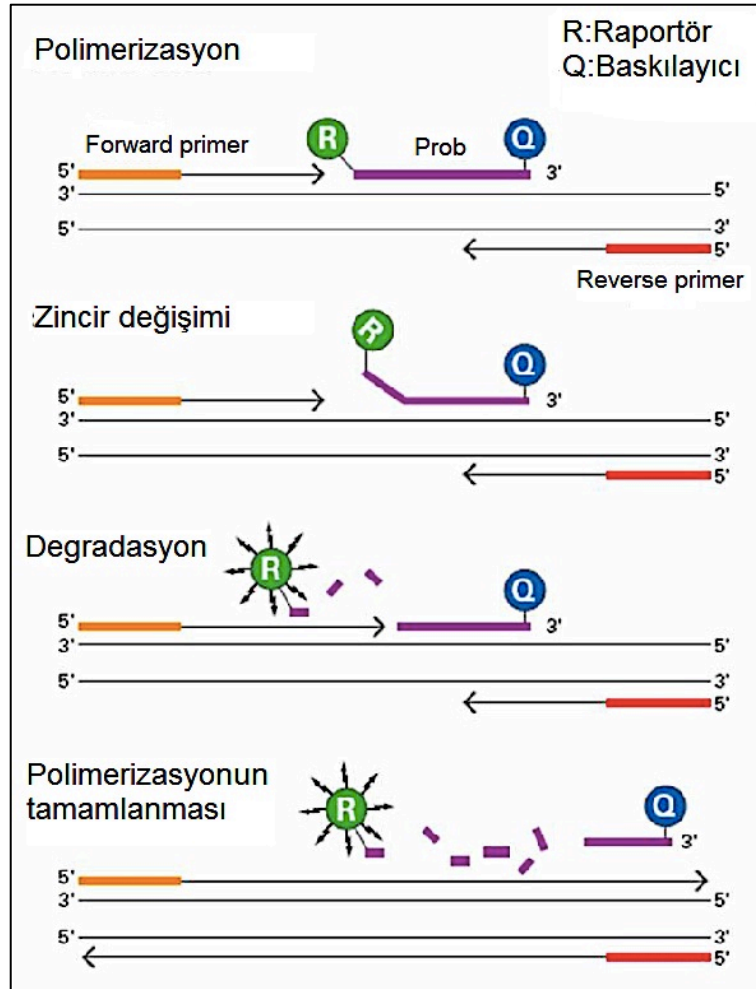
254 ve 488 nm, emisyon 560 nm) ortalama 800 ile 1000 kat artar. Amplifikasyon gerçekleştiğinde artan DNA miktarına bağlı olarak floresan sinyali artmaya başlar. Ancak bu yöntemin dezavantajı SYBR Green I molekülünün spesifik olmayan DNA'yı da tanıma ihtimalidir. Yani, reaksiyonda bulunan spesifik veya spesifik olmayan PZR ürünleri ve primer-dimerleri de dahil olmak üzere tüm dsDNA ürünlerinin miktarı ölçülmektedir. Bu sorunu aşmak için erime eğrisi (melting curve) analizi yapmak mümkündür. Erime eğrisi analizinde, PZR'ın en son aşamasından sonra elde edilen PZR ürünleri, düşük hızda eritilir. dsDNA birbirinden ayrılmaya başladığında floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) olduğundan dolayı, spesifik olmayan ürünlerin veya primer dimerlerinin T_m 'leri farklılık gösterir. Erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Sonuçta, spesifik olmayan dsDNA'ların toplam ölçümden çıkarılması mümkün olur ve istenilen dsDNA'nın floresan ölçümü tespit edilebilir.



Şekil 2.17. Syber Green I yöntemi (Günel, 2007)

2.6.2. TaqMan Prob Methodu

TaqMan prensibinde, problemlerin 5' ucunda raporör florokrom (örn., 6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (örn., 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Probun 3' ucu bloke olduğu için prob primer gibi uzamaz. Hedef DNA'nın varlığında prob, PCR reaksiyonu boyunca spesifik olarak sağ ve sol primer bölgeleri arasına bağlanır. Reaksiyon başında raporör boyanın baskılayıcı boyaya yakınlığı sebebiyle, özellikle Förster tipi enerji transferinden dolayı, haberci flöresan baskılanır (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). Yöntem, Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini probu degrade etmek için kullanma prensibine dayanmaktadır. Şayet prob hedef DNA ile hibridize olmuş ise prob, primerlerin uzaması sırasında degrade olur. Primerlerin uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece, raporör serbest kalır ve flöresan ışımaya yapar. Flöresan amplifikasyon arttıkça degrade olan problemlerle birlikte artar (Şekil.2.17).Flöresan prob için özel gereksinim 5' ucunda G bazının olmamasıdır. Haberci boyaya bitişik G bazı kesimden sonra bile haberci flöresanı söndürür.



Şekil 2.18. TaqMan prob metodu. Yöntemde problemlerin 5' ucunda raportör florokrom 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır.
(www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx)

2.6.3. FRET Prob Methodu

Bu yöntem için kullanılan problemlerde 3' ucunda flöresan işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. Hibridizasyon problemleri çift olarak tasarlanır ve çiftlerden biri verici boya (3'-Floresein), diğeri ise alıcı boya (5'-Red-640 veya 5'-Red-705) ile işaretlenir. Amplifikasyon sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer edilir. Problemler hedef DNA'nın birbirine

yakın bölgelerine hibridize olacak şekilde tasarlanır (genellikle iki bağlanma bölgesinin arasında 1-5 nükleotidlik boşluk olur). Eğer iki prob da hibridize olur ise, iki boya da birbirine yakınlaşır ve FRET alıcı boyası flourometre ile ölçülebilen sinyale neden olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan flöresan miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artmaktadır.

2.6.4. Moleküler Boncuk (Moleküler Beacon) Yöntemi

Moleküler boncuk problemleri saç tokası yapısındadır. Yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak hedef DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerirken gövde dizisi kendi içinde tamamlayıcıdır. Probun 5' ve 3' uçlarında raportör ve baskılayıcı boyalar bulunur. Saç tokası yapısı kapandığında baskılayıcı boya diğer boyanın flöresanını engeller. Ancak prob hedef DNA dizisine hibridize olduğunda konformasyonu değişir, düz ve çift zincirli hale geçer. Bu yapı termodinamik olarak saç tokası yapısından daha karardır. Baskılayıcı boya raportör boyadan uzaklaşacağı için flöresan sinyal vermeye başlar.

2.6.5. Scorpions Prob Yöntemi

Scorpions olarak adlandırılan prob ailesi saç tokası yapısı içeren spesifik prob dizilerinden oluşur (Thelwell et al., 2000). Bu yöntemde probun 5' ucuna bağlı flöresan sinyal üreten florofor, saç tokası konfigürasyonunda 3' ucuna bağlı bir boya ile söndürülür. Bu yapı primerin 5' ucuna bağlanmıştır. Primer uzamasını takiben spesifik prob aynı DNA ipliği üzerinde kendi tamamlayıcı dizisine bağlanır ve saç tokası yapısı çözülmüş olur. Bu şekilde flöresan ışımaya meydana gelir. Bu yöntemde primerden ayrı bir proba ihtiyaç yoktur.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması:

Kan örnekleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'na radyoterapi tedavisi amacıyla başvuran çeşitli kanser hastalarından elde edildi. 50 kanser hastasının her birinden radyoterapi görmeden önce ve radyoterapinin 5., 15. ve 25. günlerinde olmak üzere Lityum-Heparin içeren tüplere 3-4 ml olacak şekilde toplamda 4 tüp kan toplandı. Radyoterapi gören hastalara radyasyon dozu fraksiyonlu olarak verildi. Hastaların kanser türüne göre vücudunun farklı bölgelerinin lokal olarak fraksiyonlu şekilde birinci hafta sonunda 1 Gy, üçüncü hafta sonunda 3 Gy ve beşinci hafta sonunda 5 Gy toplam doz aldığı tedavi yapan kişi tarafından bildirildi. Çalışma için gerekli etik kurul izini ve çalışmaya dahil olan kişilerden bilgilendirilmiş onam belgesi alındı.

Doz-cevap eğrisi çıkarabilmek amacı ile herhangi bir hastalığı olmayan, sigara kullanmayan genç ve sağlıklı 10 gönüllünün periferik kanları venipunktür aracılığı ile toplandı ve her hastanın kan örneği 5 ayrı Lityum-Heparin içeren tüpe bölündü. İlk tüp kontrol olarak ayrıldı, diğer dört tüp sabit gama kaynağı kobalt 60 (Co^{60}) kullanılarak iyonize radyasyona maruz bırakıldı. Her bireye ait dört farklı tüp 0,0327 kGy/s doz hızına göre hesaplanarak 0,1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy ve 3 Gy dozlarda ışınlandı.

3.2. Kandan Lenfositlerin Ayrıştırılması

Radyoterapi hastaları ve sağlıklı bireylerden toplanan periferik kanlardan lenfosit izolasyonu yapıldı ve bu amaçla Histopaque 1077 kullanıldı.

Lenfositlerin Ayrıştırılması:

1. 15 ml'lik falcon tüpü içerisine 3 ml Histopaque-1077 eklendi ve Histopaque-1077 oda ısısına gelene kadar beklendi. Histopaque üzerine dikkatlice 3 ml (eşit hacimde) kan eklendi. Oda ısısında 400 x g'de 30 dakika santrifüj edildi.

2. Santrifügasyon sonunda histopaque tabakasının üzerinde yer alan bulutsu görünümdeki lenfosit tabakası temiz bir tüpe aktarıldı.

3. Temiz tüpe alınan lenfosit tabakası üzerine 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) çözeltisi eklendi ve yavaşça karıştırıldı. 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifügasyon sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 0.5 ml PBS eklendi veya RPMI 1640 besiyerinde sulandırıldı.
5. Histopaque-1077 ile ayrıştırılan hücreler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 350 µl RNeasy Protect Cell Reagent (Qiagen) içerisinde çözüldü. Bu şekilde ortamda bulunan RNA'lar yıkıma karşı korunmuş oldu.
6. Hücre ve RNeasy Protect Cell Reagent karışımı 30°C'de 1 gün, oda ısısında (15-25°C) 7 güne kadar, 2-8°C'de 4 haftaya kadar ve -20°C veya -80°C'de arşiv olarak saklandı.

3.3. mRNA İzolasyonu

RNeasy Protect Cell Reagent (Qiagen) içerisinde kararlı hale getirilmiş olan hücrelerden RNeasy Plus Mini Kit ile RNA Pürifikasyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan protokol şöyledir:

1. RNeasy Protect Cell Reagent içerisinde bulunan hücreler 5 dakika 5000 x g'de santrifüj edildi.
2. Santrifügasyon sonrasında süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
3. Pelet tüpe hafifçe vurularak gevşetildi. Bu işlem peletin 4. basamakta RNA izolasyonundan önce lizizi için kullanılacak olan RLT Plus tamponunda çözülmesini kolaylaştırdı.
4. Peletin üzerine daha önceden içerisine β -ME ilave edilmiş olan 350 µl RLT Plus tamponu eklendi. Peletin vortekslenerek tamamen çözülmesi sağlandı ve hızla 5. basamağa geçildi.
5. Elde edilen lizat pipetle çekilip bırakılarak homojenize edilmesi sağlandı.

6. Homojenize edilmiş lizat, 2 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş gDNA eliminator spin kolonuna aktarıldı. 30sn $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında kolon atıldı ve akan sıvı saklandı.
7. Toplanan sıvıya 1 hacim %70 etanol eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. (RNA saflaştırması sırasında, etanol eklenmesinden sonra çökeltilerin görülebilmesi işlemi etkilememektedir).
8. Etanol eklenmesi ile oluşan 700 μ l'lik sıvı şayet çökelti oluştuysa bu çökeltiyi de içerecek şekilde 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve RNeasy spin kolonuna aktarıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve 15 sn $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı.
9. Toplama tüpü 9.basamakta tekrar kullanıldı. Eğer örnek hacmi 700 μ l'yi geçiyorsa, ardışık aliquotları aynı RNeasy spin kolonunda santrifüj edildi. Toplanan sıvı her santrifügasyondan sonra atıldı.
10. RNeasy spin kolonuna membrana bağlanmış RNA'nın yıkanması için kullanılan 700 μ l RW1 tamponu eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak ve 15 sn $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de santrifüj edilerek spin kolon membranını yıkandı. Toplanan sıvı atıldı.
11. Toplama tüpü 10. basamakta tekrar kullanıldı.
12. RNeasy spin kolonuna önceden içerisini etanol ilave edilmiş olan 500 μ l RPE tamponu eklendi. Bu tampon membrana bağlanmış RNA'nın yıkanması için kullanıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve 15 sn $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de santrifüj edilerek spin kolon membranını yıkandı. Toplanan sıvı atıldı.
13. Toplama tüpü 11. basamakta tekrar kullanıldı.
14. RNeasy spin kolonuna 500 μ l RPE tamponu eklendi. Kapağı nazikçe kapatıldı ve spin kolon membranını yıkamak için 2 dak. $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de santrifüj edildi. (Uzun süreli santrifügasyonlar spin kolon membranını kurutur, böylece etanolün RNA elüsyonu sırasında aktarılmadığından emin olunur. Kalıntı etanol sonraki reaksiyonlarda etkileşebilir).

15. RNeasy spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve eski toplama tüpü toplanan sıvı ile birlikte atıldı. Tam hızda 1 dak. santrifüj edildi. Bu basamak olası herhangi RPE tamponu naklini engellemek veya 11. basamaktan sonra RNeasy spin kolonunun etrafındaki kalıntı toplama sıvısını uzaklaştırmak için yapıldı.
16. RNeasy spin kolonu yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 50 µl RNase free su eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak 1 dak. $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$)'de RNA'yı elüe etmek için santrifüj edildi.
17. Eğer beklenen RNA eldesi $>30 \mu\text{g}$ ise 13. basamak tekrar 30-50 µl RNase free su eklenerek veya 13. basamaktaki elüsyon kullanılarak (eğer yüksek RNA konsantrasyonu gerekiyorsa) tekrarlandı. 13. basamaktaki toplama tüpü tekrar kullanıldı. (Eğer 13. basamaktaki elüsyon kullanıyorsa, RNA eldesi, ikinci bir hacim RNase-free su kullanılarak elde edilenden %15-30 daha az olacak, ancak son RNA konsantrasyonu daha yüksek olacaktır).

3.4. RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi:

RNeasy Plus Mini Kit ile izolasyon sonrasında elde edilen RNA örnekleri GeneQuant 1300 (GE Healthcare) spektrofotometre kullanılarak 260 nm'de kuvartz küvet ile 1/40 sulandırılarak ölçüldü. 280/260 nm oranına göre saflıkları değerlendirildi. Ölçüm sonrasında her RNA örneğinin konsantrasyonu reverse-transkripsiyon için 1000 ng/ml olacak şekilde ayarlandı. Örnekler bu basamaktan sonra kullanılıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

3.5. Q-RT PZR için Genomik DNA Eliminasyonu

cDNA eldesi için reverse transkripsiyon basamağını uygulamadan önce, mRNA örneklerinde genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için genomik DNA eliminasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu:

1. İzolasyondan sonra -80°C 'de saklanan kalıp RNA örnekleri buz üstünde eritildi. gDNA Wipeout Tamponu ve RNase-free su oda ısısında ($15-25^{\circ}\text{C}$) eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi ve buz üstünde saklandı.
3. Çizelge 3.1'e göre genomik DNA eliminasyon reaksiyonu buz üstünde hazırlandı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken her bir RNA örneğinin konsantrasyonunu 1000 ng/ml olacak şekilde ayarlayabilmek için hesaplanan miktarlarda kalıp RNA ve su eklendi. Genomik DNA eliminasyon reaksiyon bileşenleri karıştırıldı ve buz üstünde saklandı.
4. gDNA wipeout reaksiyonu 42°C 'de 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnek karışımları hemen buz üstüne alındı.

Çizelge 3.1. Genomik DNA eliminasyon reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim/reaksiyon	Son konsantrasyon
7x gDNA Wipeout Tamponu	2 μl	1x
Kalıp RNA	Değişebilir ($1\mu\text{g}$ 'a kadar)	
RNase-free su	Değişebilir	
Toplam Hacim	14 μl	-

3.6. cDNA Eldesi İçin Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu

Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu sonrasında elde edilen ($14\ \mu\text{l}$) karışım Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı.

Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu:

1. Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Tamponu, RT Primer Karışımı ve RNase-free su oda ısısında (15-25°C) eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi ve buz üstünde saklandı.
3. Çizelge 3.2'ye göre reverse-transkripsiyon master karışımı buz üstünde hazırlandı. (Reverse-transkripsiyon master karışımı, kalıp RNA hariç ilk-zincir cDNA sentezi için gerekli olan tüm bileşenleri içermektedir).
4. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen (14 µl) kalıp RNA, reverse-transkripsiyon master karışımı içeren tüpe eklendi.
5. Tüpler 42°C'de 20 dak. inkübe edildi. Bazı nadir durumlarda (ör; RT-PZR ürünü 200 bp'den uzunsa veya yüksek derecede sekonder yapısı olan RNA'lar analiz ediliyorsa), inkübasyon süresini 30 dak. kadar arttırmak cDNA eldesini arttırabilir.
6. Quantiscript Reverse Transkriptazı inaktive etmek için 95°C'de 3 dak. inkübe edildi. Bu basamaktan sonra reverse-transkripsiyon reaksiyonları uzun süre saklamak için -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.2. Reverse-Transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim/reaksiyon	Son konsantrasyon
Quantiscript Reverse Transkriptaz	1 µl	
5x Quantiscript RT Tamponu	4 µl	
RT Primer Karışımı	1 µl	1x
Kalıp RNA (genomik DNA eliminasyon reaksiyonu)	14 µl	
Toplam hacim	20 µl	-

3.7. Çift-İşaretli Problar Kullanarak Q-RT PZR ve İki Basamaklı RT-PZR Protokolü

Q-RT PZR reaksiyonu için elde edilen cDNA örnekleri spektrofotometrede kuvartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçüldü ve konsantrasyonları 200 pg/ml olacak şekilde ayarlandı.

Q-RT PCR reaksiyonu:

1. 2x QuantiFast Probe PZR Master Karışımı, kalıp cDNA, primer ve prob çözeltileri ve RNase-free su eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi.
3. Çizelge 3.4'e göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Kullanılan polimeraz enziminin Hot start özelliği nedeniyle, reaksiyon hazırlığı veya Q-RT döngüleyicinin programlanması sırasında örneklerin buz üstünde tutulmasına gerek kalmadı.
4. Hazırlanan reaksiyon karışımı iyice karıştırıldı ve uygun hacimlerde PZR tüplerine dağıtıldı.
5. cDNA örnekleri (≤ 200 ng/reaksiyon) reaksiyon karışımını içeren her bir PZR tüpüne eklendi. İki-basamaklı RT-PZR için, eklenen cDNA hacmi (sulandırılmamış RT reaksiyonundan) son PZR hacminin %10'unu geçmemelidir.
6. Q-RT döngüleyici Çizelge 3.4'de verilen programa göre programlandı. Veri eldesi, birleştirilmiş annealing/extension basamağında yapıldı.
7. PZR tüpleri Q-RT döngüleyiciye yerleştirildi ve döngüleme programı başlatıldı.

Çizelge 3.3. Q-RT PZR için kullanılan primer ve prob dizileri

Gen	Primer/Prob Dizileri
B2M	Forward primer 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3' Reverse primer 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3' Prob 5'-FAM-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-BHQ1-3'
GAPDH	Forward primer 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3' Reverse primer 5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3' Prob 5'-HEX-TGGCTACAGCAACAGGGT-BHQ1-3'
GRP78	Forward primer 5'-TCCTGCGTCGGCGTGT-3' Reverse primer 5'-GTTGCCCTGATCGTTGG C-3' Prob 5'-HEX-AAGAACGGCCGCGTGGAGATCAT-BHQ1-3'
ATG5	Forward primer 5'-TCTGGATGGGATTGCAAATG -3' Reverse primer 5'-TTTCTTCTGCAGGATATTCCATGA -3' Prob 5'-FAM-ATTTGACCAGTTTTGGGCC -BHQ1-3'
LC3	Forward primer 5'-ATGTCAACATGAGCGAGTTGGT -3' Reverse primer 5'-CTGGTTCACCAGCAGGAAGAA -3' Prob 5'-FAM-AAGATCATCCGGCGCCGCC -BHQ1-3'
ATF4	Forward primer 5'-TGGCTGGCTGTGGATGG -3' Reverse primer 5'-TCCCGGAGAAGGCATCCT-3' Prob 5'-TET-TGGTCAGTCCCTCCAACAACAGCAAG- BHQ1-3'
XBP1	Forward primer 5'-GCGCCTCACGCACCTG -3' Reverse primer 5'-GCTGCTACTCTGTTTTTCAGTTTCC-3' Prob 5'-HEX-CCCCGAGGAGAAGGCGCTGAG-BHQ1-3'
GADD153	Forward primer 5'-GGAGAACCAGGAAACGGAAAC-3' Reverse primer 5'-TCTCCTTCATGCGCTGCTTT-3' Prob 5'-FAM-AGTGGTCATTCCCCAGCCCGG-BHQ1-3'

Çizelge 3.4. Q-RT PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim/reaksiyon		Son konsantrasyon
	Fast veya kapiller	384-kuyucuklu blok	
2x QuantiFast Prob PZR Master Karışımı	10 µl	5 µl	1x
Primer A	Değişken	Değişken	0.4 µM
Primer B	Değişken	Değişken	0.4 µM
Prob	Değişken	Değişken	0.2 µM
Kalıp DNA veya cDNA	Değişken	Değişken	≤200ng/reaksiyon
RNase-free su	Değişken	Değişken	
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl	10 µl	

Çizelge 3.5. Q-RT PZR döngüleyici koşulları.

Basamak	Zaman	Sıcaklık	Ramp hızı	Ek yorumlar
PZR ilkin aktivasyon basamağı				
Denatürasyon	3 dak	95°C	Azami/hızlı mod	HotStartTaq Plus DNA Polimeraz bu ısıtma basamağında aktive edilir
İki-basamaklı döngüleme (35-40 döngü)				Döngü sayısı kalıp DNA'nın miktarına bağlıdır
Denatürasyon	10 sn	95°C	Azami/hızlı mod	
Birleştirilmiş bağlanma/uzama	30 sn	60°C	Azami/hızlı mod	Flöresan veri toplaması gerçekleştirilir

3.8 Q-RT PZR ile Elde Edilen Verilerin Analizi

Q-RT PZR reaksiyonu sonunda elde edilen C_T değerleri REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) programında standart mod'da referans gen (B2M ve GAPDH) normalizasyonu ile değerlendirildi. Örneklerin tekrarları farklı reaksiyonlarda yapıldı.

3.8.1. REST 2009 Yazılımı

REST 2009 algoritması etkinliği, en uygun standart eğrinin eğimini hesaplamak için şu eşitliği kullanır: $E = 10^{-1/\text{eğim} - 1}$

Referans Gen Normalizasyonu için bir örneğin ifade oranını belirlerken, bir orta salt konsantrasyon değeri, konsantrasyon = etkinlik^{ortalama CP (kontroller) – ortalama CP (örnekler)} formülü kullanılarak hesaplanır.

Tek bir referans gen kullanıldığında, ifade seviyesi, hedef genin ve tek referans geninin konsantrasyonları kullanılarak hesaplanır:

$$\text{Relatif İfade} = \frac{\text{Hedef genin konsantrasyonu}}{\text{Referans genin konsantrasyonu}}$$

Birden fazla referans gen kullanıldığında, tüm referans genlerin konsantrasyonlarının geometrik ortalamaları gerçek ifade değerinin alternatif tahminleri için tek bir genin relatif ekspresyonunu hesaplamak üzere kullanılabilir.

$$\text{Relatif İfade} = \frac{\text{Hedef genin konsantrasyonu}}{\text{Geometrik ortalama(referans gen 1'in konsantrasyonu, referans gen 2'in konsantrasyonu....)}}$$

REST 2009 yazılımında basit rastgele hale getirme testleri (statistical randomization tests) kullanılmaktadır. Yazılım bir hipotez testi kullanır ve bu hipotez testte verilerin ortalamasını ve upregülasyon veya downregülasyon'un olasılığı için p değerini belirlemekte kullanılan bir yöntem sunar. Bootstrapping teknikleri normalite veya simetrik dağılım varsayımlarını dikkate almadan, ifade oranları için %95 güven aralığı sağlamak için kullanılabilir. Hipotez testi, sonucun istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını ölçerken, güven aralığı semantik anlamlılık için kontrol edilebilen bir dağılım sağlar.

Yöntem:

Yöntemde şunlar kullanılmaktadır:

- Kontrol (C_{GOI})* ve örnek (S_{GOI}) grubunun hedef gen için C_T değerleri
- Kontrol (C_{REF}) ve örnek (S_{REF}) grubunun referans gen için C_T değerleri
- Hedef gen için etkinlik değeri (e_{GOI})

- Referans gen için etkinlik değeri (e_{REF})**

*GOI: Hedef gen (Gene of interest),

**REF: Referans gen (Reference gene),

Yöntem ek olarak aşağıdakileri kullanmaktadır:

- X , hedef gen için her bir örneğin ifade oranını belirten rastgele değişken
- Y , X 'den simüle edilmiş okumaların bir listesi
- n , Y 'nin büyüklüğü, tercihen büyük bir değer (>2000)
- $seç()$, bir gruptan rastgele bir öğeyi döndüren bir fonksiyon
- $say()$, bir gruptan öğelerin sayısını döndüren bir fonksiyon

Y hedef gen ve referans genden kontrol ve örnekleri rastgele eşleyerek ve ifade oranlarını hesaplayarak elde edilir:

$$i \in \{1, \dots, n\}$$

$$j = seç(\{1, \dots, say(C_{GOI})\})$$

$$k = seç(\{1, \dots, say(S_{GOI})\})$$

Her hedef genin C_T 'sine karşılık gelen bir referans C_T olmak zorunda olduğu için, farzedilir ki:

$$say(C_{GOI}) = say(C_{REF})$$

$$say(S_{GOI}) = say(S_{REF})$$

Y_i Y grubunda tek bir öğedir:

$$Y_i = \frac{e_{GOI}^{c_{GOI,j} - s_{GOI,j}}}{e_{REF}^{c_{REF,j} - s_{REF,j}}}$$

Güven aralığını belirlemek için, populasyon Y 'si artan şekilde sıralanır:

$$Y_{\text{sıralanmış}} = \text{sırala}(Y)$$

%95 güven aralığı şu şekilde tanımlanır:

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{Minimum} = Y_{\text{sıralanmış}, n \times (\alpha/2)}$$

$$\text{Maksimum} = Y_{\text{sıralanmış}, n \times (1 - \alpha/2)}$$

Grubun medyanı (ortanca) kontrol ve örnek değerlerinin ortalaması ile çalışarak, verilen ifade oranının alternatif bir ölçümünü sunar:

$$\text{Medyan} = Y_{\text{sıralanmış}, 0.5 \times n}$$

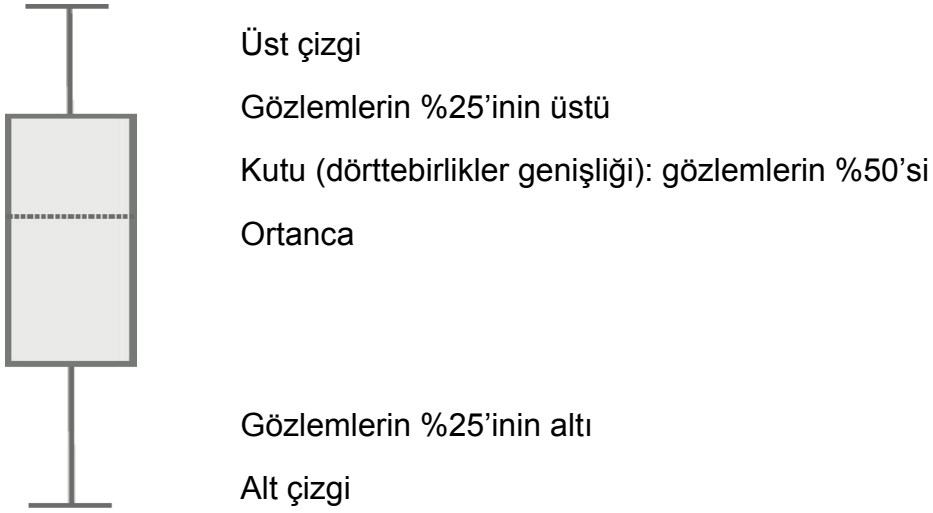
Hipotez testi:

Yazılım, reaksiyon etkinliği ve referans gen normalizasyonunu dikkate alarak, örnekler ve kontroller arasında önemli bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için kullanılabilir. Normalizasyon ve etkinlik hesaplamaları, oranlar ve hatanın çeşitli kaynaklarını içerdiği için rastgeleleştirme teknikleri (randomization techniques) kullanılmaktadır.

$P(H1)$ sonuç tablosunda verilen hipotez testidir. Bu hipotez testi örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığını gösterir. Güçlü bir rastgeleleştirme testi düzenlemek için, şu senaryo kullanılır: “örnekler ve kontroller arasında fark edilen herhangi bir varyasyon yalnızca şans eseri ise, iki grup arasında değerleri rastgele değiştirebilir ve ilkin gruplarda olduğundan daha fazla bir farklılık görmeyiz.” Hipotez testi gruplar arasında örneklerin ve kontrollerin 10,000 rastgele yeniden dağıtımını gerçekleştirir ve rastgele atanmış grupta relatif ifadesinin kaç kere örnek grubundan daha yüksek olduğunu sayar.

Kutu Diyagramı:

İstatistiksel uygulamalarda kutu diyagramı (whisker-box plots) sadece örnek ortalaması çizilerek elde edilemeyecek olan veri dağılımındaki sapma hakkında ilave bilgiler verir. Özetlemek gerekirse kutu diyagramındaki kutu bölgesi tüm gözlemlerin %50'sini kapsar, noktalı çizgi örneklemin ortancasını temsil eder ve iki çubuk çizgi gözlemlerin dışındaki %50'yi temsil etmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 3.1. Kutu diyagramı (whisker-box plots)

REST 2009 yazılımı rastgeleleştirme teknikleri kullandığı için, kutu diyagramını C_T değerlerinden ziyade sıralı ekspresyon verisini (Y grubu) temel alarak çizer.

4. SONUÇLAR

4.1. Q-RT PZR Analiz Sonuçları

Q-RT PZR analizi sonucunda her örnek için kontrol geni olan *B2M* ve *GAPDH* geni ve *GRP78*, *LC3*, *ATG5*, *ATF4*, *XBP1* ve *GADD153* genlerine ait C_T değerleri belirlendi. Bu değerler REST 2009 yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve söz konusu genlerin ifade düzeyleri belirlendi.

4.1.1. Radyoterapi Gören Hastaların Q-RT PZR Analizi

4.1.1.1. 5. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen İfade Raporu:

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	1,0	6,209	0,032 - 1.231,322	0,000 - 113.561,818	0,030	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	1,0	4,466	0,149 - 161,854	0,007 - 5.469,628	0,007	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,8	4,893	0,125 - 208,840	0,005 - 10.066,210	0,008	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	4,160	0,087 - 221,483	0,003 - 16.251,884	0,027	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	1,0	5,397	0,127 - 358,161	0,002 - 26.223,901	0,008	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	4,645	0,077 - 339,735	0,002 - 22.594,164	0,026	İfadesi Artmış

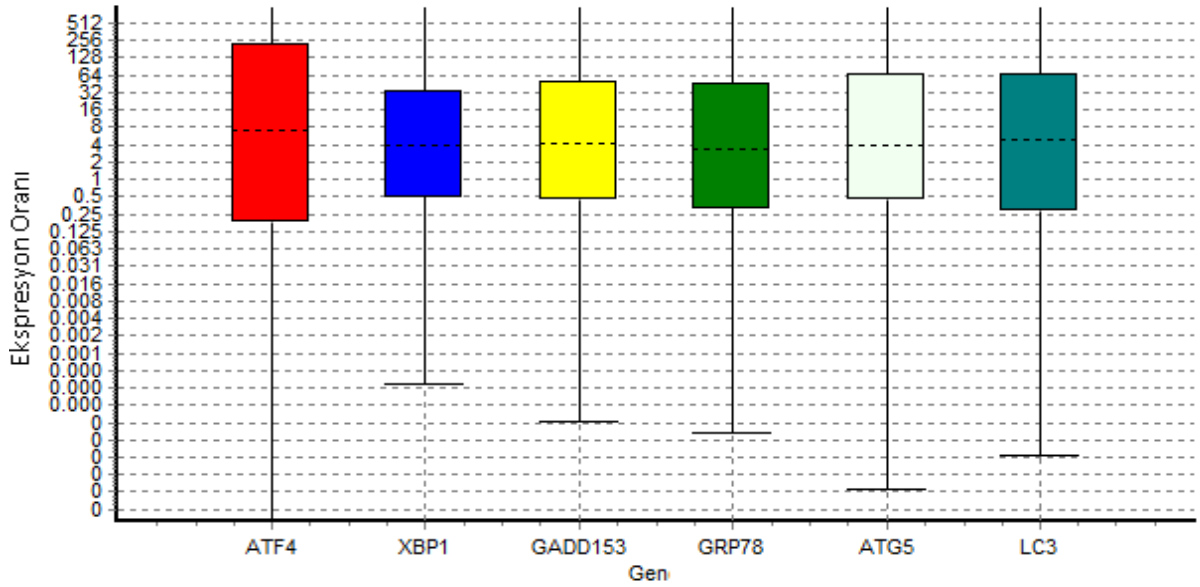
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

TRG - Hedef

REF – Referans

Radyoterapi hastalarının 5. Güne ait ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 5. güne ait örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir.

4.1.1.2. 15. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen İfade Raporu:

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	1,0	10,135	0,042 - 1.858,350	0,001 - 739.171,965	0,006	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	1,0	8,480	0,376 - 190,476	0,017 - 5.556,888	0,000	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,8	5,593	0,116 - 310,983	0,003 - 13.825,496	0,009	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	6,233	0,123 - 377,331	0,004 - 30.119,811	0,006	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	1,0	6,110	0,146 - 320,892	0,002 - 21.012,719	0,004	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	6,526	0,152 - 345,837	0,002 - 16.260,826	0,008	İfadesi Artmış

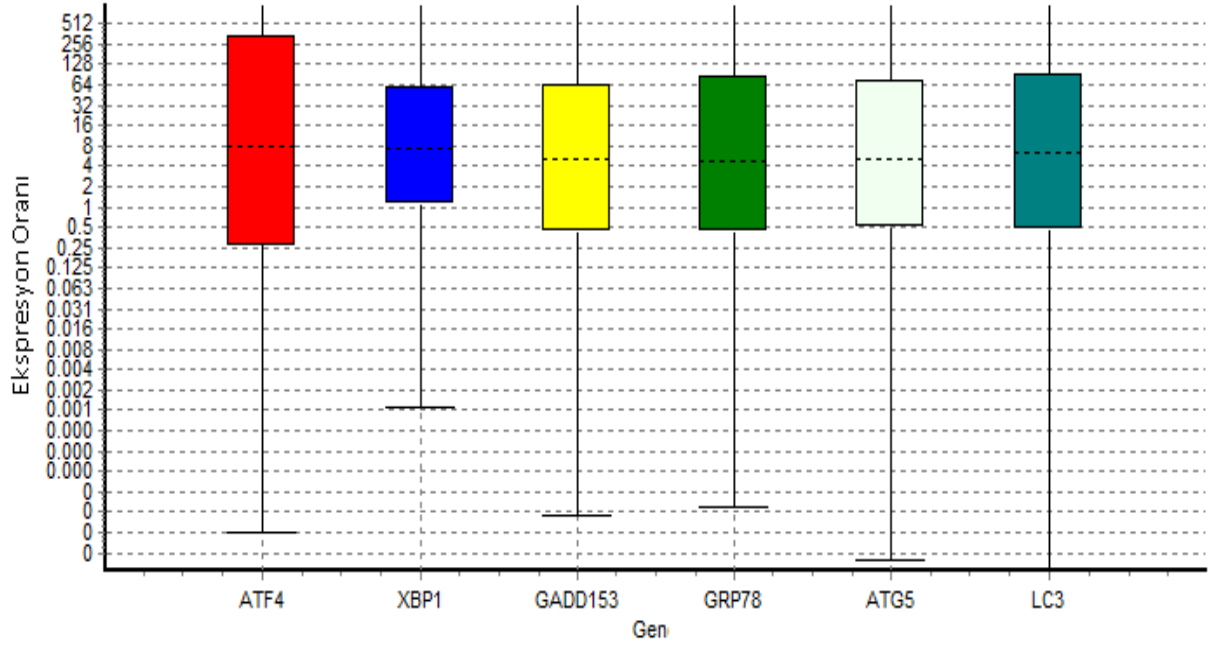
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

TRG - Hedef

REF – Referans

Radyoteapi hastalarının 15. Güne ait ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 15. güne ait örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir.

4.1.1.3. 25. Güne Ait Örneklerin Relatif Gen İfade Raporu:

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	1,0	12,525	0,068 - 2.149,450	0,001 - 204.919,116	0,003	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	1,0	9,769	0,285 - 392,789	0,010 - 11.166,477	0,000	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,8	11,650	0,435 - 345,200	0,014 - 12.825,054	0,000	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	6,949	0,256 - 263,269	0,008 - 19.481,056	0,001	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	1,0	7,515	0,104 - 625,378	0,001 - 86.478,559	0,003	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	7,117	0,099 - 638,545	0,001 - 249.373,513	0,012	İfadesi Artmış

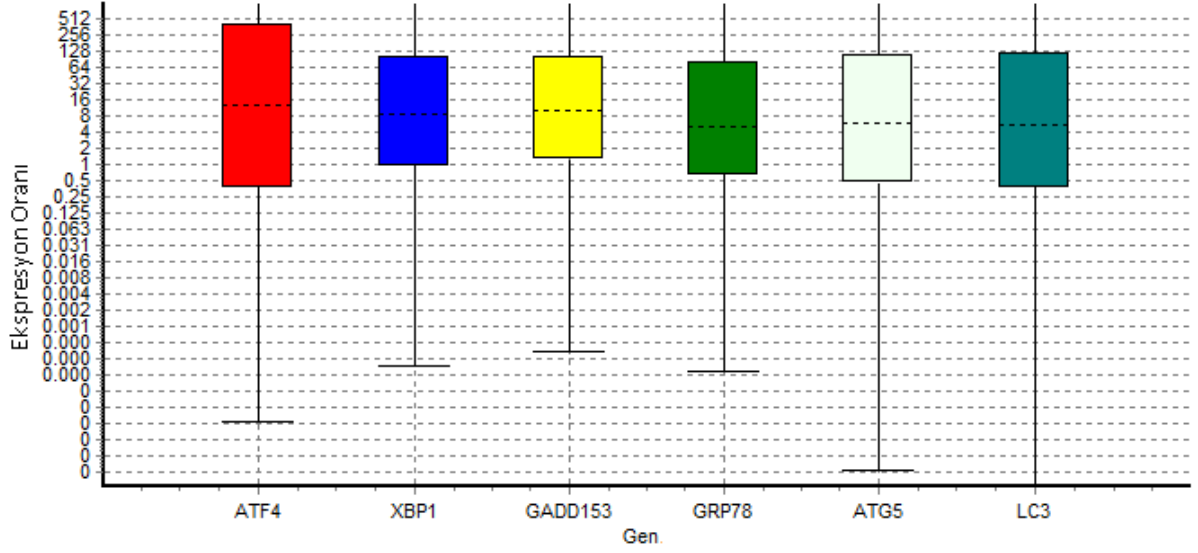
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

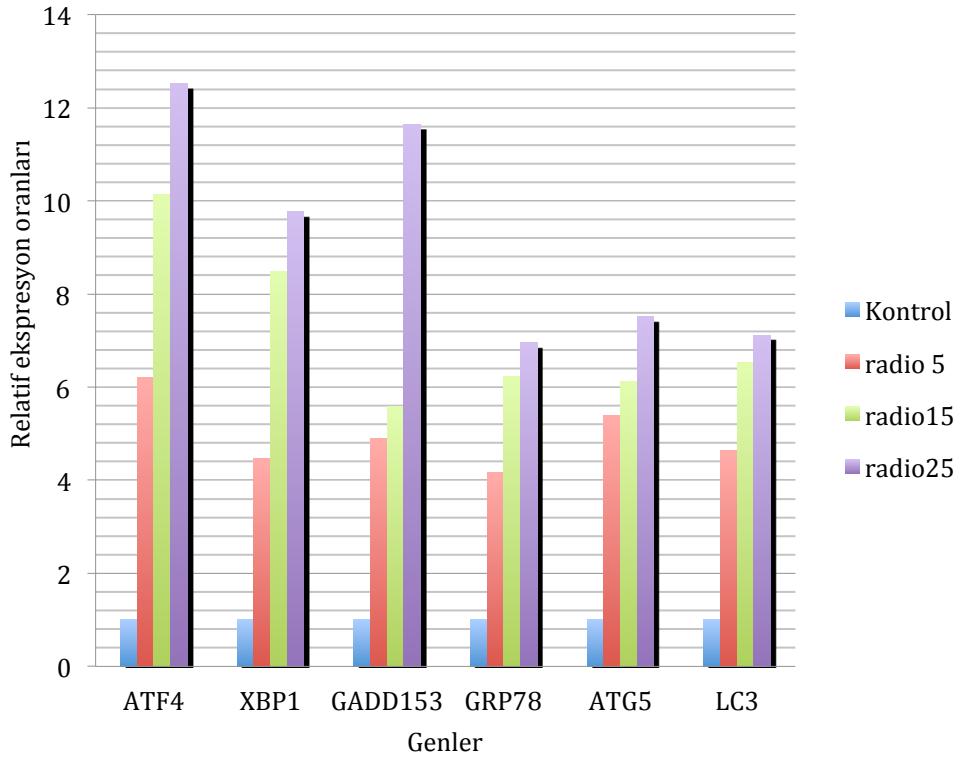
TRG - Hedef

REF – Referans

Radyoteapi hastalarının 25. Güne ait ifade analizleri sonucunda *ATF4 XBP1, GADD153, GRP78, LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Radyoterapi tedavisi gören hastalarda 25. güne ait örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir.



Şekil 4.4. Radyoterapi tedavisi gören hastalardan alınan 5. 15. ve 25. gün örneklerinde çalışılan genlerin relatif ifade oranları karşılaştırılmıştır.

4.1.2. Doz-Cevap Eğrisi İçin Q-RT PZR Analizi

4.1.2.1. 0.1 Gy Örneklerinin Relatif Gen İfade Raporu

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	0,428	2,176	0,644 - 7,390	0,268 - 19,120	0,058	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	0,851	2,049	0,789 - 5,736	0,253 - 13,808	0,045	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,94	2,208	0,953 - 5,277	0,484 - 10,360	0,012	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	2,669	0,863 - 10,317	0,322 - 21,326	0,023	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	0,8	2,205	0,888 - 6,335	0,341 - 13,515	0,024	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	4,046	0,759 - 21,993	0,232 - 119,330	0,017	İfadesi Artmış

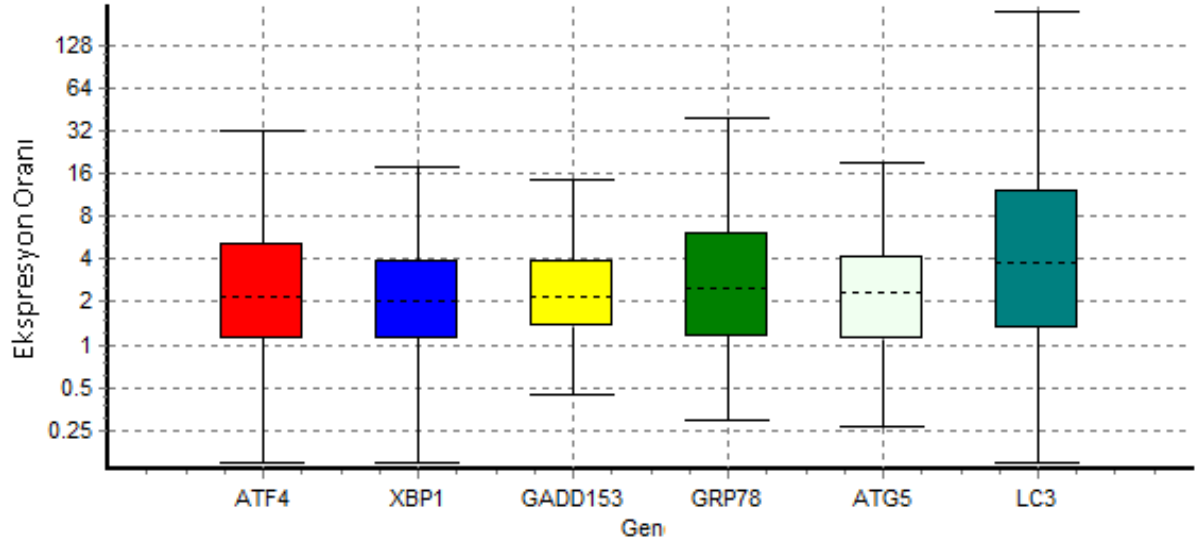
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

TRG - Hedef

REF – Referans

İn vitro ışınlatma yapılan örneklerden 0,1 Gy gama ışınına maruz kalan örneklerin ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5. 0.1 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir

4.1.2.2. 0.5 Gy Örneklerinin Relatif Gen İfade Raporu

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	0,428	3,025	0,896 - 10,780	0,235 - 27,354	0,017	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	0,851	2,675	0,845 - 8,064	0,242 - 16,205	0,022	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,94	2,417	0,836 - 8,337	0,379 - 20,832	0,024	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	2,791	1,111 - 7,321	0,335 - 12,852	0,005	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	0,8	2,512	0,676 - 9,564	0,239 - 21,935	0,039	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	4,591	0,843 - 25,448	0,198 - 104,829	0,014	İfadesi Artmış

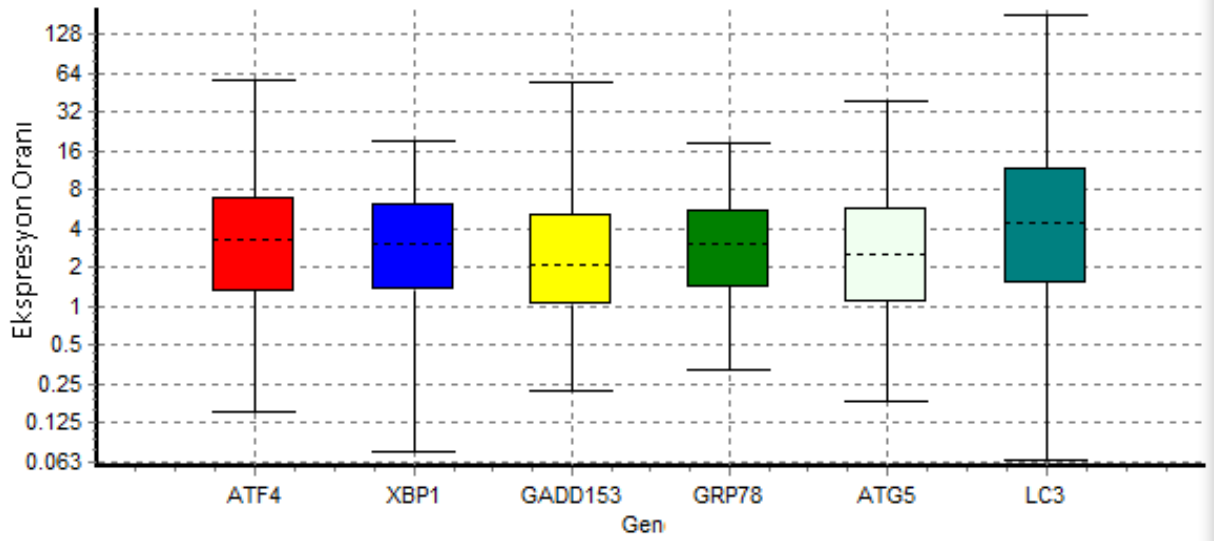
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

TRG - Hedef

REF – Referans

İn vitro ışınlama yapılan örneklerden 0,5 Gy gama ışınına maruz kalan örneklerin ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.6. 0.5 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir

4.1.2.3. 1 Gy Örneklerinin Relatif Gen İfade Raporu

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	0,428	3,113	1,078 - 8,941	0,415 - 24,064	0,006	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	0,851	3,046	1,265 - 7,888	0,348 - 32,689	0,006	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,94	3,325	0,796 - 14,023	0,380 - 47,778	0,008	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	2,944	0,774 - 10,413	0,269 - 26,594	0,019	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	0,8	3,172	0,785 - 13,961	0,326 - 26,928	0,018	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	5,757	1,112 - 31,691	0,281 - 145,087	0,006	İfadesi Artmış

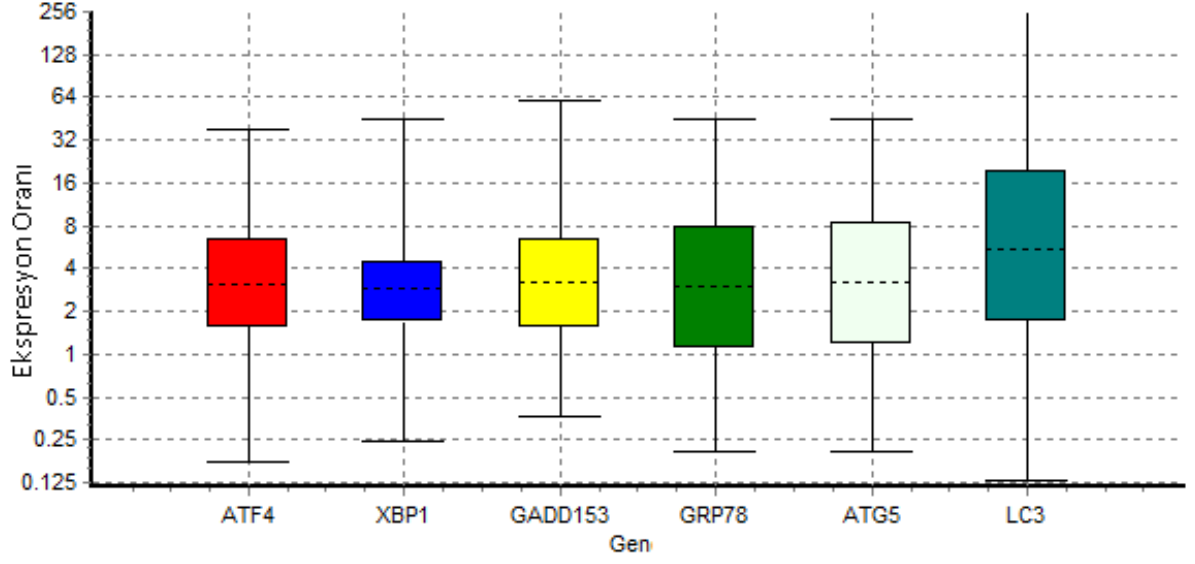
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

TRG - Hedef

REF – Referans

İn vitro ışınlama yapılan örneklerden 1 Gy gama ışınına maruz kalan örneklerin ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.7. 1 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir.

4.1.2.4. 3 Gy Örneklerinin Relatif İfade Raporu

Parametre	Değer
İterasyonlar	2000

Gen	Tipi	Reaksiyon Etkinliği	İfade	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuçlar
B2M	REF	0,8	1,000				
GAPDH	REF	0,8	1,000				
ATF4	TRG	0,428	4,056	1,141 - 15,004	0,452 - 44,068	0,001	İfadesi Artmış
XBP1	TRG	0,851	8,371	1,737 - 21,738	0,543 - 2.784,327	0,001	İfadesi Artmış
GADD153	TRG	0,94	10,964	2,525 - 39,176	1,332 - 678,301	0,000	İfadesi Artmış
GRP78	TRG	0,8	3,180	1,110 - 8,941	0,362 - 15,544	0,005	İfadesi Artmış
ATG5	TRG	0,8	3,797	0,948 - 18,431	0,224 - 65,489	0,012	İfadesi Artmış
LC3	TRG	0,8	7,232	1,349 - 40,170	0,451 - 246,395	0,002	İfadesi Artmış

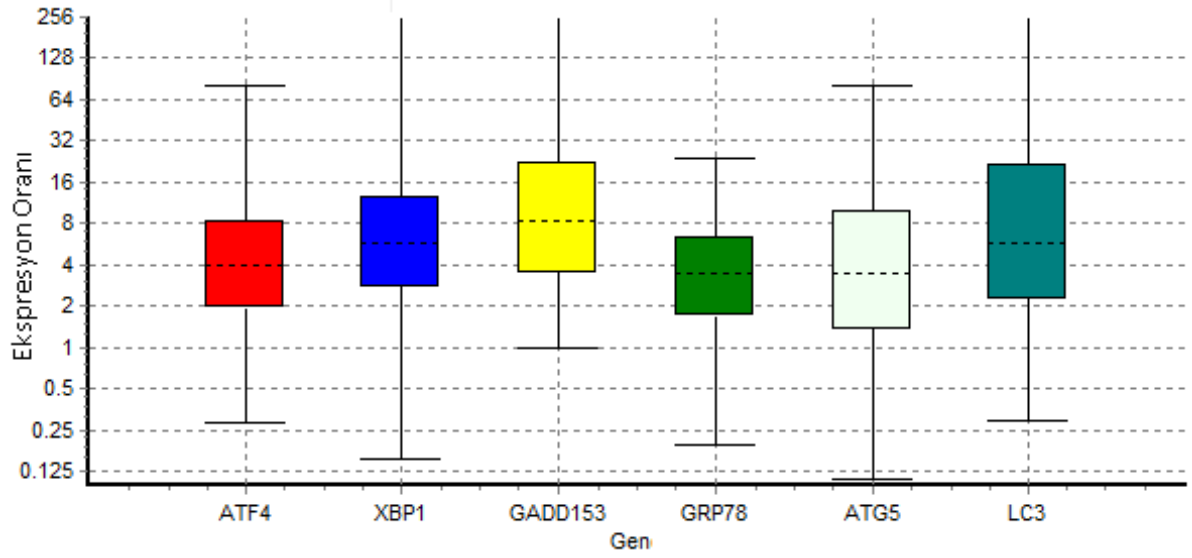
Etiketler:

P(H1) – Örnek ve kontrol grupları arasındaki farkın yalnızca şans eseri olmasına dayalı alternatif hipotezin olasılığı.

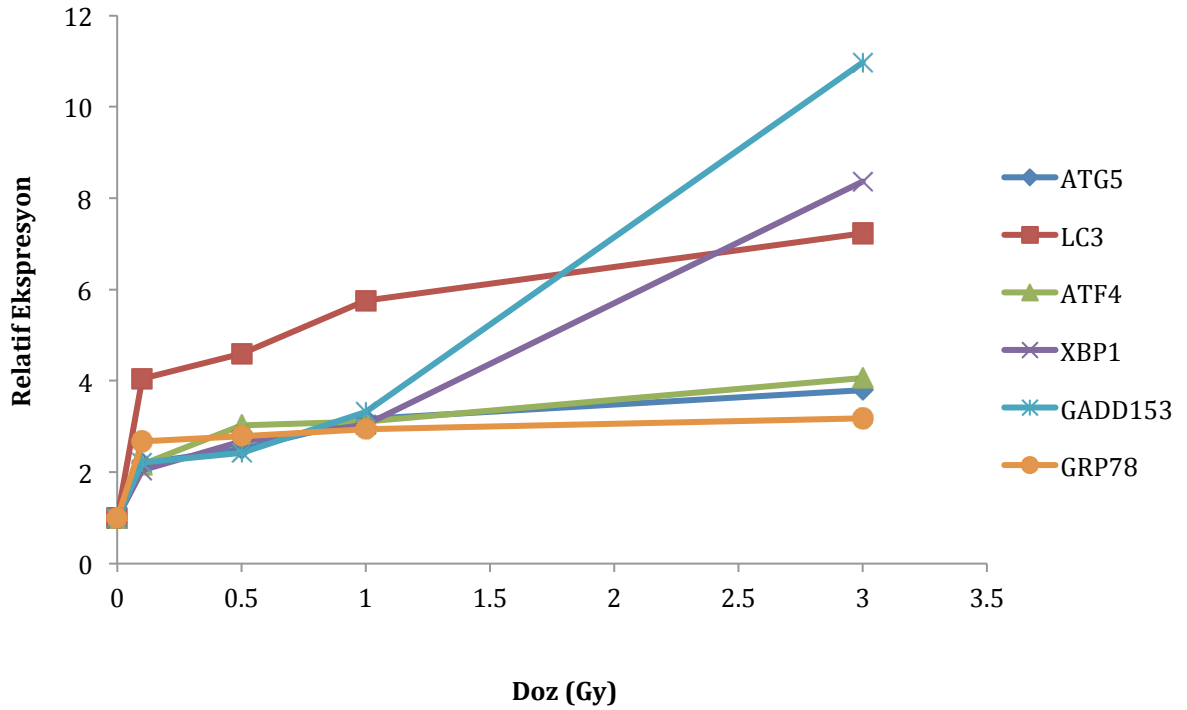
TRG - Hedef

REF – Referans

İn vitro ışınlama yapılan örneklerden 3 Gy gama ışınına maruz kalan örneklerin ifade analizleri sonucunda *ATF4*, *XBP1*, *GADD153*, *GRP78*, *LC3* ve *ATG5* genlerinin ifadeleri *B2M* ve *GAPDH* genleri referans genleri olarak alınarak değerlendirilmiş ve ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8. 3 Gy ışınlanmış örneklerde genlerin ifade oranlarına ait kutu grafiği. Noktalı çizgi gen ifadesinin ortancasını temsil etmektedir.



Şekil 4.9. 0,1 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy ve 5 Gy in vitro ışınlama yapılan örneklerde genlerin doz cevap eğrisi çizilmiştir.

5. TARTIŞMA

İnsanlar yaşam süreleri boyunca kaçınılmaz olarak uzay ve güneşten gelen kozmik ışıklardan, yer kabuğunda bulunan radyoizotoplar nedeniyle toprak ve yapı malzemelerinden, su ve gıdalar gibi doğal kaynaklardan ve bunlara ilaveten gelişen teknoloji gereği yapay kaynaklardan radyasyona maruz kalır. Radyasyonun insan sağlığı üzerinde yaratabileceği olumsuz etkiler gün geçtikçe açıklık kazanmaktadır. Bu etkiler radyasyon yanıkları, kalıtsal bozukluklar, radyasyona bağlı gelişen hastalıklar, kanser, ömür süresinin kısalması ve hatta yüksek dozlara maruz kalınması halinde ani ölümler şeklinde özetlenebilir.

Radyasyonun tıbbi ve endüstriyel uygulamalarda kullanımının artması, Çernobil gibi radyasyon kazaları ve Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombaları, bilim adamlarını radyasyonun insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştırmaya zorlamış ve son 50 yılda bu araştırmalar gittikçe hız kazanmıştır. Radyasyonun etkileri ile ilgili, belirli bir biyolojik etkiyi meydana getirecek doz seviyeleri gibi temel bilgiler biliniyor olmasına rağmen bireysel olarak kişilerin aldığı dozlar ve bu dozlara cevap olarak kişilerde oluşan biyolojik reaksiyonlar kesin olarak bilinmemektedir (Coşkun, 2003). Bu durum, kişilerin radyo duyarlılıklarının ve verdikleri tepkilerin biyolojik çeşitlilik sebebiyle diğer bütün uyarıcı etkilerde olduğu gibi radyasyona karşı da farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Radyasyonun insanlar üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler genelde ya tedavi amacıyla yapılan ışınlamalar sonucunda ya da mesleki radyasyon kazaları sonucunda toplanan bilgilerden elde edilmiştir. Ancak radyasyon kazaları sonucunda kişilerin aldıkları dozlar kesin olarak bilinmediğinden genelde çalışmalar tahmine dayalı olmak zorunda kalmıştır. Bunun dışında, iyi dozimetre koşulları altında yapılan hayvan deneylerinden de çeşitli bilgiler elde edilmiştir (Göksel 1973; Şeker 2000). Son yüzyılda yapılan araştırmalar, yüksek dozda ışınlamalar sonucunda meydana gelen hasarlar hakkında önemli bilgiler verse de düşük dozda ışınlamalar için ne yazık ki aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Bu sebeple gerek tıpta gerekse radyasyondan korunmada, radyasyona maruz kaldıktan sonra absorblanan doz hakkında güvenilir bilgi verebilecek indikatörlere giderek artan bir ihtiyaç duyulmaktadır (Amundson et al., 2001).

Toplu veya bireysel olarak radyasyona maruz kalan bireylerin absorbe ettikleri radyasyon dozu, fiziksel veya biyolojik dozimetreler ile belirlenebilmektedir. Ancak kaza ve mesleki ışınlanma durumlarında fiziksel dozimetreler, dozimetrenin vücut üzerindeki konumu nedeni ile maruziyet dozu hakkında tam bilgi vermede yetersiz kalabilmekte, toplumsal radyasyon kazalarında ise bireylerin üzerinde dozimetreler bulunmamaktadır. Bu durum biyolojik dozimetrelere üstünlük sağlamaktadır (Coşkun, 2003). Bireylerde radyasyon maruziyeti sonucu gözlenen etkileri değerlendirmek için günümüzde kullanılan biyolojik dozimetreler ile ilgili pek çok problem söz konusudur. Kan sayımı, somatik mutasyonlar ve sitogenetik yöntemler gibi uygulanan biyolojik analiz yöntemlerinin çoğu yaş, sigara kullanımı, ilaç kullanımı ve diğer toksinlerden etkilendiği için özgül olmamakla beraber, heterojen popülasyonlarda istatistiksel olarak güven sağlamaları olası değildir (Amundson and Fornace, 2003; Ünlü, 2011). Aynı zamanda hali hazırda kullanılan sitogenetik temelli yöntemler hızlı sonuçlar vermemektedir. Bu sebeplerden dolayı radyasyon ışınlamalarında doz tespitini belirleyecek hızlı, otomasyona uygun ve yüksek kalitede sonuçlar veren invaziv olmayan testlerin geliştirilmesi kaçınılmaz olmuştur (Amundson et al., 2004).

Amundson ve Fornace, iyonize radyasyon maruziyetine cevap olarak doz, doz hızı, radyasyon kalitesi ve maruz kalma süresine göre değişen stres genlerinin belirteç olarak kullanılabilceğini önermişlerdir (Amundson and Fornace, 2001). Bu kapsamda yapılan çalışmalar spesifik gen setlerinin belirlenerek moleküler biyobelirteçlerin oluşturulması üzerine yoğunlaşmıştır (Knops et al., 2012; Paul et al., 2011; Manning et al., 2011; Kabacık et al., 2011; Meadows et al., 2010; Brengues et al., 2010; Paul and Amundson 2008; Dressman et al., 2007; Fachin et al., 2007; Amundson et al., 2004; Grace et al., 2002; Blakely, 2001).

Tez çalışmasında, hücreyi stres durumunda otofajiye sürükleyen genlerin ifadeleri kullanılarak biyolojik dozimetre için güvenli ve hızlı bir deney sistemi oluşturulması amaçlanmıştır. Q-RT PZR ile gen ifadelerinin kantitatif analizi, GRP78, ATG5, LC3, ATF4, XBP1 ve GADD153 genlerinin ifadelerinin, radyoterapi hastalarında tedaviyi takip eden günlerde ve in vitro ışınlama yapılan örneklerde lineer olarak arttığını göstermiştir. İyonize radyasyona maruz kalmamış kontrol grubu örneklerinde ise çalışılan genlerin ifadeleri düşük olarak bulunmuştur.

Çalışmada, gerçek hayatta herhangi bir radyasyon kazası durumunda ışınlamanın lokasyonu bilinemeyeceği için hastanın toplam vücut dozu değerlendirmesi yapılmıştır ve dış ışınlamanın toplam vücut dozuna etkisini belirlemek adına kanser türlerine göre ayırım yapılmamıştır. Aynı bir proje kapsamında, tez çalışmasına dahil edilen hasta ve in vitro ışınlama yapılan örneklerde radyasyonun DNA'ya verdiği hasar Comet Assay yöntemi ile kuyruk momenti parametresi kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneye dahil edilen kanser hastaları tedavi öncesinde çok sayıda radyolojik tetkik yaptırduklarından, değerlendirilen kontrol örneklerine ait comet analizi sonuçlarında kuyruk moment değerleri yüksek çıkmıştır ancak, bu beklenen bir sonuçtur. Bu hastaların kanser türüne göre vücudun farklı bölgelerinin lokal olarak fraksiyonlu şekilde birinci hafta sonunda 1 Gy, üçüncü hafta sonunda 3 Gy ve beşinci hafta sonunda 5 Gy toplam doz aldığı bildirilmiştir. Elde edilen kuyruk moment verileri değerlendirildiğinde, tedavi ışınlamasına maruz kalan bölgeye göre verilen dozun toplam vücut dozuna katkısı farklı olduğu için, belirlenen haftalarda bölgelere uygulanan doz ile aynı olmadığı belirlenmiştir. Tedaviyi yapan kişi tarafından bildirilen toplam doz değerleri tek seferde uygulanan dozlar olmadığından ve hafta sonlarında tedaviye ara verildiğinden tamir mekanizması (recovery) oranı yüksektir. Bu nedenle, doz anlamlı bir artış gösterecek kadar tamir olayı gerçekleştiği için kuyruk moment oranında verilen doza bağlı doğrusal artış gözlemlenmemiştir. Hafta içerisinde verilen tedavi dozuna bağlı olan DNA hasarı, haftasonu büyük oranda tamir olduğundan tedavi süresince DNA hasarı bakımından çok büyük farklılık olmaması beklenen bir sonuç olmuştur. Aynı şekilde in vitro olarak ışınlanan örneklerde de Comet Assay analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda bu örneklerde artan dozla orantılı olarak kuyruk momenti değerlerinin dolayısı ile DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir (yayın aşamasındaki verilerdir).

İn vitro ışınlama sonucu elde edilen bulgular (Şekil 4.10), düşük doz uygulaması yapılan çalışmalar ile uyum göstermektedir. Örneğin Knops ve arkadaşları, insan periferik kan lenfositlerini gama kaynağı ¹³⁷Cs'da 0, 0.02 Gy, 0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy, 2 Gy ve 4 Gy doz ışınlayarak çalışmalarındaki gen ifade profillerinin düşük doz radyasyonu tespit edebilmek için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermişlerdir (Knops et al., 2010). DNA tamir genleri ile ilgili Q-RT PZR ile yapılan düşük doz ışınlama çalışmalarında ise lineer bir artışın olduğu gözlemlenmiştir

(Manning et al., 2011; Grace et al., 2002). Yine in vitro ışınlanan kan örnekleri ile yapılan mikroarray ekspresyon profilleri benzer sonuçlar sunmaktadır (Paul and Amundson, 2008).

Çalışmaya dahil edilen diğer bir grup, kanser sebebi ile radyoterapi gören hastalardır. Radyasyon dozu hastalara fraksiyonlar halinde küçük ve eşit dozlara bölünerek, günlük seanslar halinde haftanın 5 günü uygulanmış ve tedavi hastaya bağlı olarak haftalarca sürmüştür. Çalışmaya dahil edilen hastalar beşinci hafta sonunda 5 Gy toplam doz almışlardır. Güncel çalışmalar, kanser tedavisi gören hastaların tümör hücrelerinin iyonize radyasyon maruziyeti sonucu otofajiyi devreye sokarak radyasyona direnç geliştirdiğini göstermiştir. Bu radyodirenç durumu, hücrenin kendini ölümden korumak için geliştirdiği bir mekanizma olarak açıklanmıştır (Chaachouay et al., 2011; Kuwahara et al., 2011; Zeng and Kinsella, 2011; Paglin and Yahalom, 2006).

İyonize radyasyon sonrasında hücrede meydana gelen subletal stres boyunca hücrelerin metabolizmalarını adapte etmek için ve kendilerini potansiyel bir hasardan korumak için hızlı bir şekilde değişime soktuğu bilinmektedir. Yani, çeşitli stres cevap yollarının hangisinin kullanılacağı hücrenel bir program tarafından yönetilir. Radyasyon sonucunda ER'da stres meydana geldiğinde sitoplazmada bir sinyal kaskadı meydana gelir. Bu yolların aktive olmasının sonucunda şaperonları kodlayan genlerin, lipid sentez mekanizmasında rol alan genlerin ve yollarda yer alan diğer birçok proteini kodlayan genlerin transkripsiyonu artmaktadır ve stresle indüklenen metabolik adaptasyon ve hasarı kontrol eden temel olay otofajidir (Kroemer et al., 2010).

İyonize radyasyon sonucu ER stresi oluşmakta ve sonuçta üç ana sinyal iletim yolağı (PERK, ATF6 ve IRE1) uyarılmaktadır. PERK, ATF6 ve IRE1 yolları, stres sonucu oluşan katlanmamış protein cevabı (UPR) için hedef genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlar. UPR'nın ana hedefi GRP78'dir (Li et al., 2008). Bir moleküler şaperon olan GRP78'in stres olmadığı durumlarda hücrede bu üç proteine bağlı olduğu ve fosforilasyonlarını engellediği, stres durumlarında ise katlanmış protein miktarı artacağından dolayı bu proteinleri serbest bırakarak aktive olmalarını sağladığı bilinmektedir (Healy et al., 2009). GRP78 ile ilgili yapılan çalışmalar, memeli hücrelerinde GRP78'in otofajinin temel

bileşeni olduğunu göstermiştir (Li et al., 2008). Li ve arkadaşları UPR hedeflerinin otofajiyi nasıl kontrol ettiğini gösterebilmek için çeşitli inhibitörlerle ER stresi yaratmışlardır. Çalışmalarının sonucunda stres indüklü otofaji için GRP78'in şart olduğunu göstermişlerdir. Yine hücre içi organel yapılarının elektron mikroskop analizleri, GRP78 knockdown hücrelerinde otofagozomun çift membran yapısının oluşumu için gerekli olduğu düşünülen ER'un yavaşça şiştiğini ve organize olmadığını göstermiştir (Li et al., 2008). Bu sonuçlar stres koşulları veya patolojik durumlar söz konusu olduğunda, GRP78'in ifadesinin hücrenin hayatta kalmak için devreye soktuğu yollarda neden arttığını açıklamaktadır.

ER stresine cevaben otofosforile olan IRE1 RNaz aktivitesi ile bazik-lösin-fermuar domaini içeren transkripsiyon faktörü XBP1'in mRNA'sını kırmakta ve oluşan kırılmış XBP1 mRNA'sı translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşmektedir (Liu and Kaufman,2003). UPR cevabında yer alan ER'da bulunan şaperon genlerinin (GRP78 gibi) ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin XBP1'in aktive ettiği genlerle düzenlenebileceğine dair çalışmalar vardır (Zhang et al., 2010; Hotamışlıgil, 2010; Lee et al., 2003). XBP1'in upregülasyonunun ER stresine cevapta homeostazi sağladığı düşünülmektedir.

ER stresinde rol oynayan diğer bir gen ATF4'tür. Hücrede stres sonucu fosforillenerek aktif hale gelen PERK sinyal iletim yolağı eIF2 α 'nın fosforilasyonunu sağlamakta, fosforile olan eIF2 α ise bir bazik lösin-fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörü olan ATF4'ün transkripsiyonunu arttırmaktadır. ATF4'ün ifadesinin indüklemesi, çeşitli genlerin de ifadesine yol açar. İfadesi artan genler arasında ATF4'e ihtiyaç duyan, genom kararlılığını, apoptozu ve immün cevapları düzenleyen GADD45A'da vardır (Jiang et al., 2007). Yapılan son çalışmalarda ATF4'ün kanser için potansiyel bir terapötik hedef olduğu gösterilmiş, ayrıca ATF4 ifade düzeyinin tümörlerin hipoksik bölgelerinde arttığı, agresif fazda hipoksi, yetersiz beslenme ve oksidatif stresle başa çıkabilmek için ATF4'e ihtiyaç duydukları (Fels ve Koumenis, 2006) ancak kronik fazda ifadesinde artış olmadığı tespit edilmiştir (Daibata et al., 2004). İfadesi transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde düzenlenebilen ATF4, aminoasit metabolizmasını, hücrel redoksu ve anti-stres cevaplarını düzenlemektedir (Ye ve Koumenis, 2009). ER stres uyaranlarına cevap olarak eIF2 α 'nın fosforilasyonundaki artış,

Atg12'nin ATF4-bağımlı artışı ile otofajiye yol açabilmektedir. Alternatif olarak, ATF4 ve stres-regüle protein p8 psödokinaz TRB3'ün up-regüle olmasını teşvik ederek otofajiyi stimüle etmek için Akt/mTORC1 ekseninin inhibisyonuna yol açmaktadır. ATF4 geninde meydana gelen ifade artışı, iyonize radyasyonun oluşturduğu ER-stresi nedeniyle aktif hale gelen otofajik ve aynı zamanda apoptotik yolda rol oynamasıyla açıklanabilir.

ATF4'ün ifadesindeki artışla ifadesi artan diğer bir gen ER stresinde rol oynayan ve yine bir transkripsiyon faktörü olan GADD153'tür. Düşük doz uygulaması ile ilgili yapılan çalışmalarda GADD153'ün ER stresinde ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Fang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sağlıklı fareleri düşük doz radyasyona maruz bırakmış ve GRP78, PERK ve GADD153 mRNA seviyelerinin ışınlanmamış örneklerle karşılaştırarak arttığını gözlemlemişlerdir (Fang et al., 2012). Rouschop ve arkadaşları ise, hipoksiya sonucunda bazı kanser hücre hatlarında önemli otofaji genleri olan LC3 ve ATG5'in ifadelerinin, sırasıyla ATF4 ve GADD153 aracılığıyla arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda, GADD153 ve apoptoz arasındaki bağlantının GADD153'ün otofaji ve apoptoz arasındaki dengeyi etkileme yeteneği ile ilgili olduğunu önermişler, ancak bunun için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (Rouschop et al., 2010). Tez çalışmasında GADD153'ün iyonize radyasyon maruziyeti sonrasında arttığı tespit edilmiştir. GADD153 gen ifadesindeki artış, radyasyonu takiben aktif hale gelen ER stresi ve PERK sinyal iletim yolağının aktivasyonu ile açıklanabilir.

Chaachouay ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada radyoterapiye karşı direnç gösteren hücrelerde LC3II/LC3I oranı araştırılmış ve bu hücrelerde otofajinin arttığı sonucuna varılmıştır (Chaachouay et al., 2011). LC3II/LC3I oranı otofajinin varlığını göstermek için belirteç olarak kullanılan bir orandır. LC3II proteinin yağ molekülü bağlanmış formunu ifade ederken LC3I bağlanmamış formunu temsil etmektedir (Kadowaki and Karim, 2009).

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla paralel olarak otofagozom membranının oluşmasını sağlayan LC3 ve Atg5 seviyelerinin iyonize radyasyon sonrasında ve aminoasit açlığında arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Lomonaco et al., 2009; İto et al., 2005). Lomonaco ve arkadaşları CD133+ glioma kök hücrelerini gama radyasyonuna (5 Gy) maruz bırakmışlar ve çalışmanın sonucunda gama

radasyonu ile indüklenen CD133+ glioma kök hücrelerinde LC3, Atg5 ve Atg12 genlerinin ifadelerinin arttığını gözlemlemişlerdir (Lomonaco et al., 2009). LC3 ve Atg5 gen ifadelerinin radasyonu takiben arttığı tespit edilmiştir. Ototogazom ve otofajik membranın oluşumunda çok önemli rolleri olan bu genlerin artışı, radyoterapi ve in vitro radyasyon sonrası strese giren hücrelerde hayatta kalmak için devreye sokulan bir mekanizma olan otofajinin aktivasyonu ile açıklanabilir.

Özellikle son on yılda otofaji üzerine yapılan çalışmalar ve otofaji hakkında moleküler düzeyde elde edilen bilgiler hücre ölümünün nasıl kontrol edildiğini açıklığa kavuşturmuştur. Çalışmalar, otofajinin bazı koşullarda hücrenin strese direncini arttırdığını ve hücrenin hayatta kalmasına yol açtığını, bazı koşullarda ise otofajik aktivitenin hücre ölümüyle birlikte seyrettiğini göstermiştir (Öz Arslan vd., 2011). Radyoterapi ve kemoterapi gibi günümüzde uygulanan kanser tedavilerinin tümör hücreleri içerisinde otofajiyi tetiklediği (Zeng and Kinsella, 2011) ve buna ilaveten iyonize radyasyon sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) otofajinin ana tetikleyicisi olduğu bilinmektedir (Szumiel, 2012). İyonize radyasyona maruz kalma sonrasında oluşan oksidatif stres koşulları altında, memeli hücrelerinin kaderine karar veren en önemli faktör ise ROS'nin hasar etkileri ve sinyal iletim yolları arasındaki dengedir (Szumiel, 2012). Hücresel homeostazı ve otofajiyi düzenleyen yollar hem tümör oluşumunu hem de tümöre cevabı etkiler. Bu kapsamda kanser hücrelerinin tedavisinde otofajinin rolü ile ilgili yapılan çalışmalar anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesi için moleküler hedeflerin keşfine neden olacak ve aynı zamanda normal hücreleri ayırarak yalnızca kanser hücrelerini hedef alacak olan letal tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Lozy and Karantza, 2012).

Tez çalışmasında, biyolojik dozimetre geliştirmeyi hedefleyen bir deney sistemi oluşturmak amacıyla, kanser tedavisi gören radyoterapi hastalarında ve iyonize radyasyonun yol açtığı hücresel hasarda büyük oranda aktive olduğu bilinen otofaji yolağı seçilerek bu yolda rol oynayan bazı genlerin ifadeleri araştırılmıştır. Sonuçta çalışmaya dahil edilen genlerin ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, gen ifade düzeylerini kullanarak, herhangi bir kaza durumunda, mesleki ışınlanmalarda veya olası bir radyolojik terörist saldırısında oluşabilecek kitlesel ışınlanmalarda, maruz kalınan dozu hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit

edebilecek biyolojik biyodozimetrelerin rutin uygulamaya sokulması için umut vericidir. Ancak yapılan çalışmalara ilaveten, ışınlama sonucu ifade düzeyleri en fazla artan ve kişiden kişiye değişiklik göstermeyen (genetik varyasyonun en az olduğu) gen setleri belirlenmeli ve bu gen setleri farklı türde ışınlamaya maruz kalan gruplarda denenmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmed, F.E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods, Trends in Biotechnology, 5, 215-23.
- Algüneş, Ç., 2002, Radyasyon Biyofiziği, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları, Edirne.
- Amaral, A. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48:2 2005
- Amundson, S.A. and Fornace, A.J., 2001, Gene Expression Profiles for Monitoring Radiation Exposure. Radiat Prot Dosimetry, 97 (1), 11-16.
- Amundson, S.A. and Fornace, A.J., 2003, Monitoring Human Radiation Exposure By Gene Expression Profiling: Possibilities and Pitfalls. Health physics, 85 (1), 36-42.
- Amundson, S.A., Grace, M.B., McLeland, C.B., Epperly, M.W., Yeager, A., Zhan, Q., Greenberger, J.S., Fornace, A.J. Jr., 2004, Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. Cancer Res. 64(18), 6368-71.
- Amundson, S.A., Meltzer, P., Trent, J., Bittner, M., Fornace, A.J. Jr., 2001, Biological indicators for the identification of radiation exposure in humans. Expert Rev Mol Diagn., 1, 89 –97.
- Apel, A., Zentgraf, H., Buchler, M.W., Herr, I., 2009, Autophagy-A double-edged sword in oncology. Int J Cancer, 125, 991–995.
- Awa, A.A., 1991, Persistent Chromosome Aberrations in the somatic Cells of A-bomb Survivors, Hiroshima and Nagasaki. J. Radiat. Res., 34, 265-274.
- Aydın, T., 2004, Endüstride radyasyonla sterilizasyon kurs kitabı, syf:1-12 TAEK, Ankara.
- Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., Yeo, K.W., 2012, Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions, Int J Med Sci., 9(3), 193-9.
- Begg, A.C., Stewart, F.A., Vens, C., 2011, Strategies to improve radio-therapy with targeted drugs. Nat Rev Cancer, 11, 239-253.
- Bender, M. A., 1964, Chromosome aberrations in irradiated human subjects. Ann. NY Acad. Sci., 114, 249-25.
- Bender, M. A., Awa, A. A., Brooks, A. L., Evans, H. J., Groer, P. G., Littlefield, L. G., Pereira, C., Preston, R. J. and Waschholz, B. W., 1988, Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. Mutat. Res., 196, 103-159.
- Blakely, W.F., 2001, Radiation Exposure Assessment using Cytological and Molecular Biomarkers, Radiat Prot Dosimetry, 97 (1), 17-23.

- Boraks, G., Tampelini, F.S., Pereira, K.F., Chopard, R.P., 2008. Effect of ionizing radiation on rat parotid gland, *Brazilian Dental Journal*, 19,73–76.
- Bregues, M., Paap, B., Bittner, M., Amundson, S., Seligmann, B., Korn, R., Lenigk, R., Zenhausern, F., 2010, Biodosimetry on Small Blood Volume Using Gene Expression Assay, *Health Phys.*, 98(2), 179-85.
- Cao, Y. and Klionsky, D.J., 2007, Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein, *Cell Research*, 17, 839–849.
- Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., Rodemann, H.P., 2011, Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation, *Radiother Oncol.*, 99(3), 287-92.
- Chang, C.Y., Huang, W.P., 2007, Atg19 mediates a dual interaction cargo sorting mechanism in selective autophagy, *Mol Biol Cell*,18, 919–929
- Cucinotta, F.A., Dicello, J.F., Nikjoo, H., Cherubini, R., 2002, Computational model of the modulation of gene expression following DNA damage, *Radiat Prot Dosimetry*, 99:85–90.
- Dicle, O., 1991, *Temel Radyoloji Fiziği*, Güneş Kitapevi Yayınları, İzmir.
- Dirican, B., 2002, *Radyo Biyoloji Ders Notu*, Ankara Üniversitesi.
- Dressman, H.K., Muramoto, G.G., Chao, N.J., Meadows, S., Marshall, D., Ginsburg, G.S., Nevins, J.R., Chute, J.P., 2007, Gene Expression Signatures That Predict Radiation Exposure in Mice and Humans, *PLoS Med.*, 4(4),e106.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A., 2009, Life and death partners. apoptosis, autophagy and the cross-talk between them, *Cell Death Differ*, 16, 966-75.
- Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Shank, B., Solin, L.J., Wesson, M., 1991, Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 21, 109-122.
- EPA-402-F-06-061, 2007, *Ionizing radiation fact book*, Environmental Protection Agency, USA
- Fachin, A.L., Mello, S.S., Sandrin-Garcia, P., Junta, C.M., Donadi, E.A., Passos, G.A., Sakamoto-Hojo, E.T., 2007, Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays, *Radiat Res.*, 168(6), 650-65.
- Fang, F., Gong, P.S., Song, X.F., Gong, S.L., Wang, Z.C., 2012, Low-dose radiation induces endoplasmic reticulum stress and activates PERK-CHOP signaling pathway in mouse testicular cells, *Zhonghua Nan Ke Xue.*, 18(9), 777-82.

- Forster, T., 1948, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann Phys (Leipzig)*, 2, 55-75.
- Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., 2004, Comet assay in the assessment of the human genome damage induced by γ -radiation in vitro, *Radiol Oncol.*, 38(1), 43-7.
- Ginzinger, D.G., 2002, Gene Quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Exp. Hematol.* 30, pp. 503–512.
- Gordy, C. and He, Y.W., 2012, The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*, 3(1), 17–27.
- Gorman, A.M., Healy, S.J., Jäger, R., Samali, A., 2012, Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 134(3), 306-16. Epub 2012 Feb 17. Review.
- Gozuacik, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., Mizushima, N., Yoshimori, T., Kimchi, A., 2008, DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress- induced caspase activation and autophagic cell death, *Cell Death Differ*, 15(12), 1875-86.
- Göksel, S., 1973, Radyasyonun biyolojik etkileri ve korunma, İ.T.Ü. Matbaası, İstanbul.
- Grace, M.B., McLeland, C.B., Blakely, W.F., 2002, Real-time quantitative RT-PCR assay of GADD45 gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry, *Int J Radiat Biol.*, 78, 1011– 1021.
- Günalp, B., 2003, İyonize radyasyonun biyolojik etkileri, GATA, Hizmet içi eğitim programı sunumu.
- Günel, T. ve Aydınli, K., 2009, Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 43-45.
- Günel, T., 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*, 27, 763-767.
- Hall, E.J., Phil, D., 1972, Radiation Dose-Rate: A Factor of Importance in Radiobiology and Radiotherapy, *British Journal of Radiology*, 45, 81-97.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., 2003, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell*, 11, 619–633.
- Haugland, R.P. 2002, *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Ninth Edition. Molecular Probes, Inc.
- He, C. and Klionsky, D.J., 2009, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67–93.

- Healy, S.J., Gorman, A.M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., Samali, A., 2009, Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy, *Eur J Pharmacol.*, 625(1-3), 234-46. Review.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413– 417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. 1993, Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, 1026–1030.
- Hotamışlıgil, G., 2010, Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease, *Cell*, 140, 900–917.
- Hsieh, Y.C., Athar, M. and Chaudry, I.H., 2009, When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis, *Trends Mol Med.*, 15(3),129-38.
- Hussein, M.R., Abu-Dief, E.E., Kamel, E., Abou El-Ghait, A.T., Abdulwahed, S.R., Ahmad, M.H., 2008, Melatonin and roentgen irradiation-induced acute radiation enteritis in Albino rats: an animal model, *Cell Biology International*, 32, 1353– 1361.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., Wang, H., 2003, DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, *Oncogene*, 22(37), 5834-47.
- İto, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S., Kondo, Y., 2005, Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells, *International Journal of Oncology*, 26(5), 1401-1410.
- Jackson, S.P. and Bartek, J., 2009, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, 461, 1071-1078.
- Jeggo, P. and Lobrich, M., 2006, Radiation-induced DNA damage responses, *Radiat. Prot. Dosimetry*, 122, 124–127.
- Jiang, H., Jiang J., Wek R., 2007, The Eukaryotic Initiation Factor-2 Kinase Pathway Facilitates Differential GADD45a Expression in Response to Environmental Stress, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 3755-3765.
- Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F., Ashworth, A., Bouffler, S., Badie, C., 2011, Gene expression following ionising radiation: Identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response, *Int J Radiat Biol.*, 87(2), 115-29.
- Kadowaki, M. and Karim, R., 2009, Chapter 13 Cytosolic LC3 Ratio as a Quantitative Index of Macroautophagy, *Methods in Enzymology*, 452;199-213.
- Kaufman, J., 2002a, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, *J Clin Invest.*, 110(10), 1389-98.

- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., Arnold, S.M., 2002b, The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3(6), 411-21. Review.
- Kaya, A., 2002, İyonize radyasyonun biyolojik etkileri, *Dicle Tıp Dergisi*, C:29 S:3.
- Kitada, S., Krajewski, S., Miyashita, T., Krajewska, M., Reed, J.C., 1996, Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo, *Oncogene*, 12(1), 187-92.
- Knops, K., Boldt, S., Wolkenhauer, O., Kriehuber, R., 2012, Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry, *Radiat Res.*, 178(4), 304-12.
- Köksal, G., Dalcı, D.Ö. ve Pala, F.S., 1996, Mikronuclei in Human Lymphocytes: the Co-60 Gamma-ray doseresponse, *Mutation research*. 359, 151-157.
- Kroemer, G., Marino, G., Levine, B., 2010, Autophagy and the Integrated Stress Response, *Molecular Cell*, 40(2), 280-93.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- Kuwahara, Y., Oikawa, T., Ochiai, Y., Roudkenar, M.H., Fukumoto, M., Shimura, T., Ohtake, Y., Ohkubo, Y., Mori, S., Uchiyama, Y., Fukumoto, M., 2011, Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy, *Cell Death Dis.*, 2, e177
- Lakowicz, J.R., 1983, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, chapter 2.
- Lee, A.H, Iwakoshi, N.N. and Glimcher, L.H., 2003, XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response, *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448–7459.
- Lee, D.F., 1946, *Action of Radiations on Living cells*. Cambridge University Press
- Lewanski, C.R. and Gullick, W.J., 2001, Radiotherapy and Cellular Signalling, *Lancet Oncology*, 2 (6), pp. 366-370.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R. and Lee, A.S., 2008, The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells, *Cell Death Differ.*, 15(9): 1460–1471.
- Liu, C.Y. and Kaufman R.J., 2003, The unfolded protein response, *Journal of cell science*, 116(Pt 10), 1861-2.
- Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Moquet, J.E. and Guerero-Carbajal, Y.C., 2000, The role of cytogenetics in early triage of radiation causalities, *Appl. Rad. Isot.*, 52, 1107-1112.

- Lomonaco, S.L., Finniss, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S.N., Mikkelsen, T., Brodie, C., 2009, The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cell, *Int J Cancer*, 125(3),717-22.
- Lozy, F. and Karantza, V., 2012, Autophagy and cancer cell metabolism, *Semin Cell Dev Biol.*, 23(4), 395-401.
- Manning, G., Kabacik, S., Finnon, P., Paillier, F., Bouffler, S., Badie, C., 2011, Assessing a new gene expression analysis technique for radiation biodosimetry applications, *Radiation Measurements*, 46(9), 1014-1018.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., White, E., 2007, Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability, *Genes Dev.*, 21(11), 1367-81.
- Meadows, S.K., Dressman, H.K., Daher, P., Himburg, H., Russell, J.L., Doan, P., Chao, N.J., Lucas, J., Nevins, J.R., Chute, J.P., 2010, Diagnosis of Partial Body Radiation Exposure in Mice Using Peripheral Blood Gene Expression Profiles, *PLoS One*, 5(7), e11535.
- Mehrpour, M., Botti, J. and Codogno, P., 2011, Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Midilli, K. ve Türkoğlu, S., 2008, Moleküler mikrobiyolojide çoklu ve hızlı saptama yöntemlerinde gelişmeler, *ANKEM Derg*, 22(4), 213-216.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellnan, W.J., 1960, Chromosome Preparation of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Experimental Cell Res.*, 20, 613-618.
- Moretti, L., Cha, Y.I., Niermann, K.J., Lu, B., 2007, Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle*, 6(7), 793-8.
- Nias, A.H.W., 1998, *An Introduction to Radiobiology*, Wiley, New York.
- Norman, J.M., Cohen, G.M., Bampton, E.T., 2010, The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases, *Autophagy*, 6(8), 1042-56.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., Imaizumi, K., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress, *Molecular and Cellular Biology*, 26, 9220–9231.
- Öz Arslan, D., Korkmaz, G. ve Gözüaçık, D., 2011, Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4), 184-194.

- Özbay, İ., 2012, Eksternal Radyoterapi ve Brakiterapi Dozlarının Birleştirilmesinde Radyobiyojik Modeller, *Türk Onkoloji Dergisi*, 27(Ek 1), 62-66.
- Paglin, S. and Yahalom, J., 2006, Pathways that regulate autophagy and their role in mediating tumor response to treatment, *Autophagy*, 2(4), 291-3.
- Palumbo, S. and Comincini, S., 2013, Autophagy and ionizing radiation in tumors: The “survive or not survive” dilemma, *J Cell Physiol.*, 228(1), 1-8.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005, Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy, *Cell*, 122(6), 927-39.
- Paul, S., Barker, C.A., Turner, H.C., McLane, A., Wolden, S.L., Amundson, S.A., 2011, Prediction of In Vivo Radiation Dose Status in Radiotherapy Patients using Ex Vivo and In Vivo Gene Expression Signatures, *Radiat Res.*, 175(3), 257-65.
- Paul, S. and Amundson, S.A., 2008, Development of Gene Expression Signatures for Practical Radiation Biodosimetry, *International Journal of Radiation Oncology*, 71(4), 1236-1244.
- Ramalho, A. T., Curado, M.P. and Natarajan, A.T., 1995, Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil, *Mutat. Res.*, 331, 47-54.
- Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., Lambin, P., van der Kogel, A.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., 2010, The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5, *J Clin Invest.*, 120(1), 127-41.
- Schröder, M. and Kaufman, R.J., 2005, The mammalian unfolded protein response, *Annu Rev Biochem.*, 74, 739-89. Review.
- Shintani, T. and Klionsky, D.J., 2004, Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science*, 306, 990–995.
- Silari, M., 2011, Applications of particle accelerators in medicine, *Radiat Prot Dosimetry*, 146(4), 440-50. Epub 2011 Jun 14. Review.
- Singh, R., Cuervo, A.M., 2011, Autophagy in the cellular energetic balance, *Cell Metab.*, 13, 495–504.
- Szumiel, I., 2012, Radiation hormesis: Autophagy and other cellular mechanisms, *International Journal of Radiation Biology*, 88(9), 619-628.
- Şeker, S. ve Çerezci, O., 2000, Çevremizdeki radyasyon ve korunma yöntemleri, Boğaziçi Üniversitesi Yayınevi, İstanbul.

- TAEK, 2011, Tanısal Radyolojide Radyasyondan Korunma Kurs Kitabı.
- Tasdemir, E., Maiuri, M., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., et al., 2008, Regulation of autophagy by cytoplasmic p53, *Nat Cell Biol.*, 10, 676–87.
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T., 2000, Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucleic Acids Research*, 28, 3752-3761.
- Thierens, H., Vral, A., Barbe, M., Meijlaers, M., Baeyens, A., Ridder, L.D., 2002, Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers and the support of the adaptive response induced by occupational exposure, *Int J Radiat Biol* 78, 1117–1126.
- Tokatlı, F., 2008, Meme kanseri tedavisinde radyoterapi kemoterapi etkileşimi, 4(2), 070-076.
- Tuorkey, M.J., 2012, Bioelectrical Impedance as a Diagnostic Factor in the Clinical Practice and Prognostic Factor for Survival in Cancer Patients: Prediction, Accuracy and Reliability, *J Biosens Bioelectron* 3, 121.
- Ünlü, S., 2011, İyonize radyasyonun DNA'ya verdiği hasarın çeşitli moleküler teknikler kullanılarak araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Verheij, M., 2008, Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 471-480.
- Withers, H.R., 1975, The four R's of radiotherapy, *Advanc. Radiat. Biol* 5, pp. 241–271.
- www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx
- www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml
- www.taek.gov.tr (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu)
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007, Autophagosome formation: core machinery and adaptation, *Nat Cell Biol*, 9, 1102-9.
- Yamada, E. and Singh, R., 2012, Mapping Autophagy on to Your Metabolic Radar, *Diabetes*, 61(2), 272-80.
- Yao, K.C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S., Germano, I.M., 2003, Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy, *J Neurosurg*, 98, 378–384.
- Zdziencicka, M.Z., 1995, Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage, *Mutat Res.*, 336(3), 203-13.

- Zeng, X., Kinsella, T.J., 2011, Impact of autophagy on chemotherapy and radiotherapy mediated tumor cytotoxicity: “to live or not to live”, *Front Oncol.*, 1:30
- Zhang, B., Wang, Y., Pang, X., Su, Y., Ai, G., Wang, T., 2010, ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells, *Int J Radiat Biol.*, 86(6), 429-35.
- Zhao, L. and Ackerman, S.L., 2006, Endoplasmic reticulum stress in health and disease, *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 444–452.
- Zois, C.E. and Koukourakis, M.I., 2009, Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autoophagy*, 5(4), 442-50.

EK:

Q-RT PZR ile Amplifiye Edilen Genlere Ait Primer ve Prob Dizilerinin cDNA ve DNA Sekansları Üzerinde Gösterilişi:

B2M

Forward Primer

GAGTATGCCTGCCGTGTG

Prob

CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC

Reverse Primer

AATCCAAATGCGGCATCT

1 aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag
61 atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct
121 atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca
181 aatttcctga attgctatgt gtctggggtt catccatccg acattgaagt tgacttactg
241 aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg
301 tctttctatc tcttgacta cactgaattc accccactg aaaaagatga **gtatgcctgc**
361 **ogtgtg**aacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatc **g agacatgtaa**
421 **gcagcatcat ggagg**tttga **agatgccgca ttggatt**gg atgaattcca aattctgctt
481 gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt
541 ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat
601 gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggagggctgg caacttagag
661 gtgggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca
721 atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta
781 catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa
841 tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt
901 gataaagtaa ggcattggtg tggtaaatct ggtttatttt tgttcacaaa gttaaataaa

GAPDH

Forward primer **CCACTCCTCCACCTTTGAC**

Prob **TGGCTACAGCAACAGGGT**

Reverse primer **AGGGGAGATTCAGTGTGGTG**

1 ggctgggact ggctgagcct ggcgggagc ggggtccgag tcaccgctg ccgcgcgcgc
61 cccggtttct ataaattgag cccgcagcct cccgcttcgc tctctgctcc tctgttctga
121 cagtcagccg catcttcttt tgcgtcgcca gccgagccac atcgctcaga caccatgggg
181 aaggatgaag tcggagtcaa cggatttggc cgtattgggc gcttggtcac cagggctgct
241 tttaactctg gtaaagtgga tattgttggc atcaatgacc cttcattga cctcaactac
301 atggtttaca tgttccaata tgattccacc catggcaaat tccatggcac cgtcaaggct
361 gagaacggga agcttgtcat caatggaaat cccatcacca tcttcagga gcgagatccc
421 tccaaaatca agtggggcga tgctggcgct gagtacgtcg tggagtccac tggcgtcttc
481 accaccatgg agaaggctgg ggctcatttg caggggggag ccaaagggt catcatctct
541 gccccctctg ctgatgcccc catgttcgtc atgggtgtga accatgagaa gtatgacaac
601 agcctcaaga tcatcagcaa tgcctcctgc accaccaact gcttagcacc cctggccaag
661 gtcatccatg acaactttgg tatcgtggaa ggactcatga ccacagtcca tgccatcact
721 gccaccaga agactgtgga tggccccctc gggaaactgt ggcgtgatgg ccgcggggct
781 ctccagaaca tcatccctgc ctctactggc gctgccaagg ctgtgggcaa ggtcatcctc
841 gagctgaacg ggaagctcac tggcatggcc ttccgtgtcc cactgcca cgtgtcagtg
901 gtggacctga cctgccgtct agaaaaacct gccaaatag atgacatcaa gaagtggtg
961 aagcaggcgt cggagggcc cctcaaggc atcctgggct aactgagca ccagtggtc
1021 tctctgact tcaacagcga cac**ccactcc tccactttg ac**gctggggc tggcattgcc
1081 ctcaacgacc actttgtcaa gctcatttc tggtatgaca acgaatt**tgg ctacagcaac**
1141 **aggg**tgtg acctcatggc ccacatggcc tccaaggagt aagaccctg gaccaccagc

1201 ccagcaaga gcacaagagg aagagagaga ccctcactgc tggggagtcc ctgccacact
1261 cagtccccca ccacactgaa tctcccctcc tcacagttgc catgtagacc ccttgaagag
1321 gggaggggccc tagggagccg caccttgtca tgtacatca ataaagtacc ctgtgctcaa
1381 ccaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

GRP78

Forward primer **TCCTGCGTCGGCGTGT**

Prob **AAGAACGGCCGCGTGGAGATCAT**

Reverse primer **GTTGCCCTGATCGTTGG**

1 gggctggggg agggatatata agccgagtag gcgacggtga ggtcgacgcc ggccaagaca
61 gcacagacag attgacctat tgggggtgttt cgcgagtgtg agaggggaagc gccgcggcct
121 gtattttctag acctgccctt cgctgggttc gtggcgectt gtgaccccg gcccctgccg
181 cctgcaagtc ggaaattgcg ctgtgctcct gtgctacggc ctgtggctgg actgctgct
241 gctgccaac tggctggcaa gatgaagctc tcctgggtgg ccgcatgct gctgctgctc
301 agcgcggcgc gggccgagga ggaggacaag aaggaggacg tgggcacggt ggtcggcatc
361 gacctgggga ccacctactc ctgcgtcggc gtgtcaaga acggccgct ggagatcatc
421 gccaacgatac agggcaacgc catcacgccg tcctatgtcg cttcactcc tgaaggggaa
481 cgtctgattg gcgatgccgc caagaaccag ctcacctcca accccgagaa cacggtcttt
541 gacgccaagc ggctcatcgg ccgcacgtgg aatgaccctg ctgtgcagca ggacatcaag
601 ttcttgccgt tcaagtggt tgaaaagaaa actaaacct acattcaagt tgatattgga
661 ggtgggcaaa caaagacatt tgctcctgaa gaaatttctg ccatggttct cactaaaatg
721 aaagaaaccg ctgaggctta tttgggaaag aaggttacc atgcagttgt tactgtacca
781 gcctatthta atgatgccca acgccaagca accaaagacg ctggaactat tgctggccta
841 aatgttatga ggatcatcaa cgagcctacg gcagctgcta ttgcttatgg cctggataag
901 agggaggggg agaagaacat cctggtgttt gacctgggtg gcggaacctt cgatgtgtct
961 cttctacca ttgacaatgg tgtcttcgaa gttgtggcca ctaatggaga tactcatctg
1021 ggtggagaag actttgacca gcgtgtcatg gaacacttca tcaaactgta caaaaagaag
1081 acgggcaaaag atgtcaggaa agacaataga gctgtgcaga aactccggcg cgaggtagaa
1141 aaggccaaac gggccctgtc ttctcagcat caagcaagaa ttgaaattga gtccttctat

1201 gaaggagaag acttttctga gaccctgact cgggccaaat ttgaagagct caacatggat
1261 ctgttccggt ctactatgaa gcccgtccag aaagtgttgg aagattctga tttgaagaag
1321 tctgatattg atgaaattgt tcttgttggg ggctcgactc gaattccaaa gattcagcaa
1381 ctggttaaag agttcttcaa tggcaaggaa ccatcccgtg gcataaaccc agatgaagct
1441 gtagcgtatg gtgctgctgt ccaggctggg gtgctctctg gtgatcaaga tacagggtgac
1501 ctggtactgc ttgatgtatg tccccttaca cttgggtattg aaactgtggg aggtgtcatg
1561 accaaactga ttccaaggaa cacagtgggt cctaccaaga agtctcagat cttttctaca
1621 gcttctgata atcaaccaac tgttacaatc aaggctctatg aaggtgaaag acccctgaca
1681 aaagacaatc atcttctggg tacatttgat ctgactggaa ttctctctgc tctctgtggg
1741 gtcccacaga ttgaagtcac ctttgagata gatgtgaatg gtattcttcg agtgacagct
1801 gaagacaagg gtacagggaa caaaaataag atcacaatca ccaatgacca gaatcgctg
1861 acacctgaag aaatcgaaag gatggttaat gatgctgaga agtttgctga ggaagacaaa
1921 aagctcaagg agcgcattga tactagaaat gagttggaaa gctatgccta ttctctaaag
1981 aatcagattg gagataaaga aaagctggga ggtaaacttt cctctgaaga taaggagacc
2041 atggaaaaag ctgtagaaga aaagattgaa tggctggaaa gccaccaaga tgctgacatt
2101 gaagacttca aagctaagaa gaaggaactg gaagaaattg ttcaaccaat tatcagcaaa
2161 ctctatggaa gtgcaggccc tcccccaact ggtgaagagg atacagcaga aaaagatgag
2221 ttgtagacac tgatctgcta gtgctgtaat attgtaaata ctggactcag gaacttttgt
2281 taggaaaaaa ttgaaagaac ttaagtctcg aatgtaattg gaatcttcac ctgagagtgg
2341 agttgaaaact gctatagcct aagcggctgt ttactgcttt tcattagcag ttgctcacat
2401 gtctttgggt ggggggggaga agaagaattg gccatcttaa aaagcgggta aaaaacctgg
2461 gttagggtgt gtgttcacct tcaaaatggt ctatttaaca actgggtcat gtgcatctgg
2521 tgtaggaagt tttttctacc ataagtgaca ccaataaatg tttgttattt aactggtct
2581 aatgtttgtg agaagcttct aattagatca attacttatt ttaggaaatt taagactaga

2641 tactcgtgtg tggggtgagg ggaggagta tttggtatgt tgggataagg aaacacttct
2701 atttaatgct tccagggatt tttttttttt tttttaacct tcctgggcc aagtgatcct
2761 tccacctcag tctcccagct aattgagacc acaggcttgt taccaccatg ctcggtttt
2821 gcattaatct aagaaaagg gagagaagt aatccacatc ttactcagg caaggggcat
2881 ttcacagtgc ccaagagtgg ggttttcttg aacatacttg gtttctatt tccccttacc
2941 tttctaaaac tgcctttctg gtggcttttt ttaaaattat tactaatgat gcttttatag
3001 ctgcttggat tctctgagaa atgatgggga gtgagtgatc actggtatta actttataca
3061 cttggatttc atttgtaact ttaggatgta aaggatatt gtgaacccta gctgtgtcag
3121 aatctccatc cctgaaattt ctcatatggt gtactggggg gggatcttgg atggtgacat
3181 tgaaactaca ctaaatcccc tcactatgaa tgggttgta aaggcaatgg tttgtgtcaa
3241 aactggttta ggattactta gattgtgttc ctgaagaaaa ggtccagggt aaatgggatg
3301 atcaataaag gacaggctgg tgtaacata aaatccaata ttgtaatcct agcactttgg
3361 gaggccaagg cgggtggatc acaaggtaa gagatagaga ccatcttgc caacatggtg
3421 aaactccatc tctactgaaa atacaaaaat tagctgggcg tggtagtgca agctgaaggc
3481 tgaggcagga gaatcactcg aaccgggag gcagagggtg cagtgagccg agatcacacc
3541 actgtactcc agcccggcac tccagcctgg cgacaagagt gagactccac ctcaaaaaaa
3601 aaaaaaagaa tccaatactg cccaaggata ggtattttat agatgggcaa ctggctgaaa
3661 ggttaattct ctagggttag tagaactgga tccaacacc aaactcttaa ttagacctag
3721 gcctcagctg cactgcccga aaagcatttg ggcagaccct gagcagaata ctggtctcag
3781 gccaagccca atacagccat taaagatgac ctacagtgtg gtgtaccctg gggcaatagg
3841 gttaaatggt agttagcaac tagggctagt cttcccttac ctcaaaggct ctactaccg
3901 tggaccacct agtctgtaac tctttctgag gagctgttac tgaatattaa aaagatagac
3961 ttcaactatg aaa

LC3

Forward primer **ATGTCAACATGAGCGAGTTGGT**

Prob **AAGATCATCCGGCGCCGCC**

Reverse primer **CTGGTTCACCAGCAGGAAGAA**

1 atgttgtagac ctgacgtcac cgggagagtt acctcccgca gccgcagccc ccgtgctcag
61 cgcgagcccc ggagcccttg agcgcgagggc gcggagcccc cggagcccc aaaccgcaga
121 cacatccccg cgccccagag ccccggcctg cgcgcccagc cgggcccgcg cgatgccttc
181 agaccggcct ttcaagcagc ggcgagagctt cgccgaccgc tgtaaggagg tacagcagat
241 ccgcgaccag caccccagca aaatcccggg gatcatcgag cgctacaagg gtgagaagca
301 gctgcccgtc ctggacaaga ccaagttttt ggtcccggac c**atgtcaaca tgagcgagtt**
361 **ggt****caagatc atccggcgcc gcc**tgtagct gaaccccacg caggcc**ttct tctgctggt**
421 **gaaccag**cac agcatggtga gtgtgtccac gcccatcgcg gacatctacg agcaggagaa
481 agacgaggac ggcttcctct atatggtcta cgctcccag gaaaccttcg gcttctgagc
541 cagcagtagg ggggctcggc ctgggagtcg ggcggccccg gtcaggccct gccagagag
601 ctcttggttc ctgaactgag ctgcctctac cgtggtgggc tgggcaggca tgtgcccccc
661 tagtcagagg gcaccaacc acctactctg ccctgggtg gatcctgggc cggtcgtggt
721 agggttgtcc ctctgggtgc tggctggtgg gatgggggag ggtggggagc agctcccagc
781 acccctgctg tgtggttcat ctttttttta ggccctgcc tgtctgccc tctgcccctc
841 acccaccgga ggctctgccc accgcctgga cctgcccacc cctgaaagac tggcccctgg
901 ctccccgcc ctcggtctcc acgtggtgta tggatctgtg gtcattgtcc ctctgcagaa
961 taaagattgc tcaggcctgc ctggcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1021 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

ATG5

Forward primer **TCTGGATGGGATTGCAAATG**

Prob **ATTGACCAGTTTTGGCC**

Reverse primer **TTTCTTCTGCAGGATATTCCATGA**

1 gtgacgtcat ctccgggagc cgagggtgac tggacttgtg gtgcgctgcc agggctccgc
61 agcgttgccg gttgtattcg ctggatacca gagggcggaa gtgcagcagg gttcagctcc
121 gacctccgag ccggtgcttt ttgcggctgc gggggcttcc tggagtcttg ctaccgctc
181 cccgcaggac agtgtgtcag gcgggcagct tgccccgccg cccaccgga gcgcggaatc
241 tgggcgtccc caccagtgcg gggagccgga aggaggagcc atagcttga gtaggtttgg
301 ctttggttga aataagaatt tagcctgtat gtactgcttt aactcctgga agaatgacag
361 atgacaaaaga tgtgcttcga gatgtgtggt ttggacgaat tccaacttgt ttcacgctat
421 atcaggatga gataactgaa agggaagcag aaccatacta tttgcttttg ccaagagtaa
481 gttatttgac gttggtaact gacaaagtga aaaagcactt tcagaagggt atgagacaag
541 aagacattag tgagatatgg tttgaatatg aaggcacacc actgaaatgg cattatccaa
601 ttggtttgct atttgatctt cttgcatcaa gttcagctct tccttgaac atcacagtac
661 attttaagag ttttccagaa aaagacctc tgcaactgtc atctaaggat gcaattgaag
721 ctcatTTTTat gtcagtgtg aaagaagctg atgctttaa acataaaagt caagtaatca
781 atgaaatgca gaaaaaagat cacaagcaac **tctggatggg attgcaaaat** gacag**atttg**
841 **accagttttg ggcc**atcaat cggaaac**tca tggaatatcc tgcagaagaa** aatggatttc
901 gttatatccc ctttagaata tatcagacaa cgactgaaag acctttcatt cagaagctgt
961 ttcgtcctgt ggctgcagat ggacagttgc acacactagg agatctcctc aaagaagttt
1021 gtccttctgc tattgatcct gaagatgggg aaaaaagaa tcaagtgatg attcatggaa
1081 ttgagccaat gttggaaaca cctctgcagt ggctgagtga acatctgagc taccggata
1141 attttcttca tattagtatc atcccacagc caacagattg aaggatcaac tatttgctgt

1201 aacagaatca tccttaaagt ggatttatca gagcatgtca cccttttgct tcaatcaggt
1261 ttggtggagg caacctgacc agaaacactt cgctgctgca agccagacag gaaaaagatt
1321 ccatgtcaga taaggcaact gggctggtct tactttgcat cacctctgct ttcctccact
1381 gccatcatta aacctcagct gtgacatgaa agacttaccg gaccactgaa ggtcttctgt
1441 aaaatataat gaagctgaaa cctttggcct aagaagaaaa tggaagtatg tgccactcga
1501 tttgtatttc tgattaacaa ataaacaggg gtatttccta aggtgacat ggttgaactt
1561 tagctcatga aagtggaaac attggtttta ttttcaagag aattaagaaa gtaaaagaga
1621 aattctgtta tcaataactt gcaagtaatt ttttgtaaaa gattgaatta cagtaaacc
1681 atctttcctt aacgaaaatt tcctatggtt acagtctgtc tattgggatg caatcttgta
1741 actttgataa tgaacagtga gagattttta aataaagcct ctaaataatgt tttgtcattt
1801 aataacatac agttttgtca cttttcaagt actttctgac tcacatacag tagatcactt
1861 tttactctgt gttaccattt tgactggctg tcattggcat ggggtggata tagggcatag
1921 gattacttgt ctcagaagct gtcatagaat ttcttgctgc caattaaana acctgtgttc
1981 tttacacact acacgtataa atattgtaac tgttcatctt tgttgtttta tcaactgtaag
2041 cctgtcaaat catagtatcc taagcatctg taaatgctaa ttttgcattt ttggaaaaac
2101 ccattccttc caagctagtg tttttcattg gctccaggtc taatttttca ctgtgggtccc
2161 tggcagccag tcttttgaag tttaaagatt acctgtctct tgactgcagt accttttctt
2221 taatttttac caaaaatac cagaggttac tggagtctt attcaatata aggaaagttt
2281 gctgcacttt attaccaagc ctctgggatt ttaccagtca aacatatttg tgcattacat
2341 ttcatttctt gtgagctagc tggctgtcca tattgaatgt tgaccattt gagtacgcta
2401 aaaggcttac agtatcagac acgatcatgg ttttagatcc cataataaaa atgaatgttt
2461 ttcttataaa aaattataca aatgctgaag tgagattcta ctattgttca ttgcttcctt
2521 ttctttttcc ttttgcgatt ttcactgatt aatagcacat ttcttcacaa aattagataa
2581 agttggtcaa agaccagata ttctggaatg gaaattgtaa agcttaatca aaaagaatag

2641 ccagtacagc atacaatctc agaaacttag aagcaagtag aaaataattg gttgatgtaa
2701 acgaaagtgc catttttagta aaggcaggaa aaaaatagca atatttgagt tatgtaagga
2761 taaaaaatcc actgacttgt atttttgcac aagaggctgg tctgaatatg attgttcaca
2821 ttaagagtgt ttattcgtcg gttcattttg gggattttcc cccttgatgt tttgacagat
2881 tgaagtgagc tttagtgagc aaaaggatca gaatgcaggg aacactaagc tgtgatgaag
2941 aaagtgtggt aaaaagccag agtagtttta tacagacaaa accagtgatca ggcctttgca
3001 gtaggcttga gtgaacttct gatctagatt tgaaagtaaa ttttatgaag acattgccca
3061 tttttacttc ctcatcatt attgtaccag catcatagct ttattactct aatcccaggt
3121 aagtcaagcc tacaatgcc tagaggaaga gtaaaaccag aaattcatgc tggcttaaat
3181 aatctatfff tgtttctfff catttgaata tttaaatttt atggtttatt aaaaaattaa
3241 ataa

ATF4

Forward primer **TGGCTGGCTGTGGATGG,**

Prob **TGGTCAGTCCCTCCAACAACAGCAAG**

Reverse primer **TCCCGGAGAAGGCATCCT**

1 tttctacttt gcccgccac agatgtagtt ttctctgcgc gtgtgcgttt tccctcctcc
61 ccgccctcag ggtccacggc caccatggcg tattaggggc agcagtgcct gcggcagcat
121 tggcctttgc agcggcggca gcagcaccag gctctgcagc ggcaaccccc agcggcttaa
181 gccatggcgt gagtaccggg gcgggtcgtc cagctgtgct cctggggccg gcgcggttt
241 tggattggtg ggtgctggcc tggggccagg gcggtgccgc caagggggaa gcgatttaac
301 gagcgcgccg gacgcgtggt ctttgcttgg gtgtccccga gacgctcgcg tgcttgggat
361 cgggaaagcg tagtcgggtg cccggactgc ttccccagga gccctacagc cctcggaccc
421 cgagccccgc aaggttccca ggggtcttgg ctggtgcccc acgaaacgtg gcaggaacca
481 agatggcggc ggcagggcgg cggcgcgggc gtgagtcaag ggcggggcgt gggcggggcg
541 cggccgccct ggccgtatth ggacgtgggg acggagcgtt ttctcttgg cggccggtgg
601 aagaatcccc tggctctcgt gacgctccat tttgtggaac ctgagttgca agcagggagg
661 ggcaaataca actgccctgt tcccgattct ctatagggc gatctagaga agtcccgcct
721 cataagtgga aggatgaaat ttcagaaca gtaacctct aatgggagtt ggcttctgat
781 tctcattcag gcttctcacg gcattcagca gcagcgttgc tgtaaccgac aaagacacct
841 tcgaattaag cacattcctc gattccagca aagcaccgca acatgaccga aatgagcttc
901 ctgagcagcg agtggttggg ggggacttg atgtcccctc tcgaccagtc gggtttgggg
961 gctgaagaaa gcctaggtct cttagatgat tacctggagg tggccaagca cttcaaacct
1021 catgggttct ccagcgaca ggctaaggcg ggctcctccg aa**tggctggc tgtggatgg**
1081 **ttggtcagtc cctccaacaa cagcaagg**ag gatgccttct **ccggga**caga ttggatggtg
1141 gagaaaatgg atttgaagga gttcgacttg gatgcctgt tgggtataga tgacctggaa

1201 accatgccag atgaccttct gaccacgttg gatgacactt gtgatctctt tgcccccta
1261 gtccaggaga ctaataagca gccccccag acggtgaacc caattggcca tctcccagaa
1321 agtttaacaa aacccgacca ggttgcccc ttcaccttct tacaacctct tcccctttcc
1381 ccaggggtcc tgcctccac tccagatcat tccttagtt tagagctggg cagtgaagtg
1441 gatatcactg aaggagatag gaagccagac tacactgctt acgttgccat gatccctcag
1501 tgcataaagg aggaagacac cccttcagat aatgatagtg gcatctgtat gagcccagag
1561 tcctatctgg ggtctcctca gcacagcccc tctaccaggg gctctccaaa taggagcctc
1621 ccatctccag gtgttctctg tgggtctgcc cgtcccaaac cttacgatcc tcctggagag
1681 aagatggtag cagcaaaagt aaagggtag aaactggata agaagctgaa aaaaatggag
1741 caaaacaaga cagcagccac taggtaccgc cagaagaaga gggcggagca ggaggctctt
1801 actggtgagt gcaaagagct ggaaaagaag aacgaggctc taaaagagag ggcggattcc
1861 ctggccaagg agatccagta cctgaaagat ttgatagaag aggtccgcaa ggcaaggggg
1921 aagaaaaggg tcccctagtt gaggatagtc aggagcgtca atgtgcttgt acatagagtg
1981 ctgtagctgt gtgttccaat aaattatfff gtagggaaag ta

XBP1

Forward primer **GCGCCTCACGCACCTG**

Prob **CCCCGAGGAGAAGGCGCTGAG**

Reverse primer **GCTGCTACTCTGTTTTTCAGTTTCC**

1 ggcgctgggc ggctgcggcg cgcggtgcgc ggtgcgtagt ctggagctat ggtggtggtg
61 gcagccgcgc cgaaccggc cgacgggacc cctaaagttc tgcttctgtc ggggcagccc
121 gcctccgccc cggagccccggccggccag gcctgccc tcattggtgcc agcccagaga
181 ggggccagcc cggaggcagc gagcgggggg ctgccccagg cgcgcaagcg acagcgcctc
241 acgcacctga gccccgagga gaaggcgtg aggaggaaac tgaaaaacag agtagcagct
301 cagactgcca gagatcgaaa gaaggctcga atgagtgagc tggaacagca agtggtagat
361 ttagaagaag agaaccacaaa acttttgcta gaaaatcagc ttttacgaga gaaaactcat
421 ggcctttagt ttgagaacca ggagttaaga cagcgttgg ggatggatgc cctggttgc
481 gaagaggagg cggaagccaa ggggaatgaa gtgaggccag tggccgggtc tgctgagtcc
541 gcagcactca gactacgtgc acctctgcag caggtgcagg cccagttgtc acccctccag
601 aacatctccc catggattct ggcggtattg actcttcaga ttcagagtct gatatcctgt
661 tgggcattct ggacaacttg gaccagtc tgttcttcaa atgcccttcc ccagagcctg
721 ccagcctgga ggagctcca gaggtctacc cagaaggacc cagttcctta ccagcctccc
781 tttctctgtc agtggggagc tcatacagca agctggaagc cattaatgaa ctaattcgtt
841 ttgaccacat atataccaag cccctagtct tagagatacc ctctgagaca gagagccaag
901 ctaatgtggt agtgaaaatc gaggaagcac ctctcagccc ctcagagaat gatcacctg
961 aattcattgt ctcagtgaag gaagaacctg tagaagatga cctcgttccg gagctgggta
1021 tctcaaatct gctttcatcc agccactgcc caaagccatc ttctgccta ctggatgctt
1081 acagtgactg tggatacggg ggttccctt cccattcag tgacatgtcc tctctgcttg
1141 gtgtaaacca ttcttgggag gacacttttg ccaatgaact ctttccccag ctgattagtg

1201 tctaaggaat gatccaatac tgttgcctt ttccttgact attacactgc ctggaggata
1261 gcagagaagc ctgtctgtac ttcattcaaa aagccaaaat agagagtata cagtcctaga
1321 gaattcctct atttgttcag atctcataga tgacccccag gtattgtctt ttgacatcca
1381 gcagtccaag gtattgagac atattactgg aagtaagaaa tattactata attgagaact
1441 acagctttta agattgtact tttatcttaa aagggtggtgta gttttcccta aaatacttat
1501 tatgtaaggg tcattagaca aatgtcttga agtagacatg gaatttatga atggttcttt
1561 atcatttctc ttcccccttt ttggcatcct ggcttgcctc cagttttagg tcctttagtt
1621 tgcttctgta agcaacggga acacctgctg agggggctct ttcctcatg tatacttcaa
1681 gtaagatcaa gaatcttttg tgaattata gaaattact atgtaaagc ttgatggaat
1741 tttttcctgc tagttagct tctgaaagg gctttctcca tttatttaa actaccatg
1801 caattaaaag gtacaatgca

GADD153

Forward primer **GGAGAACCAGGAAACGGAAAC**

Prob **AGTGGTCATTCCCCAGCCCGG**

Reverse primer **TCTCCTTCATGCGCTGCTT**

1 agagacttaa gtctaaggca ctgagcgtat catgttaaag atgagcgggt ggcagcgaca
61 gagccaaaat cagagctgga acctgaggag agagtgttca agaaggaagt gtatcttcat
121 acatcaccac acctgaaagc agatgtgctt ttccagactg atccaactgc agagatggca
181 gctgagtcac tgcccttctc ttcggacact gtcagctggg agctggaagc ctggtatgag
241 gacctgcaag aggtcctgtc ttcagatgaa aatgggggta cctatgtttc acctcctgga
301 aatgaagagg aagaatcaaa aatcttcacc actcttgacc ctgcttctct ggcttggctg
361 actgaggagg agccagaacc agcagaggtc acaagcacct cccagagccc tcaactctcca
421 gattccagtc agagctccct ggctcaggag gaagaggagg aagaccaagg **gagaaccagg**
481 **aaacggaaac** ag**agtgttca** **ttccccagcc** **cg**gctgga**aa** **agcagcgcat** **gaaggagaa**
541 gaacaggaga atgaaaggaa agtggcacag ctagctgaag agaatgaacg gctcaagcag
601 gaaatcgagc gcctgaccag ggaagtagag gcgactcgcc gagctctgat tgaccgaatg
661 gtgaatctgc accaagcatg aacaattggg agcatcagtc cccacttgg gccacactac
721 ccacctttcc cagaagtggc tactgactac cctctcacta gtgccaatga tgtgaccctc
781 aatcccacat acgcaggggg aaggcttggg gtagacaaaa ggaaaggctc cagcttgtat
841 atagagattg tacatattatt tattactgtc cctatctatt aaagtgactt tctat

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emel SAĞLAR ELÇİ

Doğum Yeri : HATAY

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise: 1995-1998 Antakya Süper Lisesi

Lisans: 1998-2003 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2004-2007 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi: 2005- 2013 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi
Dekanlığı, Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi