



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAMA RADYASYONU VE HİPOBARİK STRES
KOŞULLARI ALTINDAKİ HeLa HÜCRELERİNDE
SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ (CDK) GENLERİNİN
ANLATIMININ ARAŞTIRILMASI**

Gizem AKMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Radyobiyojoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN

Temmuz, 2013

İSTANBUL

Bu çalışma 02/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyojoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



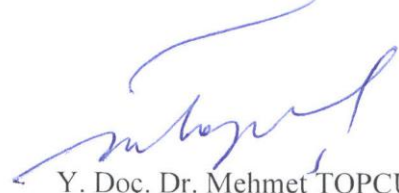
Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Çimen ATAK
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Seyhan ALTUN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Y. Doç. Dr. Mehmet TOPÇUL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Y. Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25680 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca, manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle beni aydınlatan değerli hocam, Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN'a en derin teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında gama radyasyonu ışınlaması için gerekli imkanların sunulmasını sağlayan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sedat Sadık KOCA'ya, Sayın Yard. Doç. Dr. Songül ÇAVDAR KARAÇAM'a, hipobarik stres koşullarının uygulanması için gerekli imkanları sağlayan İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ercan ARICAN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Uzman Özlem DAGDEVİREN'e teşekkürlerimi iletirim.

Tez çalışmam sırasında ilgi ve alakalarıyla her zaman yanımda olan arkadaşlarım Deniz EROL, Beste YAVUZDOĞAN, Bahar ALÖN ve Miraç BAŞ'a, her sorunda yanıma koşan Dr. Ayşe KOCA'ya sevgi ve teşekkürlerimi iletirim.

Bu zor süreçte benden manevi desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük rol sahibi olan Sevgili annem Ayşe Müjde AKMAN'a, Sevgili babam Ali Suat AKMAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2013

Gizem AKMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. HÜCRE SİKLUSU	4
2.1.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)	7
2.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CKI/CDKI).....	10
2.2. GAMA RADYASYONU	12
2.2.1. Gama Radyasyonunun Hücre Siklusu Üzerine Etkisi.....	13
2.3. HİPOBARİK STRES	15
2.3.1. Hipobarik Stres Koşullarının Hücre Siklusuna Etkisi.....	19
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERİNİN HAZIRLANMASI.....	22

3.2. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	22
3.3. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	23
3.4. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ.....	23
3.5. GAMA RADYASYONU DOZUNUN BELİRLENMESİ	23
3.6. GAMA RADYASYONU UYGULAMASI	25
3.7. HİPOBARİK STRES KOŞULLARININ UYGULANMASI.....	25
3.8. SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ.....	26
3.9. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	27
3.9.1. Faz Kontrast Mikroskobu	27
3.9.2. Işık Mikroskobu	27
3.10. GEN ANLATIMININ İNCELENMESİ	28
3.10.1. RNA İzolasyonu.....	28
3.10.2. RT-PCR Yöntemi.....	29
3.10.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. IC ₅₀ GAMA RADYASYONU DOZUNUN SAPTANMASI	32
4.2. SİTOTOKSİK ETKİLER	35
4.3. MORFOLOJİK ETKİLER	40
4.3.1. Faz Kontrast Mikroskobu	40
4.3.2. Işık Mikroskobu	45
4.4. GEN ANLATIMINDAKİ ETKİLER	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR.....	61

ÖZGEÇMİŞ	72
-----------------------	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Hücre siklusu fazları (Anonim-a, 2013).....	5
Şekil 2.2: Hücre siklusu kontrol noktaları (Cooper ve Hausman, 2006).	6
Şekil 2.3: Hücre siklusunda siklin-CDK yapılarının yer aldığı fazlar (Dehay ve Kennedy, 2007).....	8
Şekil 2.4: Hücre siklusu fazlarında siklin miktarları (Anonim-b, 2013).....	8
Şekil 2.5: HIF protein türevlerinin homolojisi (Ke ve Costa, 2006).....	18
Şekil 3.1: Cirrus Co-60 gama radyasyonu cihazı.....	24
Şekil 3.2: Hipobarik kabin.	26
Şekil 4.1: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 0 saat sitotoksik aktivite değerleri.	33
Şekil 4.2: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 0 saat % canlılık değerleri.	33
Şekil 4.3: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 24 saat inkübasyon süresi sonunda tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.....	34
Şekil 4.4: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 24 saat inkübasyon süresi sonunda % canlılık değerleri.....	35
Şekil 4.5: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saat deney süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.	37
Şekil 4.6: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saat deney süresi sonunda saptanan % canlılık değerleri.	37
Şekil 4.7: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.	39
Şekil 4.8: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan % canlılık değerleri.	39
Şekil 4.9: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 0 saat deney süresi sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).....	40
Şekil 4.10: HeLa hücre kültürlerinde tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	41
Şekil 4.11: HeLa hücre kültürlerinde tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	41
Şekil 4.12: HeLa hücre kültürlerinde gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	42
Şekil 4.13: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	43
Şekil 4.14: HeLa hücre kültürlerinde tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	43
Şekil 4.15: HeLa hücre kültürlerinde tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	44
Şekil 4.16: HeLa hücre kültürlerinde gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	44
Şekil 4.17: HeLa hücre kültürlerinin kontrol grubunun 0 saatteki görüntüsü (Giemsa x1000).	46
Şekil 4.18: Gama radyasyonu uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).	46

Şekil 4.19: Hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).....	47
Şekil 4.20: Gama radyasyonu ile hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).	47
Şekil 4.21: HeLa hücre kültürlerinin kontrol grubunun 24 saat sonraki görüntüsü (Giemsa x1000).....	48
Şekil 4.22: Gama radyasyonu uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).	48
Şekil 4.23: Hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).....	49
Şekil 4.24: Gama radyasyonu ile hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).....	49
Şekil 4.25: HeLa hücrelerinde deney gruplarına göre 0 saat sonunda siklin genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (A:Kontrol grubu, B:Gama radyasyonu, C:Hipobarik stres koşulları, D:Gama radyasyonu+hipobarik stres koşulları; 1:p21, 2:Siklin A, 3:Siklin E, 4:β-aktin).....	51
Şekil 4.26: HeLa hücrelerinde deney gruplarına göre 24 saat sonunda siklin genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (A:Kontrol grubu, B:Gama radyasyonu, C:Hipobarik stres koşulları, D:Gama radyasyonu+hipobarik stres koşulları; 1:p21, 2:Siklin A, 3:Siklin E, 4:β-aktin).....	52

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: cDNA ve RT-PCR için hazırlanan PCR cihazı program tablosu.	30
Tablo 3.2: Primerlerin Nükleotid Dizilimi.	30
Tablo 4.1: Çeşitli dozlarda gama radyasyonu uygulanan deney gruplarının 0 saat absorban ortalama (Aort) ve standart sapma (\pm SD) değerleri.	32
Tablo 4.2: Çeşitli dozlarda gama radyasyonu uygulanan deney gruplarının 24 saat absorban ortalama (Aort) ve standart sapma (\pm SD) değerleri.	34
Tablo 4.3: Kontrol, gama radyasyonu, hipobarik stres koşulları, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney gruplarının 0 saat sonunda ölçülen absorban ortalamaları (Aort) ve standart sapma (\pm SD) değerleri.	36
Tablo 4.4: Kontrol, gama radyasyonu, hipobarik stres koşulları, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney gruplarının 24 saat sonunda ölçülen absorban ortalamaları (Aort) ve standart sapma (\pm SD) değerleri.	38

SEMBOL LİSTESİ

APC/C	: Anafaz ilerletici bileşik/siklozom
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
ARNT	: Aril hidrokarbon nüklear yer değiştirici
ATM	: Ataxia Telegiectasia mutant kinaz
BER	: Baz çıkarma onarımı
bHLH-PAS	: Basit heliks-loop-heliks-Per-ARNT-Sim
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
DDR	: DNA hasarına yanıt mekanizmaları
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FBS	: Fötal bovine serum
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1
HLF	: HIF benzeri faktör
HR	: Homolog rekombinant
HRE	: Hipoksi yanıt elementi
HRF	: HIF ilişkili faktör
IC₅₀	: %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
IGF2	: İnsülin benzeri büyüme faktör-2
IPAS	: PAS inhibitörü
MEM	: Minimum essential medium
MOP2	: PAS süper aile 2 üyesi
MPF	: Mitozu ilerleten faktör
MTT	: (3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid)
NHEJ	: Homolog olmayan uçların bağlanması
PAS	: Per-ARNT-Sim
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCNA	: Hücre çekirdeği antijeni
PP1	: Protein fosfataz 1
pRb	: Tümör baskılayıcı protein
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
R Noktası	: Sınırlama noktası (Restriction point)
RFC	: Replikasyon faktörü C
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSBR	: Tek zincir kırığı onarımı
SSD	: Kaynak-yüzey mesafesi
TAE	: Tris-askorbik asit-edta
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü- α
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
UV	: Ultraviyole

ÖZET

GAMA RADYASYONU VE HİPOBARİK STRES KOŞULLARI ALTINDAKİ HeLa HÜCRELERİNDE SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ (CDK) GENLERİNİN ANLATIMININ ARAŞTIRILMASI

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi sonucu normal olmayan oluşumların meydana geldiği bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri olan radyoterapide amaç, kanserli hücrelerin DNA'sına zarar vermektir. Hipobarik stres koşulları, hücrelerde hipoksi meydana getirmektedir. Hipoksi sonucu meydana gelen serbest radikaller hücrelerde hasara yol açmaktadır. Bu tez çalışmasında, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının insan serviks karsinomu kökenli HeLa hücrelerinde siklin bağımlı kinaz genlerinin anlatımı incelendi. Bu amaçla 5 farklı gama radyasyonu dozu (2 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 32 Gy ve 64 Gy) uygulanan HeLa hücrelerinin uygulamadan 0 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi yöntemi ile sitotoksik aktiviteleri incelendi. Hücrelerde meydana gelen sitotoksitenin uygulanan dozun artmasına bağlı olarak kontrole göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0,01$). IC_{50} dozu olarak belirlenen 32 Gy gama radyasyonu dozu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücrelerinde meydana gelen sitotoksitenin kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,01$).

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 ve 24 saat sonunda meydana gelen morfolojik değişiklikler faz-kontrast ve ışık mikroskopunda gösterildi. Siklin bağımlı kinaz genlerinin moleküler düzeyde anlatımının saptanması amacıyla *siklin A*, *siklin E* ve *p21* primerlerinin anlatım seviyeleri Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelendi. HeLa hücrelerinde 0 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunda ve gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunda sadece *siklin A* geninin anlatım yaptığı ve kontrol grubuna göre anlatım seviyesinin düştüğü belirlendi.

Sonuç olarak elde edilen parametreler doğrultusunda, HeLa hücre kültürlerine gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte uygulanmasının en yüksek sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. Bu etki ile birlikte siklin bağımlı kinaz genlerinden *siklin A* geninin anlatım seviyeleri arasındaki farkın literatürde ilk kez ortaya konmuş olması bu bağlamda yapılacak diğer çalışmalara temel teşkil etmesi açısından oldukça önemlidir.

SUMMARY

EVALUATION OF CYCLIN DEPENDENT KINASE GENES EXPRESSION IN HeLa CELLS UNDER GAMMA RADIATION AND HYPOBARIC STRESS CONDITIONS

Cancer is defined as a disease, as a result of uncontrolled cell division and occurs abnormal formations. The purpose of radiotherapy which is one of the methods used for cancer treatment, doing harm to cancer cells' DNA. Hypobaric stress conditions, generate hypoxia in cells. Free radicals caused by hypoxia, leading to damage in cells. In this thesis, the expression of cyclin dependent kinase genes in HeLa cells which were originated from human cervical carcinoma were examined under the conditions of gamma radiation and hypobaric stress. For this reason, the cytotoxic activities of HeLa cells which were exposed to 5 different doses of gamma radiation (2 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 32 Gy and 64 Gy), were examined via Mitochondrial Dehydrogenase Enzyme Activity method, after 0 and 24 hours of incubation. It was determined that cytotoxicity increased significantly due to control group when the dose was increased ($p < 0.01$). Under 32 Gy gamma radiation which is also known as IC_{50} dose, and hypobaric stress conditions, it was determined that cytotoxicity of HeLa cells was statistically significant according to control group ($p < 0.01$).

After 0 and 24 hours, HeLa cell cultures that were exposed to gamma radiation and hypobaric stress conditions, the morphological changes were examined under phase-contrast and light microscopies. To detect the molecular expressions of cyclin dependent kinase genes, the expression degrees of *cyclin A*, *cyclin E* and *p21* primers were examined via Revers Transcriptase Polymerase Chain Reaction method. The outcomes of PCR were examined by agarose gel electrophoresis method. In the end of 0 and 24 hours of incubation, HeLa cells group it was observed that only *cyclin A* gene was expressed and expression decreased according to the control group under hypobaric stress conditions, also under hypobaric stress conditions and gamma radiation

Regarding acquired parameters, it was obtained that in HeLa cell cultures show the most cytotoxic effect when gamma radiation and hypobaric stress conditions were applied simultaneously. With this effect, for the first time showing the difference of expression levels between *cyclin A* genes of cyclin dependent kinase genes and because of this, it is highly significant to create basis for following studies.

1. GİRİŞ

Kanser, doğal bir süreç veya çevresel faktörlerin etkisi ile hücre DNA'sında ya da kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde, hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi sonucu normal olmayan oluşumların meydana geldiği bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücreleri invazyon, ilaç hassasiyetinin düşmesi, metastaz gibi malign özellikler taşımaktadır (Hartwell ve Kastan, 1994; Ringer ve Schnipper, 2001; İçli ve Akbulut, 2005). Hücre siklusu, hücrelerin çoğalması için meydana gelen bir dizi geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişiklikleri kapsayan süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu sürecin sağlıklı sonuçlanabilmesi için hücre siklusunun kontrolü çok büyük önem taşımaktadır (Qu ve diğ., 2003). Bu yüzden hücre siklusu içinde bazı kontrol noktaları yer almaktadır. Bu kontrol noktaları siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) aracılığı ile kontrol edilmektedir. Hücreler, hücre siklusu boyunca belirli durumlarda siklin proteinlerini sentezlemekte veya bu proteinleri parçalamaktadırlar. Ortamda var olan siklinler, CDK'lara bağlanmakta ve aktifleşerek aktif siklin/CDK yapılarını oluşturmaktadır. Siklin ve CDK'ların farklı kombinasyonları hücre siklusundaki önemli geçişlerde rol almaktadırlar (Aliustaoğlu, 2008). Hücre siklusunun G1/S ve G2/M geçişlerinde bulunan kontrol noktalarında hücrenin, siklusa devam edip etmeyeceğine karar verilmektedir. Hücre siklusunun devam etmeyeceği durumlarda hücre apoptoza uğramaktadır. Kanser oluşumunda, hücre siklus kontrolünün kaybı önemli bir basamağı oluşturmaktadır (Bodner-Adler ve diğ., 2005). Çevresel faktörler ile meydana gelen DNA hasarı, hücre siklusundaki kontrol mekanizmalarının bozulmasına neden olmaktadır. Pek çok kanser tipinde hücre siklusunun kontrol noktalarında mutasyonlar belirlenmiştir (Vermeulen ve diğ., 2003b).

Kanserin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve alternatif tedavi yöntemleri tek başlarına veya kombine olarak uygulanmaktadır. Radyoterapi, kanserin tedavisinde en etkili iki yöntemden birisidir. Hastaların yarısından fazlası, tedavilerinin bir bölümünde radyoterapi görmektedir (Tobias, 1996; Delaney ve diğ., 2005). Kanser

radoterapisinde amaç, kanserli hücrelerin DNA'sına zarar vermektir. DNA'sı onarılamayacak kadar zarar gören hücreler hücre sikluslarını durdurmakta, bunun sonucu olarak da hücreler ölmektedir. Ancak radyoterapi tedavisi sırasında çevredeki sağlıklı hücreler de zarar görebileceğinden, tedavi düşük dozlarda günlük olarak uygulanmaktadır (Joiner ve van der Kogel, 2009).

Hipobarik stres koşulları, hücrelerde hipoksi meydana getirmektedir. Hipoksi sonucu meydana gelen serbest radikaller, hücrelerde DNA, lipid ve proteinlerinde oksidatif hasara yol açmaktadır (Çakatay ve Telci, 2000; Çakatay ve Kayalı, 2006). Ayrıca hipobarik stres koşullarının mitokondriyal fonksiyonu bozduğu da gösterilmiştir. Bu stres koşulları, hücrelerin hücre siklusunun G1 evresinde etki ederek durdurmakta ve bunun sonucu olarak hücrelerin G1/S ilerlemesinde baskılama meydana getirerek hücre çoğalmasını engellemektedir (Krtolica ve Ludlow, 1996; Box ve Demetrick, 2004).

Kanser hücrelerinin hücre sikluslarının engellenerek hücre bölünmelerinin durması ve kanser hücrelerinin ölüme teşvik edilmesi tedavi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle hücre siklusunun moleküler mekanizmasının araştırılması oldukça önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının insan serviks karsinoması kökenli HeLa hücre soyu üzerinde meydana getirdiği sitotoksik etki ve hücre siklusunda yer alan CDK genlerinin anlatımı incelenmiştir. Bu bağlamda, günümüzde oldukça sık kullanılan ve radyoterapide önemli bir yer tutan gama radyasyonu ile günümüzde yeni bir çalışma konusu olan hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonrası 0 ve 24 saat inkübasyon süresince HeLa hücrelerinde meydana gelecek sitotoksik etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının hücrelerde meydana getirdiği morfolojik değişimin genel görüntüleri faz kontrast mikroskobu ve giemsa boyası ile ışık mikroskobunda gösterilmiştir. Ayrıca oluşan sitotoksik etki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi (MTT, (3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid)) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Uygulamalar sonucu hücre siklusunun kontrol noktalarında rol oynayan siklin bağımlı kinaz genlerinde meydana gelen gen anlatım seviyeleri Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile incelenerek, agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.

Çalışmamızda yukarıda bahsedilen parametreler ışığında, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının hücre siklusu üzerindeki etkisi ve bu etkide CDK genlerinin rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

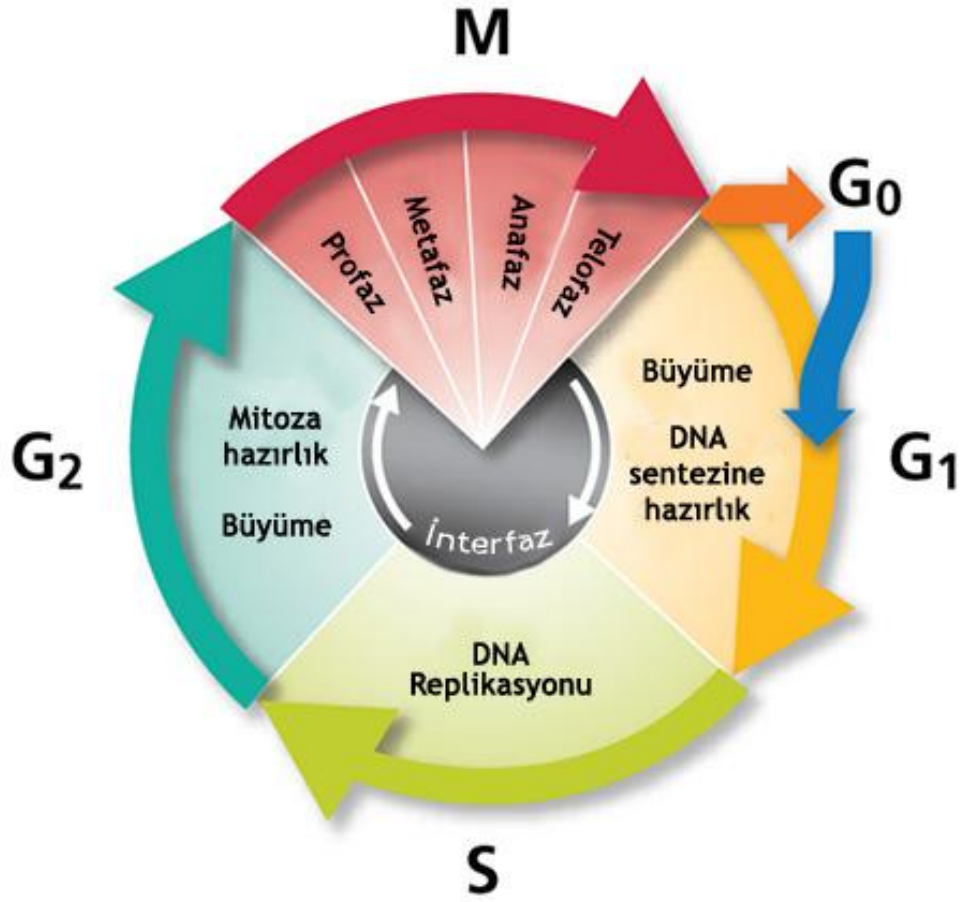
2.1. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu, bir takım makromoleküler olayları kapsayan hücre bölünmesini ve bunun sonucu olarak birbirinin aynısı olan iki yeni hücrenin oluşması olarak tanımlanmaktadır. Bu olay, hücrelerin canlı olduğunun göstergesidir. Hücre siklusu sırasında, hücrenin büyümesi, DNA replikasyonu, replike olmuş kromozomların yavru hücrelere dağılımı ve hücre bölünmesi olayları gerçekleşmektedir.

Hücre bölünmesi, mitoz fazını ve uzun bir evre olan interfazı kapsamaktadır. İnterfaz sırasında hücre büyümekte ve bölünmek için kromozomlarını kopyalamaktadır. İnterfaz evresinde G_1 , S ve G_2 alt fazları bulunmaktadır.

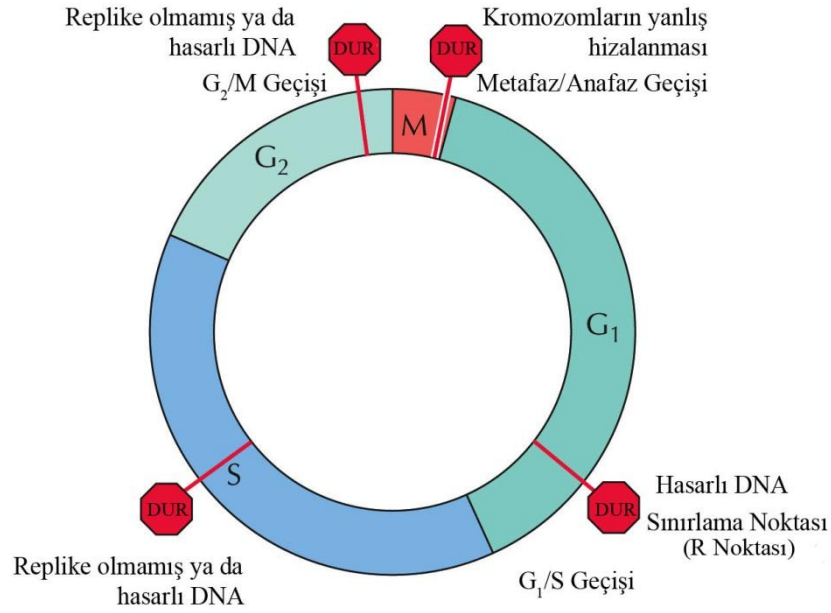
Bölünmeyen çok özelleşmiş hücreler ve sürekli bölünen hücreler haricinde, hücreler bölünmek için aktif sinyal almadıkları sürece, istirahat fazı olan G_0 fazında durmaktadırlar (Vermeulen ve diğ., 2003a, Vermeulen ve diğ., 2003b). Hücreler bölünme sinyalini aldıklarında, G_0 fazından çıkmakta ve hücre siklusunun aktif fazlarına geçmektedirler (Şekil 2.1).

1. G_1 Fazı: Hücre siklusunun bu ilk fazında hücreler, kendi çevrelerini kontrol etmekte, DNA sentezi için hazırlık yapmaktadırlar. RNA ve protein sentezi gerçekleşmektedir.
2. S Fazı: Bu fazda DNA sentezlenmektedir.
3. G_2 Fazı: Hücre büyümeye devam etmektedir. Mitoz bölünme için RNA ve protein sentezi yapmaktadır.
4. Mitoz Fazı: Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Bu fazın sonunda ise birbirinin aynısı iki yeni hücre meydana gelmektedir.



Şekil 2.1: Hücre siklusu fazları (Anonim-a, 2013).

Hücre siklusu sırasında çevreden ve hücre içinden gelen sinyaller hücrenin siklus fazlarında düzenli olarak ilerlemesini sağlamaktadırlar. Bu yüzden hücre siklusunun bazı aşamalarında kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin, hücre siklusuna devam edip etmeyeceğine karar verilmektedir (Vermeulen ve diğ., 2003a) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Hücre siklusu kontrol noktaları (Cooper ve Hausman, 2006).

Hücre siklusunda G₁-S geçişinde, S fazında, G₂-M geçişinde ve M fazı içerisinde metafaz-anafaz geçişinde olmak üzere dört kontrol noktası bulunmaktadır. Bunlardan ilki G₁ fazının geç evresinde görülmektedir ve G₁ fazından S fazına geçişi sağlamaktadır. Bu kontrol noktası hayvan hücrelerinde sınırlama noktası (Restriction Point-R Noktası) olarak adlandırılmıştır (Pardee, 1989). Hayvan hücrelerinde, hücre dışı faktörler hücrelerin G₁ fazından S fazına geçmesinde etkili olmaktadır. Bu faktörlerin olmaması durumunda hücreler, hücre siklusuna devam edememekte ve G₁ fazından ayrılarak istirahat fazı olan G₀ fazına geçmektedirler. Ayrıca bu fazda DNA hasarı meydana geldiği takdirde hücre siklusu G₁ fazında *p53* geni sayesinde durmaktadır (Agami ve Bernards, 2000). DNA'nın tamir edilemeyeceği durumlarda ise hücre apoptoza uğramaktadır (Vermeulen ve diğ., 2003a; Foster, 2008). S fazı kontrol noktası, DNA replikasyonunda herhangi bir sorun olduğu durumda sinyal kaskadını başlatarak, DNA tamir oluncaya kadar fazı durdurmaktadır. G₂ fazındaki kontrol noktası replike olmamış DNA'nın M fazına geçişini engellemektedir. DNA'nın tam olarak replike olmadığı durumda hücre siklusu, DNA replike oluncaya kadar durmaktadır. Metafaz/anafaz geçişinde bulunan kontrol noktasında, kromozomların iğ iplikleri üzerine dizilmesi ve yavru hücrelere eşit olarak dağılıp dağılmadığı kontrol edilmektedir.

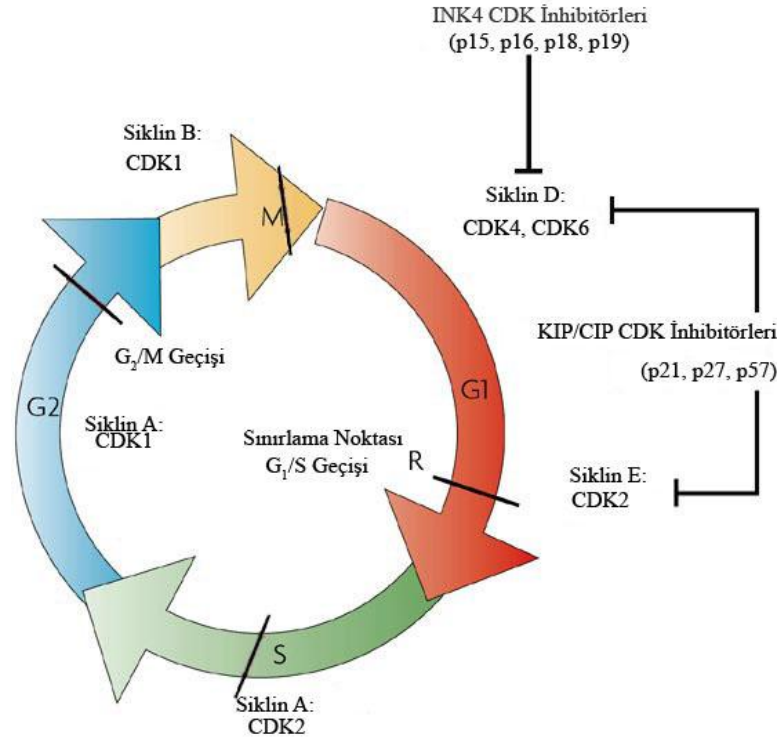
Hücreler bölünerek çoğalmaya başladığında, hücre siklusu pozitif ve negatif sinyaller yoluyla sıkı bir biçimde denetlenmektedir. Hücre siklusunun bir fazından diğerine geçişi bazı protein kinazlar sayesinde olmaktadır. Bunlar;

1. Siklinler
2. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)
3. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CKI/CDKI) olarak 3 gruba ayrılmaktadır.

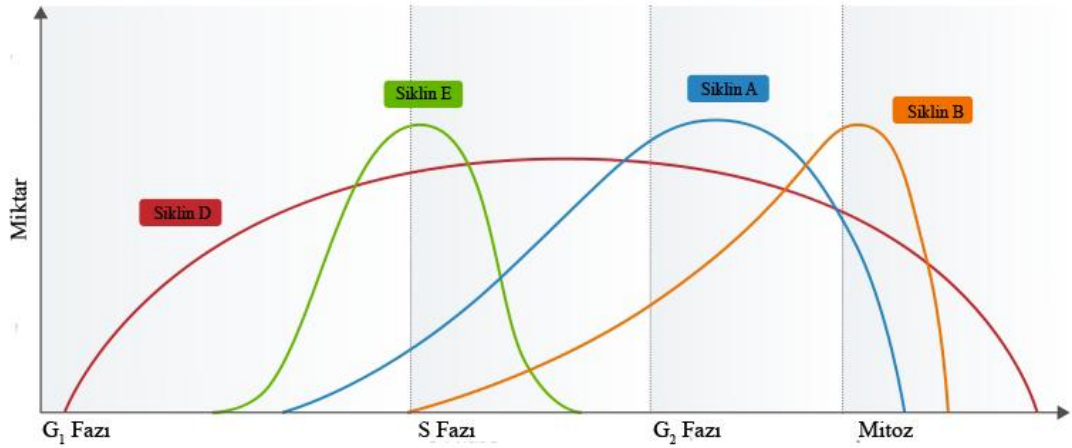
2.1.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)

Siklinler, hücre siklusu boyunca, CDK'ları aktive ederek hücrelerin ilerlemesini kontrol eden protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. CDK'lar ise, serin/treonin protein kinazlar olarak bilinmektedir. CDK'lar siklinlere bağlandıklarında aktifleşmekte ve aktif siklin/CDK bileşiklerini oluşturmaktadırlar. Bu yapıda siklinler düzenleyici alt birim, CDK'lar ise katalitik alt birimler olarak yer almaktadır (Flatt ve Pietenpol, 2000). CDK'ların aktifleşmesi birden fazla basamak sonunda gerçekleşmektedir. İlk olarak siklin alt birimi ile birleşmekte, belirli amino asitlerin fosforilasyon/defosforilasyonu bunu takip etmektedir.

Siklin/CDK bileşikleri, siklin alt biriminin hücre içindeki miktarına, fosforillenme durumuna ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin durumuna bağlı olarak düzenlenmektedir. Farklı siklinler, hücre siklusu içinde farklı fazlarda sentezlenirken diğer taraftan da hızlıca yıkılmaktadırlar (Şekil 2.3). Her bir siklin, kendine özgü bir fazda en yüksek değere ulaşmaktadır (Şekil 2.4). Aktive olan siklin/CDK yapısı DNA replikasyonu ve mitozda görev yapan birçok proteini fosforillemektedir. CDK'ların aktivitelerinin düzenlenmesinde siklinler haricinde, fosforilasyon/defosforilasyona neden olan başka yollarda rol oynamaktadır (Cabadak, 2008).



Şekil 2.3: Hücre siklusunda siklin-CDK yapılarının yer aldığı fazlar (Dehay ve Kennedy, 2007).



Şekil 2.4: Hücre siklusu fazlarında siklin miktarları (Anonim-b, 2013).

Hücre siklusunun ilerlemesinde anahtar rol oynayan G_1/S geçişi, siklin D/CDK4, G_1 fazı ortalarında siklin D/CDK6 ve G_1 fazının sonunu yöneten siklin E/CDK2 tarafından kontrol edilmektedir (Kasten ve Giordano, 1998; Stiegler ve diğ., 1998; Harbour ve diğ., 1999; Sherr ve Roberts, 1999; Watanabe ve diğ., 1999; Pucci ve diğ., 2000).

Sınırlama noktasında tümör baskılayıcı protein (*Rb*, *pRb*, Retinoblastoma) hücrenin S fazına girip girmeyeceğini belirlemede rol oynamaktadır (Hartwell ve Kastan 1994; Vermeulen ve diğ., 2003a). *pRb* az fosforillendiği takdirde E2F transkripsiyon faktörünü bağlayıp, inaktifleştirmektedir (Weinberg, 1995; Kearns ve Liu, 2001; Dyson, 2002). E2F faktörünün inaktifleşmesi ile hücre S fazına girememekte ve hücre siklusu durmaktadır. G_0 fazındaki hücreler büyüme sinyali aldıklarında az fosforillenmiş *pRb* G_1 fazı sonuna doğru siklin/CDK bileşimini oluşturmakta ve oluşan bu yapı pRb proteinini fosforillemektedir (Weinberg, 1995; Kearns ve Liu, 2001; Vermeulen ve diğ., 2003a). Fosforillenen pRb proteininden E2F salınarak, S fazına geçiş için gerekli genlerin transkripsiyonu sağlanmaktadır (King, 1996; Fearson, 1997; Molinari, 2000; Giacinti ve Giordano, 2006; Foster, 2008). Büyüme faktörlerinin olmadığı durumda ise, hücredeki siklin düzeyleri hızlıca düşmektedir. Bu durumda hücreler G_1 fazından S fazına geçemeyip G_0 fazına girmektedirler.

S fazına giren hücrede, DNA sentezi gerçekleşmektedir. Siklin A/CDK2 yapısı DNA sentezini başlatmakta ve S fazının ilerlemesini sağlamaktadır (Arata ve diğ., 2000). DNA sentezi sırasında sarmalın birbirinden ayrılması ile DNA hasarlara karşı çok duyarlı hale geldiğinden S fazı diğer fazlara göre daha hızlı geçilmektedir (Zong ve Thompson, 2006). Bu fazda hücrenin bir diğer faza geçmesi pRb proteininin fosforillenmesi ile belirlenmektedir (Kirsch ve Kastan, 1998).

DNA hasarı ya da nükleotid eksilmesi gibi, DNA replikasyonunu tehdit eden şartlar altında, S fazı kontrol noktası devreye girmektedir (Painter ve Young, 1980; Branzei ve Foiani, 2007; Paulsen ve Cimprich, 2007; Tourrière ve Pasero, 2007). DNA'da oluşan hasarı DNA pol ϵ , hücre çekirdeği antijeni (PCNA) ve replikasyon faktörü C (RFC) proteinleri tespit etmektedir. Bu kontrol noktasında siklin A/CDK2 bileşimi görev yapmaktadır.

Hücreler S fazında DNA sentezi yaptıktan sonra, G₂ fazına girmektedirler. Bu fazda siklin B/CDK1 bileşiğinin aktivitesi artmakta ve hücrelerin mitoz girişini uyarılmaktadır (Molinari, 2000; Foster, 2008). Oluşan bu bileşiğe Mitozu İlerleten Faktör (MPF) adı da verilmektedir. Bu faktör, G₂ fazından M fazına geçişi sağlamaktadır. Hücre siklusu sırasında siklin B'nin sürekli yapımı ve yıkımı ile MPF aktivitesi kontrol edilmektedir. CDK2'nin aktive olması birçok proteini fosforile etmektedir ve bunun sonucu olarak M fazı başlamaktadır. CDK2 aktivitesi siklin B'nin de yıkımına neden olmaktadır. Proteolitik siklin B yıkımı CDK2'yi inaktive ederek, hücrenin mitozdan çıkması sağlanmaktadır.

Hücrelerin mitoz fazındaki kontrol noktası metafaz/anafaz geçişi sırasında olmaktadır. Bu kontrol noktası iğ iplikleri oluşumunu kontrol etmektedir. Kromozomlar normal olarak hizalanmadığında, sentromerler mikrotübüllere tamamen tutunamadığında ve bunun sonucu olarak eşit bölünmeye hazır olmadığı durumlarda kontrol noktası, mitoz fazını durdurmaktadır. Bu kontrol noktası, anafaz ilerletici bileşik/siklozom (APC/C) tarafından düzenlenmektedir (Musacchio ve Edward, 2007).

2.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CKI/CDKI)

Hücre siklusunun düzenlenmesinde hücre siklusunu engelleyen sinyaller de rol oynamaktadır. Hücre siklusunu engelleyerek düzenleyen CKI proteinleri, görevlerini siklin aktivitesini kontrol ederek yerine getirmektedirler. Bu proteinler, siklin/CDK yapısının oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe etmektedirler.

Etkiledikleri mekanizmaya ve yapılarına göre, omurgalılarda iki farklı CKI ailesi bulunmaktadır.

1. Cip/Kip ailesi
2. INK4 ailesi

Cip/Kip ailesi inhibitörleri, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} ve p57^{KIP2} üyelerinden oluşmaktadır. Cip/Kip inhibitörleri, amino ucu bulunan CDK inhibitör domainleridir ve yapısal olarak farklı karboksi uçlu domainler bulundurmaktadır. Bu ailenin üyeleri, hücre siklusunun inhibisyonunu siklin/CDK yapısını inhibe ederek gerçekleştirmektedirler.

Bir diğer inhibitör ailesi olan INK4 ailesinde, p15, p16, p18 ve p19 üyeleri bulunmaktadır. INK4 ailesi üyeleri, hedef kinazın katalitik olmayan ucuna bağlanarak hücre siklusunu durdurmaktadırlar (Russo ve diğ., 1998; Brotherton ve diğ., 1998). INK4 ailesi üyeleri spesifik olarak CDK4 ve CDK6'yı bağlamaktadır (Clurman ve Porter, 1998).

CKI sentezi, bölünmekte olan bir hücrenin durmasına neden olmak için yapılmaktadır. Kontrol noktasındaki DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunu durdurmakta ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırmaktadır.

Memelilerde örnek teşkil eden CKI, p21'dir. p53, radyasyon ya da ilaç nedeniyle hücrenin strese maruz kalarak DNA hasarı olduğu durumlarda, hücre cevabı olarak üretilmektedir. G₁ fazında DNA hasarı olması durumunda siklin D/CDK4/6 ve siklin E/CDK2 bileşiklerini inaktive eden sinyal kaskadı başlamaktadır. Bunun için iki belirgin mekanizma bulunmaktadır (Iliakis ve diğ., 2003; Lukas ve diğ., 2004). Bunlardan biri p53 fosforilasyonu, diğeri ise Ataxia Telegiectasia mutant kinaz (ATM) ve p53'ün negatif düzenleyicisi MDM2 ve CHK2, p53 aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücrede p53 düzeyinin artması ve aktive olması, p21'in aktivasyonuna neden olarak p53 bağımlı yoldan G₁ fazının durmasını sağlamaktadır (Dulic ve diğ., 1994). p21 proteininin aktivasyonu G₁ fazında yer alan CDK'lara bağlanmasına ve CDK'ların inaktivasyonuna yol açmaktadır. p21, hücre siklusunda genotoksik stres karşısında p53 cevabı olması dışında, direkt olarak da DNA replikasyonunu engelleyebilmektedir. p21, çoğalmakta olan hücrelerde DNA polimeraz γ 'nın alt ünitesi olan PCNA bağlanmaktadır. Bunun sonucu olarak da p21, CDK'yı önlemekte ve S fazındaki

hücrelerde DNA replikasyonunu direkt olarak engelleyerek hücre siklusunu durdurmaktadır.

Ekstraselüler inhibitör olan transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), epitel hücrelerinin birçok tipinde hücreleri G₁ fazında durdurarak hücre siklusunu inhibe etmektedir. Bu fonksiyonunu CDK inhibitörlerinden p15 ve p27'nin indüksiyonu ve siklin D/CDK4 bileşiğine bağlanarak gerçekleştirmektedir (Nagahara ve diğ., 1999; Donovan ve diğ., 2002). CDK4 aktivitesinin yok olması sonucunda, pRb fosforilasyonu bloke olmakta ve hücre siklusu G₁ fazında durmaktadır (Khleif ve diğ., 1996).

INK4 ailesi üyelerinden olan p16, CDK4'e bağlanmaktadır. Siklin D/CDK4 bileşiğinin katalitik aktivitesini inhibe etmekte ve böylece negatif hücre siklus regülatörü olarak görev yapmaktadır (Bodner-Adler ve diğ., 2005).

2.2. GAMA RADYASYONU

Radyasyon, atom içerisinde proton ve nötron oranının dengesiz olduğu durumlarda ortaya çıkan kararsız atomların kararlı hale geçmek için sürekli yaptıkları ışımlar olarak tanımlanmaktadır. 1895 yılında Wilhelm Conrad Röntgen'in X ışınını bulmasıyla başlayan süreç sonunda, günümüzde radyasyon, arkeolojiden tıp alanına kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır (Hall, 1998).

Radyoterapi olarak bilinen radyasyon tedavisi, kanser tedavilerinde oldukça sık kullanılmaktadır. Buradaki amaç kanser hücrelerini maksimum derecede öldürerek tümörleri küçültmektir. Bu nedenle X ışınları, gama ışınları ve yüklü parçacıklar gibi yüksek enerjili iyonizan radyasyon çeşitleri kullanılmaktadır.

Radyoterapideki diğer bir amaç, kanserli hücrelerde DNA hasarına neden olmaktır. Radyoterapi ile DNA sarmalında kırıklara neden olarak doğrudan (Hall, 1988) ya da serbest radikaller oluşturarak dolaylı yoldan DNA'ya zarar verilebilmektedir. DNA'sı onarılamayan hücreler bölünmelerini durdurarak ölmekte ve vücuttan uzaklaştırılmaktadırlar.

Radyoterapi günümüzde eksternal (dıştan) tedavi, brakiterapi (yakından tedavi) ve sistemik selektif radyoterapi olmak üzere üç şekilde uygulanmaktadır.

Eksternal tedavide, X ışını ya da gama radyasyonu gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. X ışını, elektron ışınlarının deşarj tüpüne çarpması sonucu meydana gelmektedir. Gama radyasyonu ise Cs-137 ya da Co-60 gibi radyoaktif kaynaklar kullanılarak elde edilmektedir.

Gama radyasyonu, yüksek enerjili bunun sonucu olarak da giriciliği fazla olan bir radyasyon çeşitidir. Hücre içindeki en büyük etkisini DNA üzerinde meydana getirmektedir. Bunu DNA'yı doğrudan ya da dolaylı yoldan etkileyerek gerçekleştirmektedir. Gama radyasyonu DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına, mutasyonlara ve kromozomal anormalliklere sebep olmaktadır (Natarajan, 2002). Ayrıca gama radyasyonu organik moleküller olan protein ve enzimlerin oksidasyonunu sağlayarak ya da kimyasal yapılarında hasar meydana getirerek inaktivasyonlarına neden olabilmektedir (Kula ve diğ., 1999; Nagar ve diğ., 2003).

2.2.1. Gama Radyasyonunun Hücre Siklusu zerine Etkisi

Gama radyasyonu biyolojik moleküllerle reaksiyona girdiğinde reaktif moleküller oluşturmaktadır. Bunun sonucu olarak hücrelerin DNA'sında hasarlar meydana gelmektedir. Hücreler 1 Gy radyasyona maruz kaldıklarında, DNA bazlarında ~1000'den fazla hasar, ~1000 adet tek zincir kırığı ve ~20-40 adet çift zincir kırığı

meydana gelmektedir. DNA'nın bu hedef olma özelliğinden dolayı, hücreler ve organizmalar DNA'yı içten (örneğin oksidasyon ve alkalizasyon) ve dıştan (örneğin ilaçlar ve iyonizan radyasyon) meydana gelebilecek saldırılara karşı korumak ve DNA bütünlüğünün devam etmesini sağlamak için çeşitli süreç ve mekanizmalar oluşturmaktadır. Bu süreç, DNA'nın değişik ajanlar tarafından hasarına karşılık, değişik DNA tamir mekanizmalarını da içermektedir. Özelleşmiş tamir mekanizmaları bazlarda bulunan baz çıkartma onarımı (BER), tek zincir kırığında tek zincir kırığı onarımı (SSBR) ve çift zincir kırıklarında homolog rekombinant (HR) ve homolog olmayan uçların bağlanması (NHEJ) meydana gelen hasarları belirlemekte ve tamir etmektedir (Joiner ve Van der Kogel,2009).

DNA hasarına yanıt mekanizmaları (DDR), radyasyonun neden olduğu DNA hasarının hücresel sonucunu belirleyen oldukça karmaşık ve koordine bir sistemdir. Bu sistem, DNA hasarı algılayıcıları ve hasar yanıtının efektörleri olarak iki bölüme ayrılmaktadır. Algılayıcılar, genomu hasar olup olmadığına dair aktif olarak inceleyen proteinler grubudur. Bu proteinler hasar durumunda sinyal vermekte ve hücre efektör yollardan birine gitmektedir. Bu yollar, hasarlı hücreleri ölüm sürecine götüren programlanmış hücre ölümü, DNA kırıklarını fiziksel olarak tamir eden DNA tamir mekanizmaları ve hücre siklusunu geçici ya da kalıcı olarak durduran hücre siklusu kontrol noktalarıdır.

Hücre siklusu kontrol noktaları DDR'nin önemli efektör yollarından birisidir. İyonizan radyasyona maruz kalan hücrelerde G_1 , S ve G_2 fazlarında gecikmeler meydana gelmektedir (Kastan ve Bartek, 2004). Bu gecikmeler hücre siklusu kontrol noktaları sayesinde oluşmaktadır.

G_1/S kontrol noktası, radyasyon uygulamasından ancak birkaç saat sonra tamamen başlatılmaktadır, bu da birçok hücrenin tamir edilmemiş çift zincir kırıkları ve başka hasarlar ile S fazına girmesine neden olmaktadır. Hücreler G_1 fazının ortasında ya da sonlarına doğru radyasyona maruz kaldıklarında, hücrelerin S fazına girişi 4-6 saate

kadar devam etmektedir (Gadbois ve Lehnert, 1997; Linke ve diğ., 1997; Cann ve Hicks, 2006; Deckbar ve diğ., 2011). Radyasyona maruz kalımdan sonraki 4-6 saat içerisinde yüksek radyasyon dozlarında bile sadece S fazına girişte yavaşlama olduğu görülmüştür. Bunun nedeni CHK2/CDC25 ve p53/p21 yolları arasındaki hassasiyet farkı, sınırlama noktasının arkasında ve önündeki hücrelerin ayrı hassaslıkta olması ve pRb tam fosforilasyona ulaştığı noktadan sonra hücrelerin S fazına giriş zamanındaki farklılıklar olabileceği düşünülmektedir (Deckbar ve diğ., 2011).

İyonizan radyasyon, G₁/S kontrol noktasını tetiklemek ile birlikte, S fazını da yavaşlatmakta ve G₂ ilerleyişini durdurmaktadır. S fazını yavaşlama nedeni, hücrelerin mitoz fazına girmeden önce kromozom hasarlarını tamir etmesini sağlamak için gerekli zamanı vermektir (Hartwell ve Weinert, 1989; Murray, 1992; Elledge, 1996).

G₂/M kontrol noktası, anlık olarak hasarlı hücreleri yakalamakta ve tamir için zaman sağlamaktadır. Ancak tamir olmamış çift zincir kırıklarının olduğu durumlarda hücre siklusuna tam olarak engel olamamaktadır. Bu da hücrelerin kayda değer miktarda çift zincir kırığı ile mitoz fazına girmesine neden olmaktadır. Bu yüzden, G₁/S kontrol noktasının tersine G₂/M kontrol noktası hızlıca aktive edilmesine rağmen, G₂/M kontrol noktası doğasından gelen duyarsızlığa sahiptir (Deckbar ve diğ., 2011).

2.3. HİPOBARİK STRES

Hipobarik stresin hücrelerde meydana getirdiği hipobarik hipoksi, vücut hücre ve dokularında atmosferik basınca bağlı düşük oksijen varlığı olarak tanımlanmaktadır.

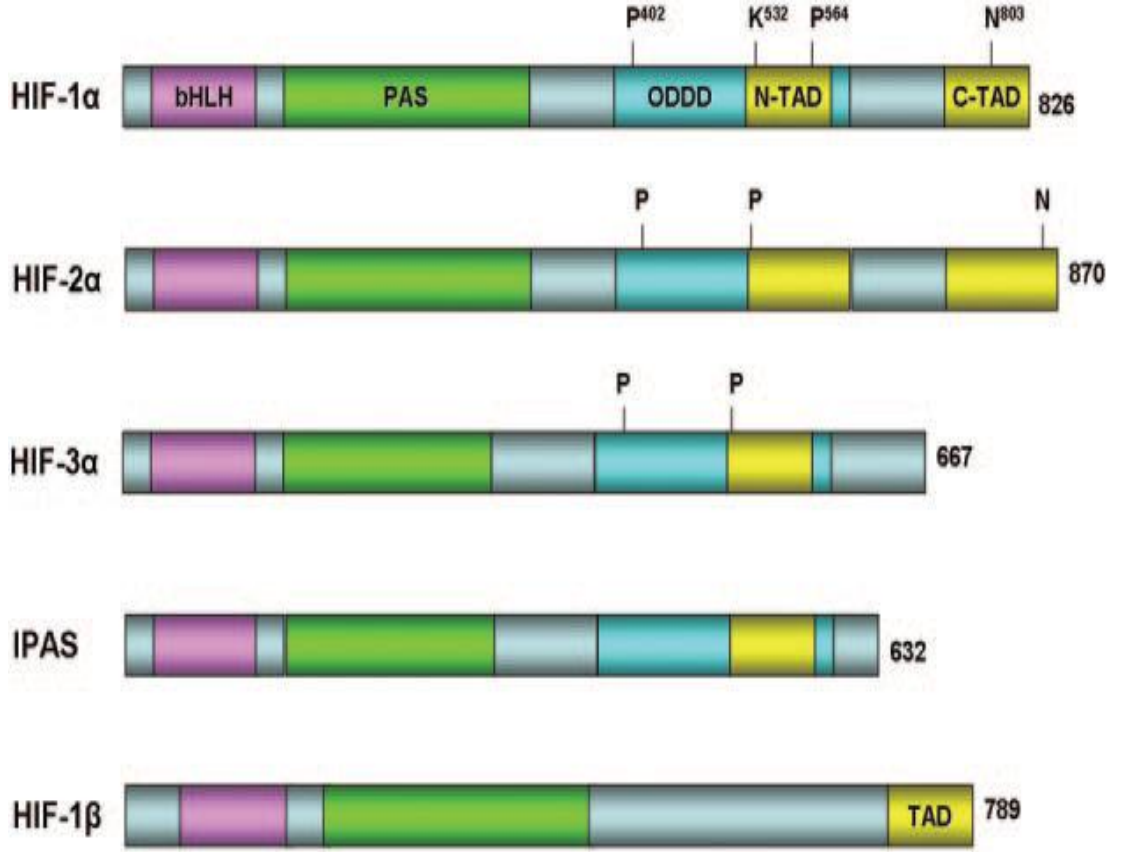
Moleküler oksijen çok hücreli organizmaların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olmaktadır. Memelilerde doku düzeyinde oksijen dengesini korumak için moleküler oksijenin yakalanma, bağlanma, taşınma ve iletimini sağlamak için gelişmiş bir fizyolojik ağ bulunmaktadır. Hücre ve dokular DNA replikasyonu için oksijene ihtiyaç

duymaktadırlar (Green ve Giaccia, 1998). Nükleozid biyosentezinde moleküler oksijene ihtiyaç duyan iki kritik enzim bulunmaktadır. Bunlar ribonükleotid redüktaz ve dihidroorotat dehidrogenaz enzimleridir. Bu enzimlerin hipoksik koşullar altında inaktive olması, DNA sentezi için deoksinükleotid öncüllerinin eksikliğine neden olmakta ve sonuç olarak DNA replikasyonu durmaktadır. Nükleotid eksikliğinin neden olduğu, hipoksi ile uyarılmış hücre siklusu durmasının karmaşık sonuçları bulunmaktadır. Eksojen nükleozidlerin ya da deoksinükleozidlerin eklenmesi S fazına girişe ve hipoksik hücrelerde replikonun başlamasına neden olmakta ve hücre siklusu boyunca normal ilerlemeye izin vermemektedir (Loffler, 1985; Loffler 1987; Probst ve diğ., 1989; Loffler, 1992). Hipoksik koşullar altında bu nükleotid dengesizliği replikasyon inhibisyonunda rol oynamaktadır.

Hipobarik hipoksinin, oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir (Vats ve diğ., 2008). Hücreler maruz kaldıkları hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilmekte, tolere edemedikleri durumlarda antioksidan enzim sistemlerini aktive etmektedirler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olamadığı durumlarda, reaktif oksijen türevleri (ROS) miktarının arttığı ve bunun da oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Jayalakshmi ve diğ., 2005; Ramanathan ve diğ., 2005; Maiti ve diğ., 2006). Dolayısıyla oksidatif hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücrel makromoleküller zarar görmektedir (Gutteridge, 1994; Halliwell ve Whiteman, 2004; Berger, 2005; Halliwell ve Gutteridge, 2007; Wildburger ve diğ., 2009; Zádák ve diğ., 2009).

Hipoksik koşullara moleküler cevap, hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1) olarak bilinen transkripsiyon faktörünün stabilizasyonu ve aktivasyonu ile verilmektedir (Wang ve Semenza, 1993). HIF-1, normoksiden (~%21 O₂) hipoksiye (~%1 O₂) hücrelerin ve tüm organizmanın adaptasyonunu ve hayatta kalmasını kolaylaştıran genlerin indüksiyonuna neden olan anahtar düzenleyici olarak tanımlanmaktadır (Wang ve diğ., 1995; Semenza, 1998).

Hipoksinin hücre biyolojisi ve memeli fizyolojisi üzerinde gen anlatımı aracılığı ile kuvvetli bir etkisinin olduğunun bilinmesinden dolayı, HIF-1'in yolağı ve hastalıklarda oynadığı roller önem kazanmaktadır. HIF-1, hipoksi yanıt elementi olarak bilinmektedir (HRE; 5'-RCGTG-3'). Hipoksik koşullar altında HRE'ye bağlanan HIF-1 proteini, hipoksik olarak uyarılabilen HIF-1 α alt birimini ve temel olarak anlatımı yapılan HIF-1 β alt birimini içeren heterodimerik bir bileşik olarak tanımlanmaktadır (Wang ve diğ., 1995). Ayrıca HIF-1 β aslen aril hidrokarbon reseptörüne bağlanan partner olarak tanımlanan, aril hidrokarbon nüklear yer değıştirici (ARNT) olarak da bilinmektedir (Reyes ve diğ., 1992). HIF-1 α ve HIF-1 β proteinlerinin, basit heliks-loop-heliks-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) protein ailesine ait olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.5) (Wang ve diğ., 1995). HIF-1'in klonlanmasından kısa bir süre sonra, çok yakından ilişkili olan HIF-2 proteini (endotel Per-ARNT-Sim (PAS) proteini, HIF-benzeri faktör (HLF), HIF-ilişkili faktör (HRF) ve PAS süper aile 2 üyesi (MOP2) olarak da isimlendirilmektedir) tanımlanmış ve klonlanmıştır (Ema ve diğ., 1997; Flamme ve diğ., 1997; Hogenesch ve diğ., 1997; Tian ve diğ., 1997). HIF-2 α , HIF-1 ile amino asit dizisinin %48'ini paylaşmakta ve ayrıca HIF-1 ile heterodimerizasyon ve HRE'lere bağlanmak gibi yapısal ve biyokimyasal benzerlikleri de bulunmaktadır.



Şekil 2.5: HIF protein türevlerinin homolojisi (Ke ve Costa, 2006).

Daha sonra keşfedilmiş olan HIF-3 α , çeşitli dokularda anlatımı yapılan, HIF-1 β ile dimer oluşturan ve HRE'lere bağlanan protein olarak tanımlanmaktadır (Gu ve diğ., 1998). Buna ek olarak, HIF-3 α 'nın birbirine uç uca eklenerek farklı yapısını oluşturan PAS inhibitörünün (IPAS), serebellum ve korneal epitelin Purkinje hücrelerinde dominant olarak anlatımı yapılmaktadır. IPAS, endojen transaktivatör etkisine sahip değildir, HIF-1 α 'nın amino uçlu bölgesi ile etkileşime girmekte ve HIF-1'in negatif dominant düzenleyici rolünü oynayarak DNA'ya bağlanmasına engel olmaktadır (Makino ve diğ., 2001). Bununla birlikte IPAS kalp ve akciğerde hipoksi ile uyarılabilmekte ve bu dokularda HIF-1 için negatif geribildirim döngüsüne katkıda bulunmaktadır (Makino ve diğ., 2002).

Hipoksi ve HIF-1, insülin benzeri büyüme faktör-2 (IGF2) ve transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerini uyarmaktadır (Feldser ve diğ., 1999;

Krishnamachary ve diğ., 2003). Bu tip büyüme faktörlerinin aynı türden reseptörlere bağlanması hücrenin çoğalması/hayatta kalmasına ve HIF-1 α 'nın kendiliğinden anlatımını teşvik eden sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Semenza, 2003).

Ancak, çelişkili bir biçimde, hücrenin hipoksiye adapte olması sadece hücre çoğalması/hayatta kalmasına değil, bazı durumlarda da hücrenin ölümüne neden olmaktadır. HIF-1'in, karmaşık rollerde görev alarak hipoksik koşullarda apoptozu teşvik ettiği düşünülmektedir. Düşük oksijen koşullarında yapılan genetik çalışmalarda, HIF-1 α bulunmayan embriyonik kök hücreleri yabancı tip ile karşılaştırdıklarında, HIF-1 α bulunmayan hücrelerde apoptozun düşük olduğu bilinmektedir (Carmeliet ve diğ., 1998). Hipoksik koşullar altında kaspaz-3 ve apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (APAF-1) bağımlı kaspaz-9'un aktive olması ve sitokrom c'nin salınımı, bazı hücre tiplerinde görülmektedir (Brunelle ve Chandel, 2002; McClintock ve diğ., 2002). Ayrıca HIF-1 α ve HIF-1 β ekspresyonunun kaspaz-3, Fas ve Fas ligand gibi proapoptotik faktörler ve apoptoz ile önemli ölçüde ilişkisi bulunmaktadır (Volm ve Koomagi, 2000). Hücre siklusunun kontrolünde görevli olan p53 ve p21 gibi genlerin de HIF-bağımlı olduğu bilinmektedir (Carmeliet ve diğ., 1998). Bununla birlikte p53'ün *Bax*, *NOXA*, *PUMA* ve *PERP* gibi apoptozla bağlantılı genleri uyararak hipoksi ile uyarılmış apoptozu düzenleyici rolü olduğu da ortaya konmuştur (Schuler ve Green, 2001).

2.3.1. Hipobarik Stres Koşullarının Hücre Siklusuna Etkisi

Tümörlerde, hücreler çeşitli düzeylerde oksijen miktarlarına maruz kalmaktadırlar. Yapılan *in vitro* çalışmalar, hücrelerin oksijen konsantrasyonuna ve hipoksiye maruz kalma sürelerine bağlı olarak, hücre bölünmelerini yavaşlatmakta ya da apoptotik sürecin başlatılmasıyla ölmekte olduğunu göstermektedir. Örneğin aşırı hipoksik koşullarda (%0,02 O₂ konsantrasyonu) yabancı tip p53 eksprese eden hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir (Amellem ve Pettersen, 1991). %1-2 oksijenli koşullar orta dereceli hipoksik koşullar sayılmaktadır. Bu seviyedeki hipokside, hücreler hipoksik uygulama sırasında canlı kalabilmekte ve hücre siklusunu kontrol eden moleküllerdeki özelleşmiş biyokimyasal değişiklikler gözlenebilmektedir (Zygmunt ve diğ., 2002).

Düşük oksijen koşullarının, birçok hücre tipinde hücre siklusunun durmasına neden olduğu bildirilmiştir (Heacock ve Sutherland, 1990; Amellem ve Pettersen, 1991; Graeber ve diğ., 1994).

Şiddetli hipoksiye maruz kalmış hücrelerde hücre siklusu G_1 fazı ya da S fazının erken evrelerinde durdurulmaktadır. Hipoksinin çok şiddetli olmadığı durumlarda ise S fazının geç evresinde, G_2 ya da mitoz fazındaki hücreler hücre siklusunu tamamlamakta ve hücre siklusunun G_1 fazında durdurulmaktadır (Amellem ve Pettersen, 1991). Hipoksiye maruz kalmış hücrelerde, CDK4 ve CDK2 kinaz aktivitelerinin seviyesinde bir azalma olduğu bilinmektedir (Krtolica ve diğ., 1999). Hipoksi sırasında CKI ailesi üyelerinden p27 proteinin seviyesinde yükselme meydana gelmekte ve bunun hücrelerin hücre sikluslarının hipoksiye bağlı olarak G_1/S geçişinde durmasının nedeni olduğu öne sürülmektedir (Gardner ve diğ., 2001). Ancak kanıtlar p27'nin hipoksik yakalanma için gerekli olmadığını da göstermiştir (Green ve diğ., 2001).

Hipoksi ile uyarılmış hücre siklusunun durdurulması olayının, pRb proteininin hipofosforile olması ile meydana geldiği bildirilmiştir (Amellem ve diğ., 1996; Krtolica ve diğ., 1998). Bunun, hipoksi ile uyarılmış apoptozun tersine, p53 indüksiyonundan bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmektedir (Graeber ve diğ., 1994; Schmaltz ve diğ., 1998). G_1/S fazı geçişinde, pRb proteininin özgün siklin/CDK bileşiği tarafından fosforillenmesi gerekmektedir (Plana-Silva ve Weinberg, 1997). Daha önce yapılan çalışmalarda hipoksinin hem transforme olmuş hem de olmamış hücrelerde hipofosforile olmuş pRb'nin biriktiği gösterilmiştir (Ludlow ve diğ., 1993; Krtolica ve diğ., 1996). pRb'nin bu aktivitesi CDK2'nin inhibisyonu ve CDK4'ün aktivitesi ile birlikte meydana gelmekte ve protein fosfataz 1 (PP1) aktivitesi pRb doğrultusunda artmaktadır. CDK aktivitesi, p27 ve p21 gibi CKI'lar tarafından inhibe edilirken, pRb hipofosforilasyonunu arttırmaktadır. Hipofosforile olan pRb proteini hipoksik koşullar altında hücre siklusunun durmasını sağlamaktadır. Ancak hücre siklusunun düzenlenmesinde HIF-1 α 'nın direk rolü, pRb proteininin hipoksik hipofosforilasyonuna neden olan olaylar ve hipoksiyle uyarılmış G_1 yakalanmasında

pRb proteininin fosforilasyon durumunun ilgisi tam olarak bilinmemektedir (Carmeliet ve diğ., 1998; Iyer ve diğ., 1998).

Hipoksik durumda CDK2' nin inhibisyonu p27'nin artması ve bunun CDK2 ile olan ilişkisiyle olduğu gösterilmiştir (Krtolica ve diğ., 1998; Gardner ve diğ., 2001; Zygumt ve diğ., 2002). Ancak, hipoksik koşullarda CDK4 inhibisyonunun mekanizması henüz bilinmemektedir. Hipoksik hücrelerde CDK4 aktivitesinin inhibisyonunun p16 anlatımının artması ile olabileceği ve hipoksik hücrelerde gözlenen CDK4 enzimi ile ilgili olabileceği düşünölmektedir (Zygumt ve diğ., 2002).

Bazı hücre hatlarında, hipoksik koşullarda CKI'ların PI3K/Akt yolağına bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Box ve Demetrick, 2004). HIF-1 ekspresyonunun hücrelerde azalması, Akt yolağının hipoksik inaktivasyonuna dayandırılmaktadır. Hipoksiye bağlı Akt yolağının aşağı regölasyonunun nasıl olduğu bilinmemekte bununla birlikte fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) gibi Akt'nin yukarı regölasyonunu sağlayan regölatorlerin neden olduğu düşünölmektedir (Zundel ve diğ., 2000). Hipoksi ile uyarılmış hücre siklusunun durdurulmasına karşı dayanıklılığın ve hipoksiye bağımlı olarak azalan p21 ve INK4 proteinlerinin, anormal olarak artış gösteren PI3K/Akt yolağının aktivitesi ile ilgili olabileceği düşünölmektedir. Böyle hipoksiye karşı dirençli fenotiplerin kanser hücrelerinde p53 için önerilene benzer bir şekilde, düzensiz PTEN işlevi ile de seçilebileceği tahmininde bulunmaktadır (Graeber ve diğ., 1996).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanmış HeLa hücre soyunda meydana gelen sitotoksik etkinin ve CDK genlerinin rollerinin hücresel ve moleküler bazda gösterilmesi amaçlandı. Belirlenen doz ve sürede uygulanan gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ortaya çıkardığı sitotoksik etki MTT yöntemi ile, CDK genlerinin rolleri ise RT-PCR yöntemi ile araştırıldı. Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler faz kontrast mikroskobu ve Giemsa boyama ile ışık mikroskopunda görüntülendi.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

Eagle tuzları ve L-glutamin içeren, sodyum bikarbonat bulundurmayan Minimum Essential Medium (MEM, Sigma) distile su içerisinde çözündürüldü. İçerisine 100 µg/ml streptomisin ile 100 IU/ml penisilin (Multicell, Wisent Products) eklenerek 0,22 µm filtreden (Millipore) geçirildi. Hazırlanan stok besiyerleri, +4 °C' de saklandı.

3.2. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneylemizde kullanılan tümöral hücre soyu, laboratuvarımıza Tokyo Teknoloji Enstitüsü tarafından temin edilen, insan serviks karsinomu kökenli HeLa (CCL-2) hücreleridir. Haftada iki kez laboratuvarımızda düzenli pasajı yapılan bu hücrelerin standart doku kültürü besiyerine, %10 Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco Lab.) eklenerek ve pH'sı %4,4' lük NaHCO₃ ile 7,2' ye ayarlanarak 25 cm²' lik steril kültür kaplarında, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli atmosferde, 37 °C de tek tabaka kültür olacak şekilde inkübasyonları gerçekleştirildi.

3.3. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

HeLa hücreleri, yetiştirildikleri kültür kapları içerisinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde pasaj işlemine başlandı. Hücrelerin buldukları yüzeyden kaldırılması amacı ile 3 ml tripsin ile 3 dakika inkübe edildi. Süspanse edilen hücreler buldukları kültür kabından toplanarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine tripsini inaktive etmek amacıyla 3 ml besiyeri eklendi. 500 xg dönme hızında 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Çöken hücrelerdeki süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Deney için gerekli hücre sayıları hesaplanıp, besiyeri ile sulandırma yapılarak, her deney için daha önce belirlenen optimum sayıda hücre ekildi.

3.4. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Hücrelerin ekim işlemleri, sitotoksosite deneyi için, 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta 20 000 hücre; moleküler analiz için, 12 kuyucuklu kültür kaplarına 50 000 hücre/ml; Giemsa boyama için 12 kuyucuklu lamelli kültür kaplarına kuyucuk başına 50 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler ekim işleminden sonra %5 CO₂ ve %95 hava karışımı içeren etüv içerisinde, 37 °C de pH 7,2 de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

3.5. GAMA RADYASYONU DOZUNUN BELİRLENMESİ

Deneylerde kullanılacak %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) dozunun belirlenmesi amacıyla, hücrelere 2, 8, 16, 32 ve 64 Gy olmak üzere 5 farklı doz uygulandı. Her doz için 0 ve 24 saat inkübasyon süresi olacak şekilde 2 tane deney grubu oluşturuldu. Uygulamadan önce hücrelerin içinde bulunduğu bütün kuyucuklar tamamen kültür medyumu ile dolduruldu. Gama radyasyonu kaynağı olarak Co-60 (Co-60 t_{1/2}: 5,27 yıl; Cirrus, CGR CisBio, Kanada) kullanıldı (Şekil 3.1). İlk ışınlamada (07/11/2012) 32 Gy'lik gama radyasyonu 13,84 dakika verildi (Aktivitesi: 101,2 cGy/dk). Diğer ışınlama dozları bu değere göre kalibre edildi. Sonraki ışınlamalarda kaynağın aktivitesindeki bozunma göz önüne alınarak ışınlama zamanlarında istenilen dozlara ulaşılabilecek düzenlemeler yapıldı. Uygulama sırasında kültür kaplarının altına insan dokusu eş değeri 0,5 cm RW-3 katı fantom, üstüne kültür kabının şeklini alması için 0,5 cm bollus konuldu. Bütün dozlar izosentrik olarak uygulandı.



Şekil 3.1: CiruS Co-60 gama radyasyonu cihazı.

Gama radyasyonu uygulaması sonrasında, 0 saat deney grubu değerlendirilmeye alınırken, diğer deney grubu için hücrelerin besiyerleri ışınlamadan hemen sonra değiştirilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından bu deney grubu değerlendirmeye alındı.

Çalışmamızdaki tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak en az 3 kere tekrarlandı.

3.6. GAMA RADYASYONU UYGULAMASI

Gama radyasyonu uygulaması, hücreler kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra gerçekleştirildi. HeLa hücreleri için belirlenen 32 Gy IC₅₀ dozu, izosentrik olarak uygulandı. Uygulama esnasında SSD (kaynak yüzey mesafesi), 96 kuyucuklu kültür kapları için 78,75 cm; 12 kuyucuklu kültür kapları için 78,5 cm olarak belirlendi.

Belirlenen doz olan 32 Gy için, 0 ve 24 saat inkübasyon süresi olmak üzere 2 deney grubu belirlendi. Bu süreler sonunda besiyerleri uzaklaştırılarak analizler gerçekleştirildi.

3.7. HİPOBARİK STRES KOŞULLARININ UYGULANMASI

Hipobarik stres koşulları, gama radyasyonu uygulamasından 24 saat sonra, özel hazırlanmış kabinde (Uzay Simülator Sistemleri, Nanovak) %2 O₂ ve %98 N olacak şekilde ayarlanan koşullar altında gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Fraksiyonel hipobarik stres koşulları daha önce yapılmış bir çalışmada belirlenmiş şekilde 24 saat aralıkla, 3 saat olmak üzere 2 kere uygulandı (Özcan Arıcan ve diğ., 2012).

Hipobarik stres koşullarının uygulanmasının hemen ardından, besiyerleri uzaklaştırılarak analizler gerçekleştirildi.



Şekil 3.2: Hipobarik kabin.

3.8. SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının uygulanmasının ardından HeLa hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin temel prensibi, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri ile suda çözülebilen sarı bir bileşik olan MTT tuzunun, suda çözünmeyen mavi renkli formazan kristallerine dönüşmesine dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi, canlı hücrelerin sayısı arttıkça artmaktadır. Bu nedenle, oluşan formazan kristalleri hücre kültüründe canlı olan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır (Mosmann, 1983).

96 kuyucuklu hücre kaplarına ekilen hücrelerin üzerindeki besiyeri, belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda uzaklaştırıldı. Bütün kuyucuklara fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Multicell, Wisent Products) içinde çözdürülen MTT (Biomatik, Kat.No:A3338) solüsyonundan 40 µl eklendi ve nemli atmosferde 4 saat süresince 37 °C de, %5 CO₂ içeren ortamda ışık almayacak şekilde inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuğa 160 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek bir gece inkübasyona bırakıldı. Deney gruplarının absorbans değerleri, 690 nm dalga boyu referans alınarak, 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede (µQuant, Bio-tek) ölçüldü (Kurashige ve diğ., 1999).

3.9. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.9.1. Faz Kontrast Mikroskobu

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının uygulanmasının ardından meydana gelen morfolojik değişiklikler, 0 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda faz kontrast mikroskopuyla x200'lik büyütmelemlerle incelendi. Uygulamalara ve zamana bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişiklikler görüntülendi.

3.9.2. Işık Mikroskobu

HeLa hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişimleri gözlemlemek amacı ile 0 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda hazırlanan preparatlara Giemsa boyama yapıldı (Ilgar ve Özcan Arıcan, 2009).

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının uygulanmasının ardından belirlenen sürelerin sonunda hazırlanan preparatlar Carnoy fiksatifisi ile fikse edildi ve 5 dakika Giemsa ile boyandı. Bu süre sonunda boya, saf su ile uzaklaştırılarak preparatlar kurumaya bırakıldı. Boyanmış preparatlar, hücrelerde meydana gelen değişiklikleri saptamak için ışık mikroskopunda incelendi.

3.10. GEN ANLATIMININ İNCELENMESİ

3.10.1. RNA İzolasyonu

0 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda, 32 Gy gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı deney grupları ile kontrol grubundaki hücrelerden, total RNA izolasyon kiti (Fermentas GeneJET RNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Kat. No. K0732) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA'lar, hücre siklusunda görev yapan siklin A, siklin E ve p21 genlerinin anlatımlarının belirlenmesi için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Her bir deney grubu için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 50 000 hücre/ml olacak şekilde, kuyucuk başına toplam 1 ml ekim yapıldı. Kontrol, gama radyasyonu, hipobarik stres, gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stres uygulanan 4 deney grubundaki hücreler, 0 ve 24 saat inkübasyon süresinin ardından tripsin ile kaldırılarak steril santrifüj tüplerine alındı. 500 xg dönme hızında 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 0,6 ml RNA lizis solüsyonu ile β -Merkaptoetanol (her bir 1 ml RNA lizis solüsyonu için 20 μ l) eklendi. Yüksek hızda karıştırılarak homojenizasyon gerçekleştirildi. Her bir tüpe 360 μ l %96'lık etanol eklenerek karıştırıldı. Hücre süspansiyonundan 0,7 ml alınarak, toplama tüplerinin içerisine yerleştirilmiş olan RNA saflaştırma kolonlarına eklendi. Oda sıcaklığında 12000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerinde bulunan kısım atılarak kolon 2 ml'lik yeni toplama tüplerine koyuldu. Saflaştırma kolonlarının üzerine 700 μ l, etanol eklenmiş Yıkama Tamponu I eklendi. 12000 xg'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüpündeki kısım atılarak kolon toplama tüplerine tekrar konuldu. Saflaştırma kolonlarına, etanol eklenmiş Yıkama Tamponu II'den 600 μ l eklendi. Oda sıcaklığında 12000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki kısım atıldı ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Saflaştırma kolonuna 250 μ l Yıkama Tamponu II'den eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika 12000 xg'de santrifüj edildi. Toplama tüpü içindeki sıvı atıldı ve saflaştırma kolonu 1,5 ml'lik RNaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Nükleaz içermeyen su, saflaştırma kolonundaki membranın tam ortasından eklendi ve RNA'nın eldesi için 12000 xg' de 1 dakika santrifüj edildi. Saflaştırma kolonu uzaklaştırıldı ve toplama tüpündeki total RNA miktarı nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.,) kullanılarak belirlendi.

3.10.2. RT-PCR Yöntemi

RT-PCR yöntemi için her bir deney grubuna ait total RNA'lara önce cDNA sentezi yapıldı (Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Fisher Scientific Inc., Kat. No. K1622). Bunun için izole edilen total RNA'dan 5 µg alınarak PCR tüplerine konuldu. 1 µl random heksamer primeri eklendi ve son hacim nükleaz içermeyen su ile 12 µl'ye tamamlandı. Sonrasında 4 µl 5x Reaksiyon karışımı, 1 µl RiboLock RNaz İnhibitörü (20 u/ml), 2 µl 10 mM dNTP karışımı ve 1 µm RevertAid M-MuLV Revers Transkriptaz (200 u/ml) eklenerek son hacim 20 µl yapıldı. Eklenen tüm elemanların karışması için PCR tüpleri 15 saniye santrifüj edildi. Örnekler, Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde cDNA sentezi için programlanan PCR cihazına yerleştirilerek cDNA elde edilmesi sağlandı.

PCR yöntemi için, yeni PCR tüpüne 35,5 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Bunun üzerine 5 µl 10X PCR karışımı, 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 25 mM MgCl₂, 0,5 µl *Taq* DNA polimeraz (5u/µl) (Viva 2-Steps RT-PCR kit with M-MuLV RT/*Taq* DNA Polymerase Vivantis, Kat. No. RTPL12 Kit(2)) konuldu. Daha sonra, hücre siklusunda yer alan siklin A, siklin E ve p21 primerlerinin reverse ve forwardından (Tablo 3.2) 1,5 µl ve daha önce izole edilen her bir deney grubuna ait cDNA'lardan 2 µl ilave edildi. İçeriğin karışması için PCR tüpleri 15 saniye santrifüj edildi.

Örnekler, Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde ön denatürasyon ve PCR amplifikasyonu için programlanan PCR cihazına yerleştirildi. PCR ürünlerini içeren tüpler cihazdan alınarak etidyum bromid içeren agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole (UV) ışık altında gözlemlenerek fotoğraflandı.

Tablo 3.1: cDNA ve RT-PCR için hazırlanan PCR cihazı program tablosu.

cDNA Sentezi	Ön Denatürasyon ve PCR Amplifikasyonu
1 döngü	1 döngü
25 °C'de 5 dakika	94 °C'de 3 dakika
42 °C'de 60 dakika	35 döngü
	Denatürasyon- 94 °C'de 15 saniye
	Bağlanma- 58 °C'de 30 saniye
	Uzatma- 72 °C'de 45 saniye

Tablo 3.2: Primerlerin Nükleotid Dizilimi.

Primer	Nükleotid Dizilimi
NM_001237.3 <i>Homo sapiens</i> Siklin A2(CCNA2), mRNA	Forward: 1 GTC ACC ACA TAC TAT GGA CAT G 22 762.....785 Reverse: 1 AAG TTT TCC TCT CAG CAC TGA C 22 1064.....1043
NM_001238.1 <i>Homo sapiens</i> Siklin E1(CCNE1), mRNA	Forward: 1 CAG CGG AGC AGC CCC ATC 18 166.....183 Reverse: 1 AAA ACG GTC ACG TTT GCC TTC 21 296.....276
NM_000389.4 <i>Homo sapiens</i> CKI 1A (p21.cip1), mRNA	Forward: 1 GTT CCT TGT GGA GCC GGA GC 20 61.....80 Reverse: 1 GGT ACA AGA CAG TGA CAG GTC 21 479.....459

3.10.3. Agaroz Jel Elektroforezi

RT-PCR ürünlerinin yürütülmesi için, %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1,2 gr agaroz tartılarak erlen içine boşaltıldı ve 60 ml 1x Tris-askorbik asit-edta (TAE) tamponu eklenerek mikrodalga fırında çözülmesi sağlandı. 60 °C' ye soğuduktan sonra etidyum bromür eklenerek (jel hacminin %0.02'si kadar), tarak yerleştirilmiş olan jel kasetine boşaltıldı ve donması için 30 dakika beklendi. Jel kaseti, taraklar çıkartıldıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerini geçecek miktarda 1x TAE tamponu eklendi.

İzole edilmiş RT-PCR örneklerinden 8 µl alındı. Üzerine 6x boyama tamponundan 3 µl eklendi ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına uygulandı. Örneklerin boyutlarının belirlenmesi amacıyla DNA markırından (Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific Inc., Kat. No. SM0331) 3µl alındı, 3 µl boyama

tamponu eklenerek pipetaj yapıldı ve jele yüklendi. Elektrotlar bağlanan güç kaynağı 90V'a ayarlanarak 1 saat yürümeye bırakıldı. Sonrasında jel, transillüminatör ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Deney grupları, uygulamalara ve zamana bağlı olarak kontrole ve birbirlerine göre değerlendirildi. Bu amaçla elde edilen değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları Dunnett's testi, grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ seviyesi temel alındı (GraphPad Prism version 6.00, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c).

4. BULGULAR

4.1. IC₅₀ GAMA RADYASYONU DOZUNUN SAPTANMASI

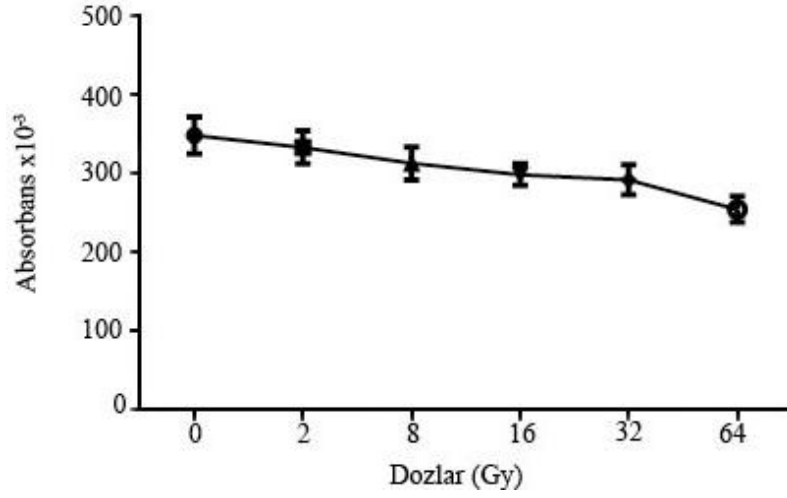
Deneyleerde kullanılacak olan IC₅₀ gama radyasyonu dozunun saptanması amacıyla HeLa hücre kültürlerine 2 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 32 Gy ve 64 Gy radyasyon dozları uygulanarak MTT yöntemi ile 0 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda hücrelerde meydana gelen sitotoksik etki belirlendi. Deney gruplarının ve kontrol gruplarının absorbans değerleri karşılaştırılarak % canlılık grafikleri çizildi. Tüm deney gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analizler ile anlamlılığına bakıldı.

Çeşitli gama radyasyonu dozlarının uygulanmasının ardından 0 saat deney gruplarının absorbans değerleri; kontrol grubu için $349,2 \times 10^{-3}$, 2 Gy için $334,1 \times 10^{-3}$, 8 Gy için $313,8 \times 10^{-3}$, 16 Gy için $299,5 \times 10^{-3}$, 32 Gy için $292,7 \times 10^{-3}$ ve 64 Gy için ise $255,3 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Yapılan istatistiksel analizler sonucu, kontrol grubu ile deney gruplarının hepsi arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). Birbirleri ile karşılaştırılan deney gruplarında, 8 Gy ile 16 Gy arasında ve 16 Gy ile 32 Gy arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$), diğer bütün deney grupları arasında ise anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$).

Tablo 4.1: Çeşitli dozlarda gama radyasyonu uygulanan deney gruplarının 0 saat absorbans ortalaması (A_{ort}) ve standart sapma ($\pm SD$) değerleri.

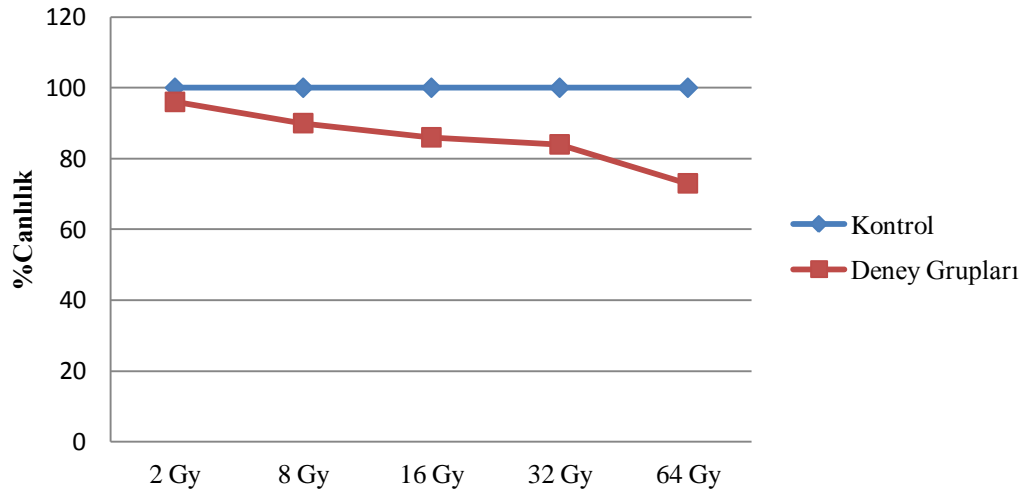
Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)	
	A_{ort}	$\pm SD$
Kontrol	$349,2 \times 10^{-3}$	$\pm 0,02$
2 Gy	$334,1 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
8 Gy	$313,8 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
16 Gy	$299,5 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$
32 Gy	$292,7 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$
64 Gy	$255,3 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$

$p < 0,01$: * (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.1: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 0 saat sitotoksik aktivite değerleri.

0 saat sonunda sitotoksik aktivite değerleri saptanan deney gruplarının % canlılık değerleri, kontrol grubu %100 kabul edilerek her bir deney grubu için hesaplandı. 2 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 32 Gy ve 64 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grupları için sırası ile %96, %90, %86, %84 ve %73 olarak tespit edildi (Şekil 4.2).



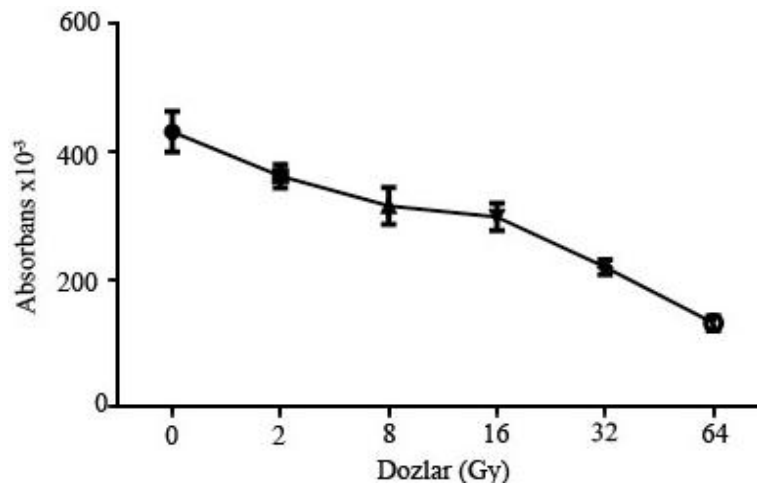
Şekil 4.2: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 0 saat % canlılık değerleri.

Çeşitli gama radyasyonu dozlarının uygulanmasının ardından 24 saat deney gruplarının absorbans değerleri; kontrol grubu için $431,8 \times 10^{-3}$, 2 Gy için $362,1 \times 10^{-3}$, 8 Gy için $315,6 \times 10^{-3}$, 16 Gy için $298,4 \times 10^{-3}$, 32 Gy için $219,6 \times 10^{-3}$ ve 64 Gy için ise $134,4 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.2, Şekil 4.3). Yapılan istatistiksel analizler sonucu, kontrol grubu ile deney gruplarının hepsi arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). Birbirleri ile karşılaştırılan tüm deney grupları arasında da anlamlı fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$).

Tablo 4.2: Çeşitli dozlarda gama radyasyonu uygulanan deney gruplarının 24 saat absorbans ortalama (A_{ort}) ve standart sapma ($\pm SD$) değerleri.

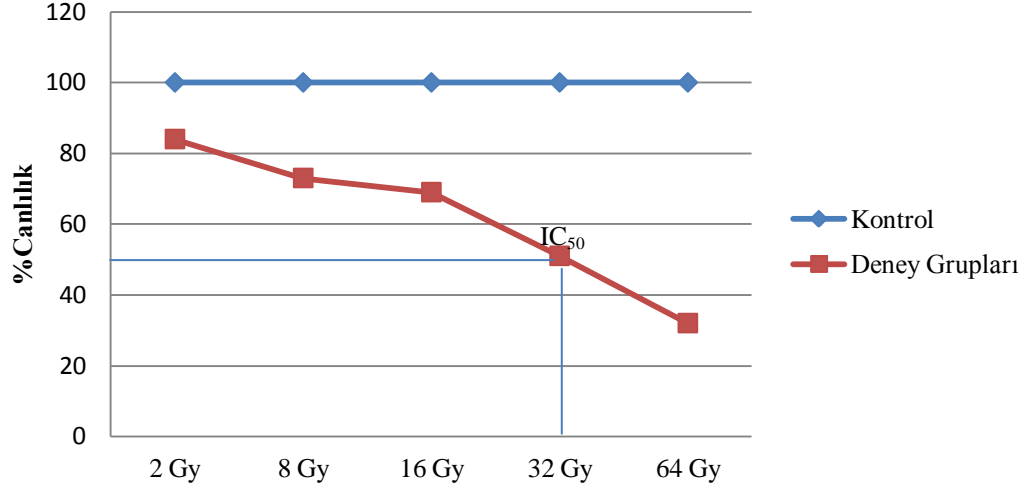
Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)	
	A_{ort}	$\pm SD$
Kontrol	$431,8 \times 10^{-3}$	$\pm 0,03$
2 Gy	$362,1 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
8 Gy	$315,6 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
16 Gy	$298,4 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
32 Gy	$219,6 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$
64 Gy	$134,4 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$

$p < 0,01$: * (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.3: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 24 saat inkübasyon süresi sonunda tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.

24 saat deney süresinin sonunda sitotoksik aktivite değeri saptanan deney gruplarının % canlılık değerleri, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı. 2 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 32 Gy ve 64 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grupları için sırası ile %84, %73, %69, %51 ve %32 olarak tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Çeşitli gama radyasyonu dozları uygulanan deney gruplarının 24 saat inkübasyon süresi sonunda % canlılık değerleri.

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, HeLa hücreleri için deneylerimizde kullanılacak olan optimum gama radyasyonu dozu (IC₅₀) 32 Gy olarak saptandı.

4.2. SİTOTOKSİK ETKİLER

HeLa hücre soylarına uygulanan gama radyasyonu, hipobarik stres ve gama radyasyonu ile birlikte uygulanan hipobarik stres koşullarının 0 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda hücrelerde meydana getirdiği sitotoksik etki, MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Deney grupları ve kontrol gruplarının ortalama absorbans değerleri ölçüldü. Bu değerlendirmenin sonrasında tüm deney gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analizler ile anlamlılığına bakıldı.

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonrasında 0 saat absorbans değerleri; kontrol grubu için $317,2 \times 10^{-3}$, tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu için $266,4 \times 10^{-3}$, tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubu için $301,2 \times 10^{-3}$, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubu için $263,1 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo:4.3, Şekil 4.5). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu ile gama radyasyonu ve gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0,01$), tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) belirlendi. Gama radyasyonu uygulanan deney grubu ile hipobarik stres koşullarının tek başlarına uygulandığı deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0,01$), tek başına gama radyasyonu ve gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Ayrıca tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu ile gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu da belirlendi ($p < 0,01$).

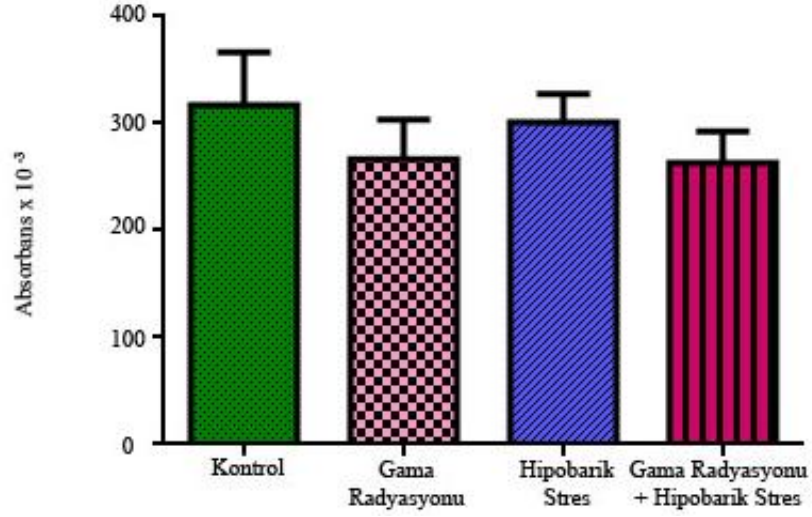
Tablo 4.3: Kontrol, gama radyasyonu, hipobarik stres koşulları, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney gruplarının 0 saat sonunda ölçülen absorbans ortalamaları (A_{ort}) ve standart sapma ($\pm SD$) değerleri.

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)	
	A_{ort}	$\pm SD$
Kontrol	$317,2 \times 10^{-3}$	$\pm 0,04$
Gama Radyasyonu	$266,4 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,03$
Hipobarik Stres	$301,2 \times 10^{-3}$	$\pm 0,03$
Gama Radyasyonu + Hipobarik Stres	$263,1 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$

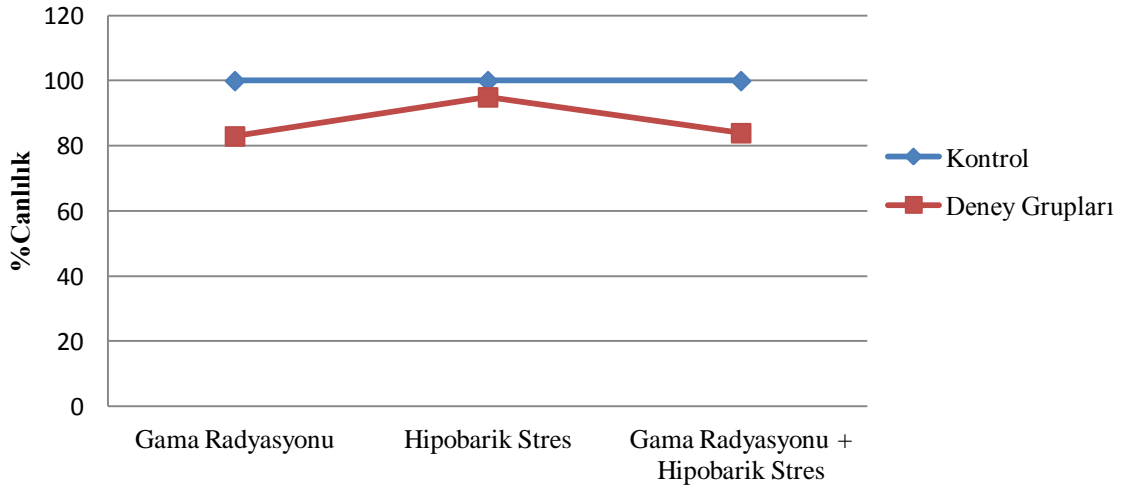
$p < 0,01$: * (kontrolle göre anlamlılık)

Deney gruplarının 0 saatte saptanan sitotoksik aktivite değerlerinin % canlılıkları, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı ve her bir deney grubu bu değere göre oranlandı. Tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu için %84, tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubu için %95, gama radyasyonu ile birlikte

hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu için ise %83 olarak tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saat deney süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.



Şekil 4.6: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saat deney süresi sonunda saptanan % canlılık değerleri.

Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının ardından 24 saat inkübasyon sonrası deney gruplarının absorbans değerleri; kontrol

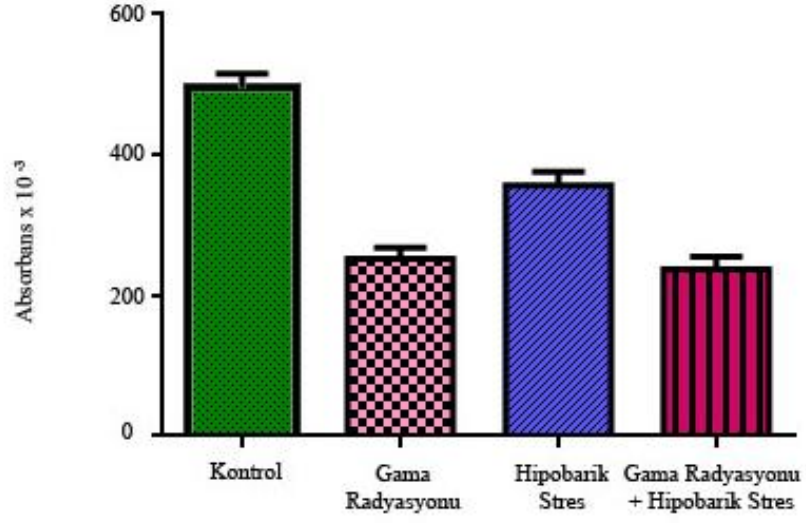
grubu için $494,1 \times 10^{-3}$, tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu için $252,1 \times 10^{-3}$, tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubu için $356,5 \times 10^{-3}$, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubu için ise $237,2 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.4, Şekil 4.7). Yapılan istatistiksel analizler sonunda, kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$). Ayrıca tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu ile tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu arasında ve gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stres koşullarının uygulandığı tüm deney grupları arasında da anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$). Buna ek olarak tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu ve gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stres uygulanan deney grubu arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0,01$).

Tablo 4.4: Kontrol, gama radyasyonu, hipobarik stres koşulları, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney gruplarının 24 saat sonunda ölçülen absorbans ortalamaları (A_{ort}) ve standart sapma ($\pm SD$) değerleri.

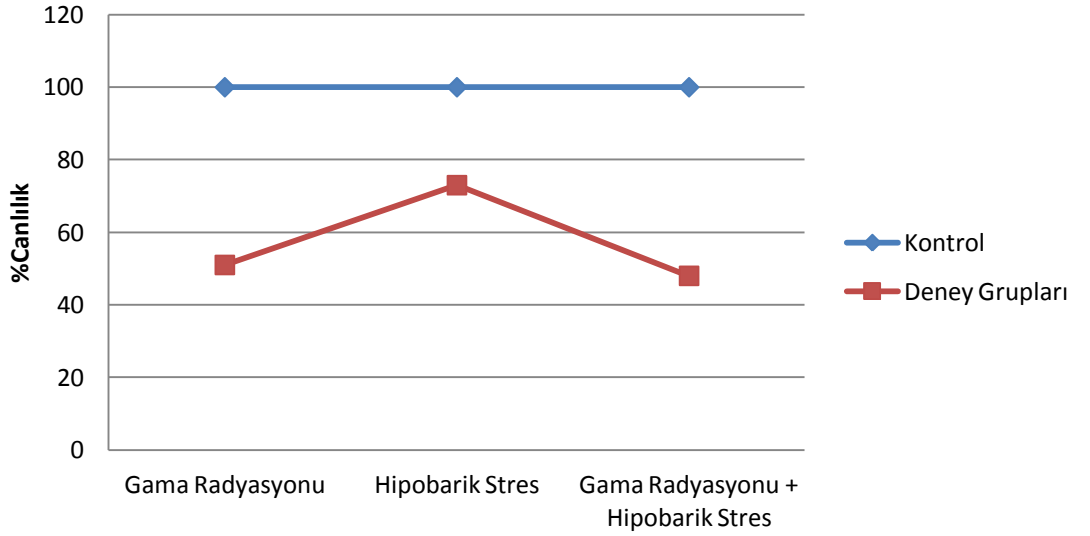
Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)	
	A_{ort}	$\pm SD$
Kontrol	$494,1 \times 10^{-3}$	$\pm 0,02$
Gama Radyasyonu	$252,1 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,01$
Hipobarik Stres	$356,5 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$
Gama Radyasyonu + Hipobarik Stres	$237,2 \times 10^{-3}*$	$\pm 0,02$

$p < 0,01$.* (kontrolle göre anlamlılık)

24 saat inkübasyon süresinin sonunda sitotoksik aktivite değerleri saptanan deney gruplarının % canlılıkları, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı ve her bir deney grubu bu değere oranlandı. Tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu için bu değer %51, tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubu için %73, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda ise %48 olarak tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.7: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.

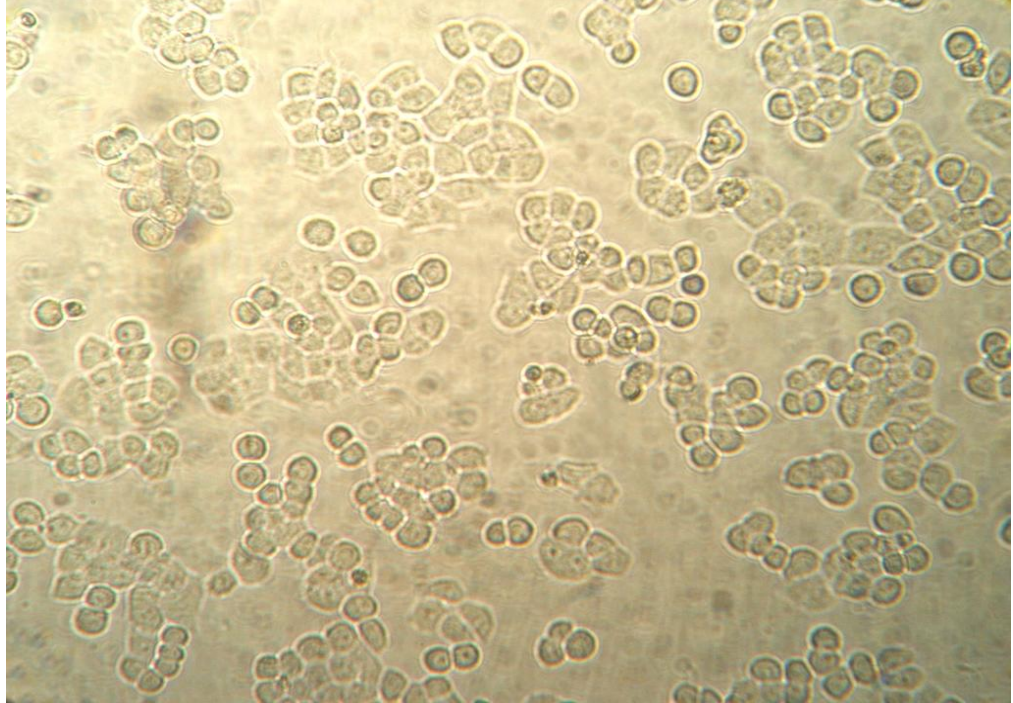


Şekil 4.8: Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan % canlılık değerleri.

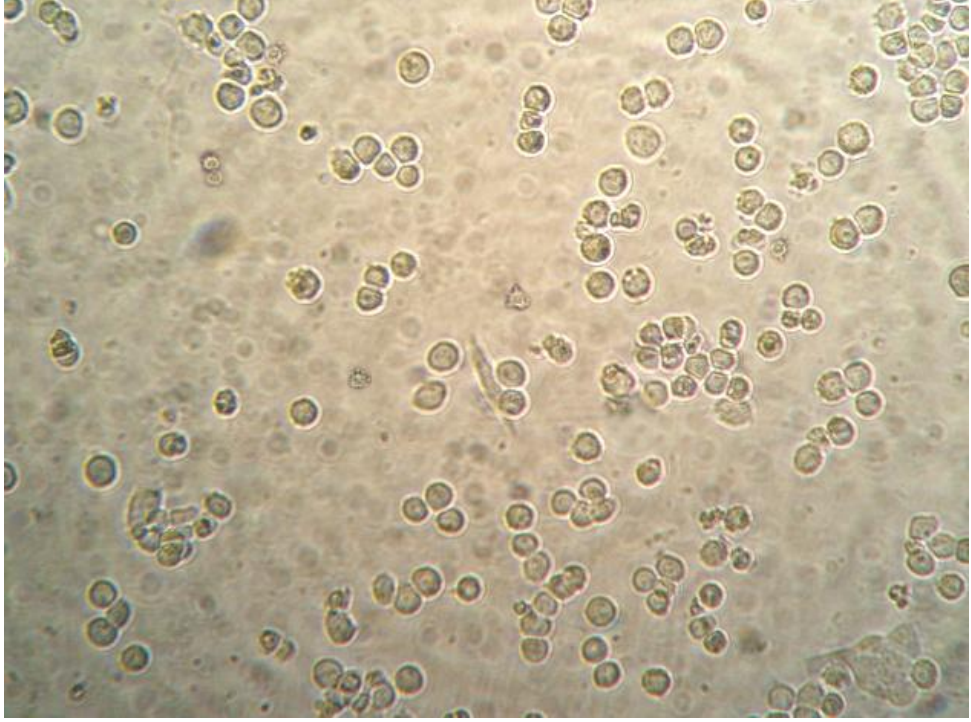
4.3. MORFOLOJİK ETKİLER

4.3.1. Faz Kontrast Mikroskobu

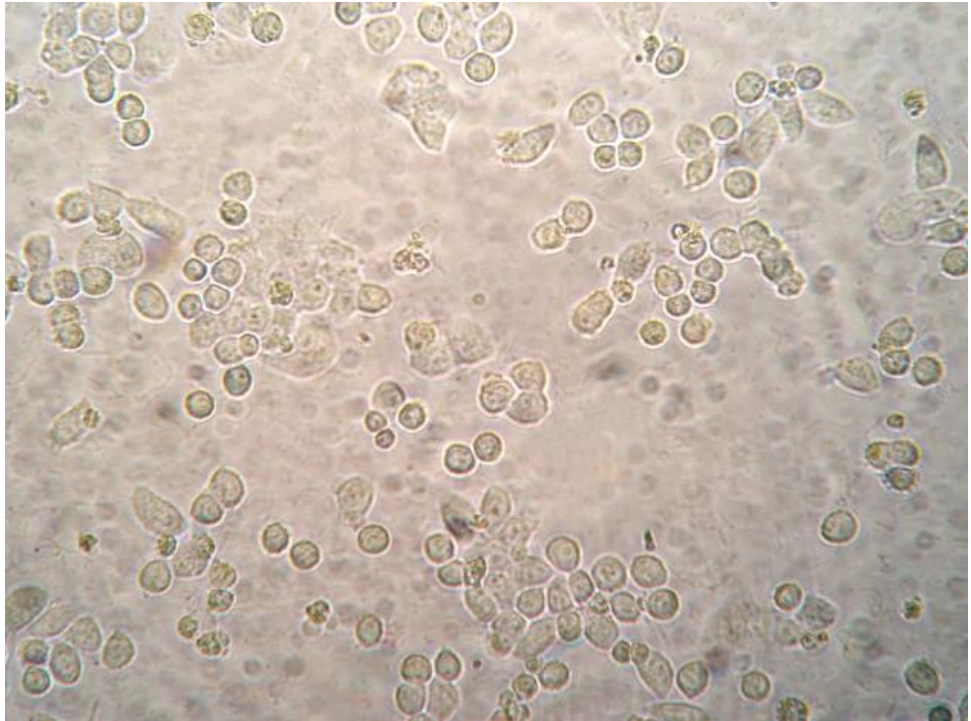
Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının ardından 0 saatte meydana gelen morfolojik değişimlerin genel görünümü Şekil 4.9-12'de gösterildi. Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının hemen ardından meydana gelen morfolojik etkilerin gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda en fazla olduğu gözlemlendi. Tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunda bu etkiler daha az görülürken, en az etki tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı grupta meydana geldi. Deney gruplarında, kontrol grubundaki hücrelerde gözlemlenmeyen bazı morfolojik değişiklikler saptandı. Deney gruplarında hücrelerde vakuollerin oluştuğu, sitoplazmalarının granüllü olduğu ve gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda hücrelerin küçüldüğü ve yüzeye tutunma yeteneklerinin azaldığı görüldü.



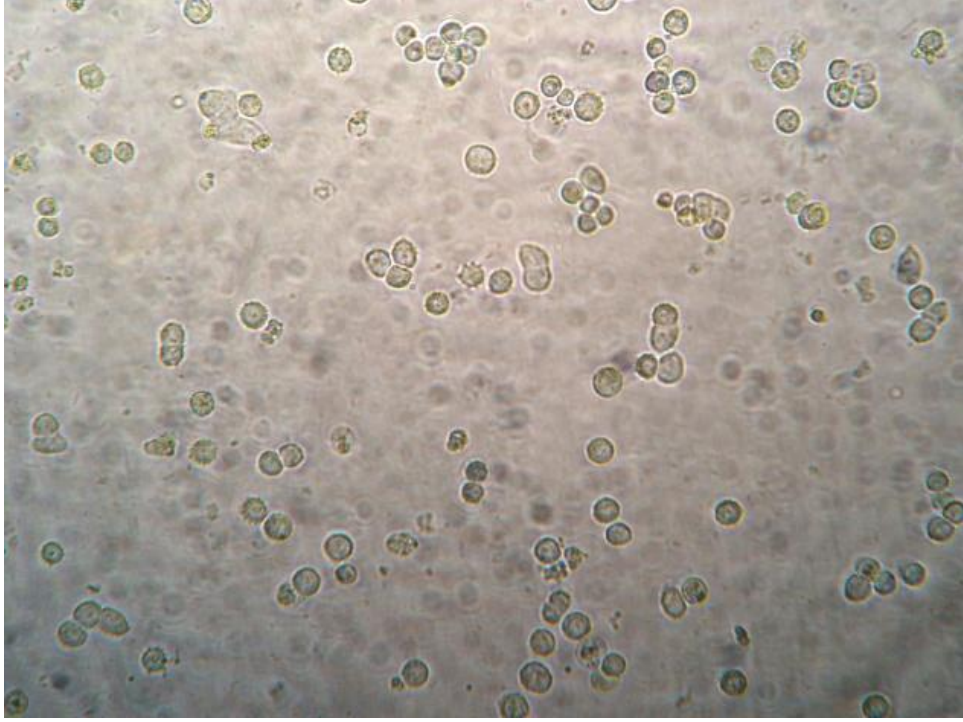
Şekil 4.9: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 0 saat deney süresi sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



Şekil 4.10: HeLa hücre kültürlerinde tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).

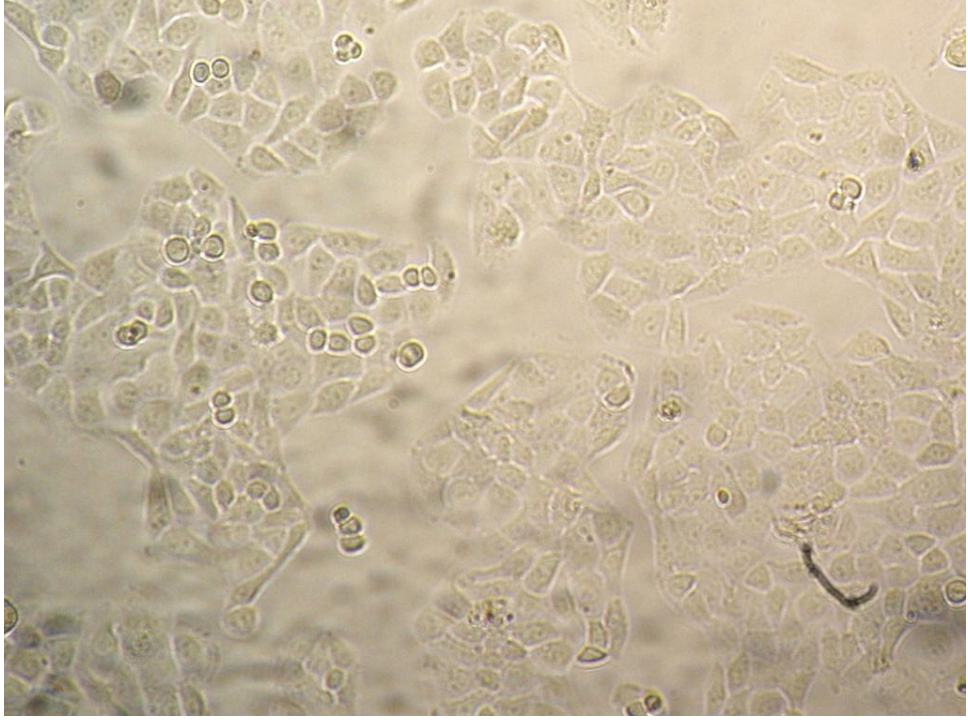


Şekil 4.11: HeLa hücre kültürlerinde tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).

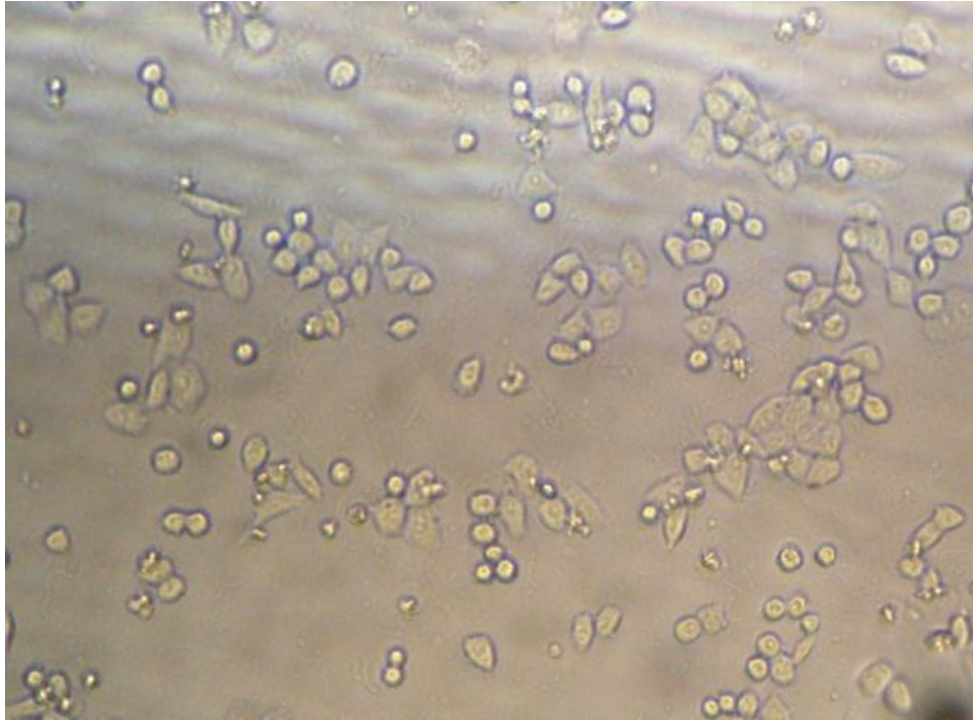


Şekil 4.12: HeLa hücre kültürlerinde gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 0 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).

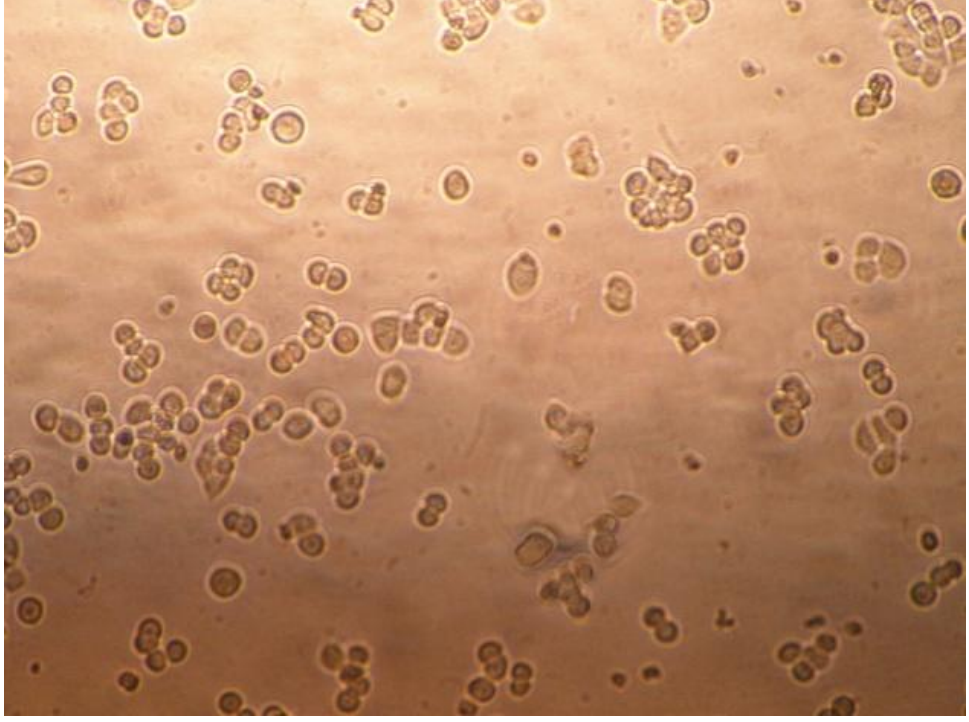
Ayrı ayrı ve birlikte uygulanan gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda meydana getirdiği genel morfolojik etkiler Şekil 4.13-16'da gösterildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meydana gelen etki gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda maksimum, tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubunda ise minimum olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile deney gruplarındaki hücrelerin morfolojik yapıları karşılaştırıldığında, tüm deney gruplarındaki hücrelerin kontrol grubundaki hücelere oranla daha küçük ve sitoplazmalarının granüllü olduğu görüldü. Deney gruplarındaki hücrelerde vakuollerin bulunduğu, hücre membranında baloncuk şeklinde çıkıntılarının bulunduğu, apoptotik ve nekrotik hücrelerin oluşmaya başladığı belirlendi. Ayrıca özellikle gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubundaki hücrelerin yüzeye tutunma yeteneklerinin azaldığı görüldü.



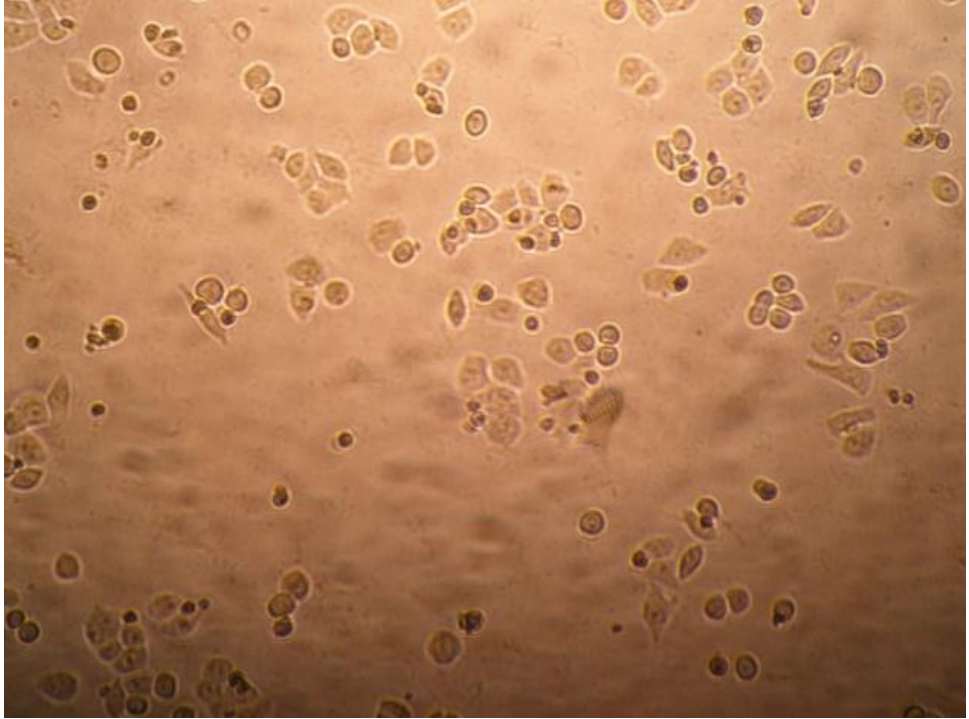
Şekil 4.13: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



Şekil 4.14: HeLa hücre kültürlerinde tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



Şekil 4.15: HeLa hücre kültürlerinde tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



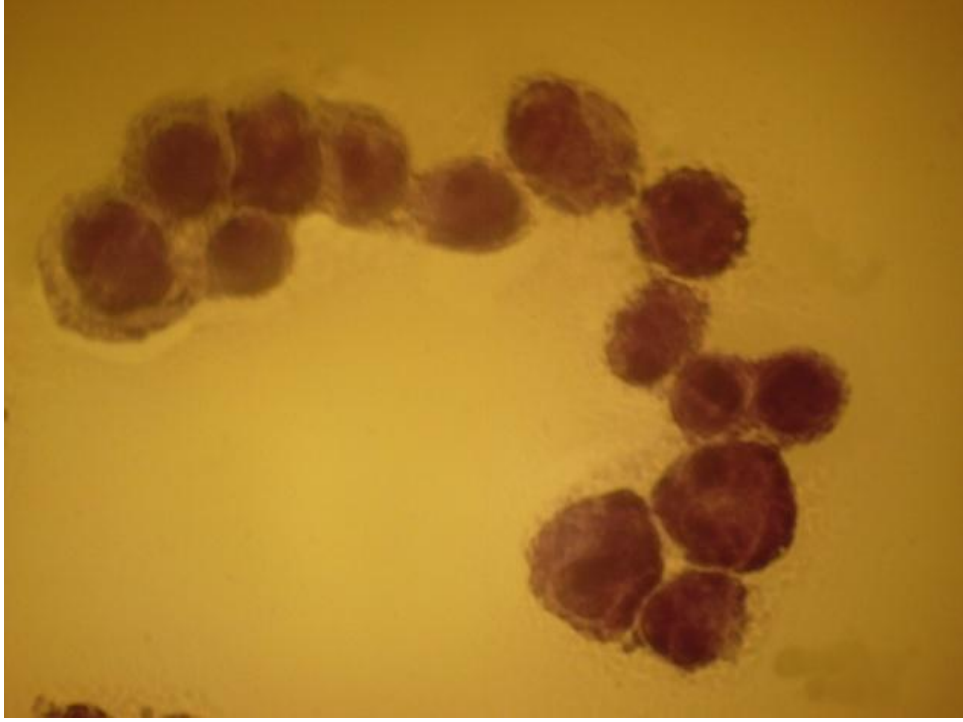
Şekil 4.16: HeLa hücre kültürlerinde gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunun 24 saat faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).

4.3.2. Işık Mikroskobu

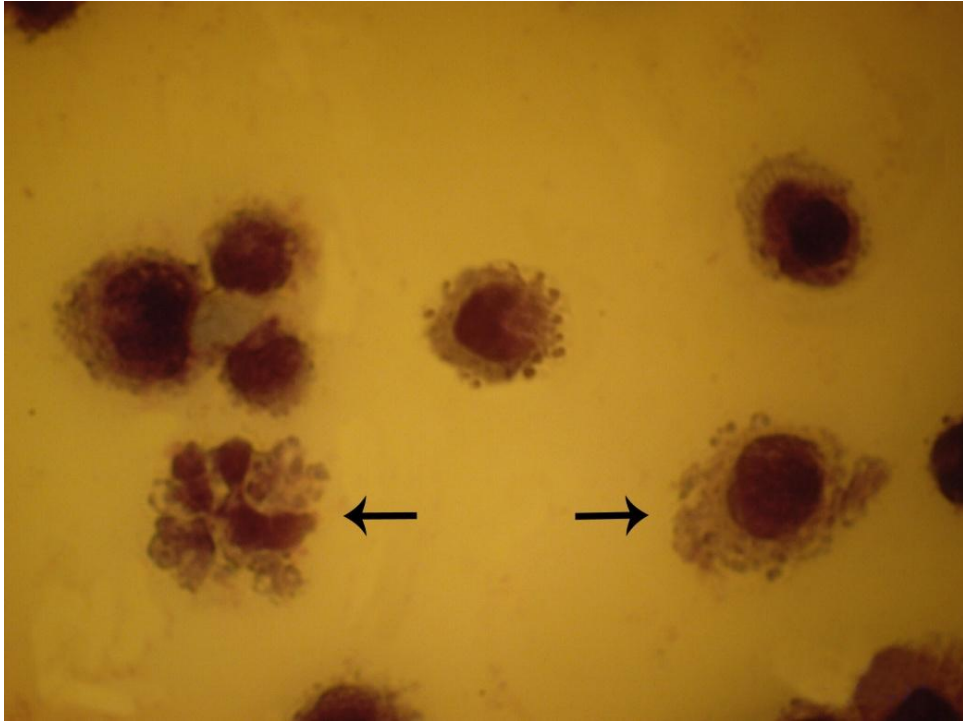
HeLa hücre kültüründe, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulandıktan sonra, deney süreleri sonunda Giemsa boyama yapılan hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler ışık mikroskobunda görüntülendi (Şekil 4.17-20, 0 saat; Şekil 4.21-24, 24 saat).

0 saatte, tüm deney gruplarına ait hücrelerin sitoplazmalarında granülleşme, gama radyasyonu ve gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda vakuol oluşumuna ek olarak nükleus parçalanması da görüldü.

24 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol grubundan farklı olarak, deney gruplarında hücrelerin sitoplazmasında granüllerin meydana geldiği, farklı büyüklükte vakuollerin bulunduğu, hücre şekillerinin bozulduğu, nükleus zarlarının parçalandığı ve gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda bunlara ek olarak apoptotik/nekrotik hücrelerin oluştuğu gözlemlendi.

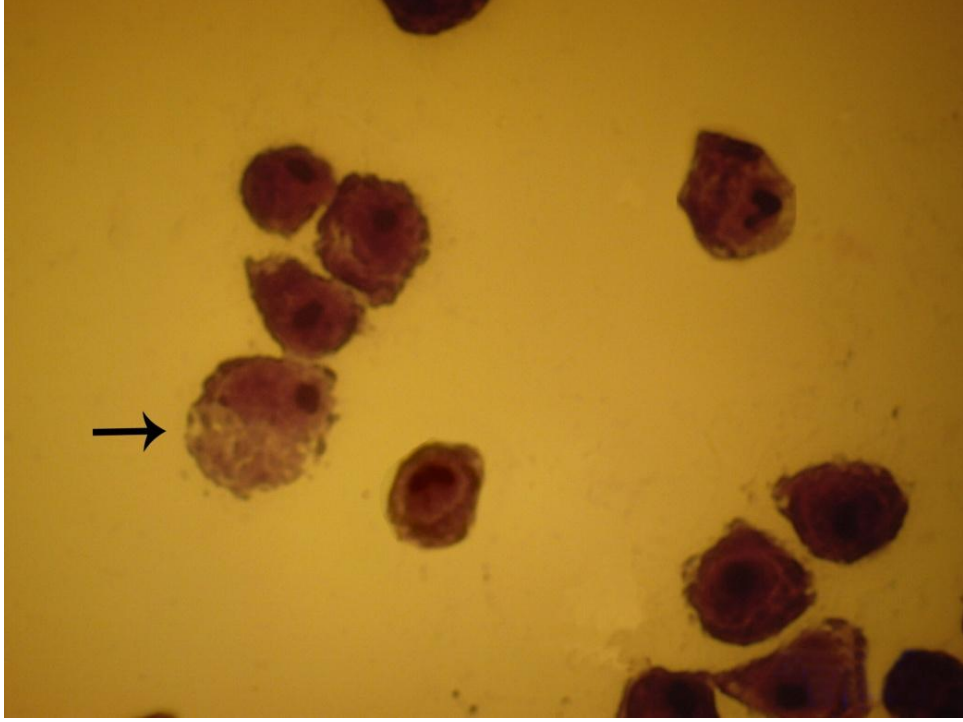


Şekil 4.17: HeLa hücre kültürlerinin kontrol grubunun 0 saatteki görüntüsü (Giemsa x1000).



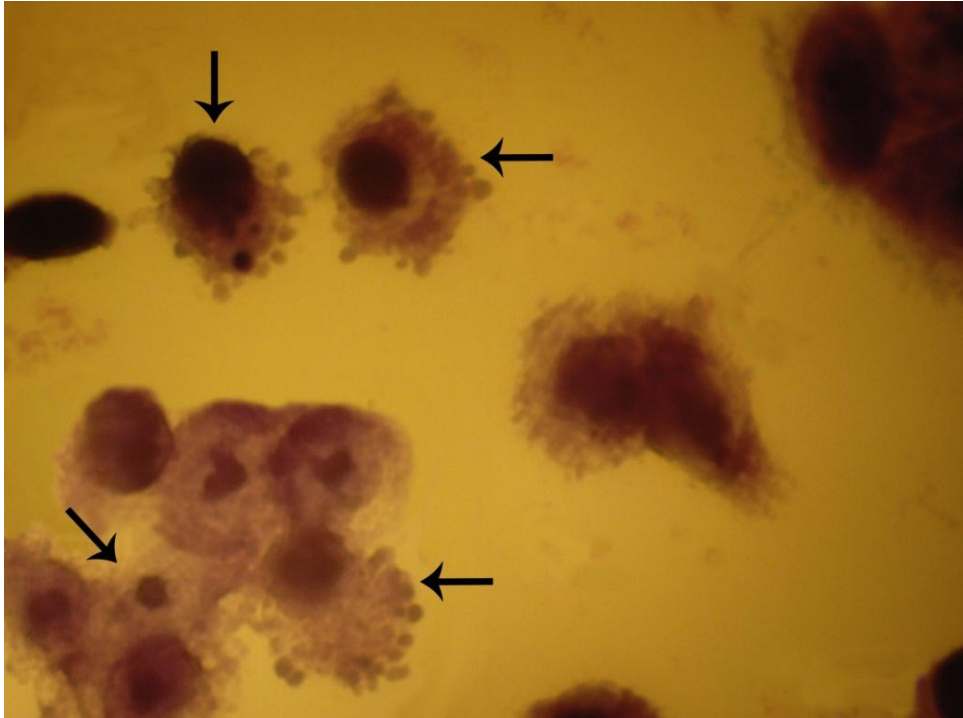
Şekil 4.18: Gama radyasyonu uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).

(↔ :Sitoplazmada granülleşme, vakuol oluşumu ve nukleus parçalanması)



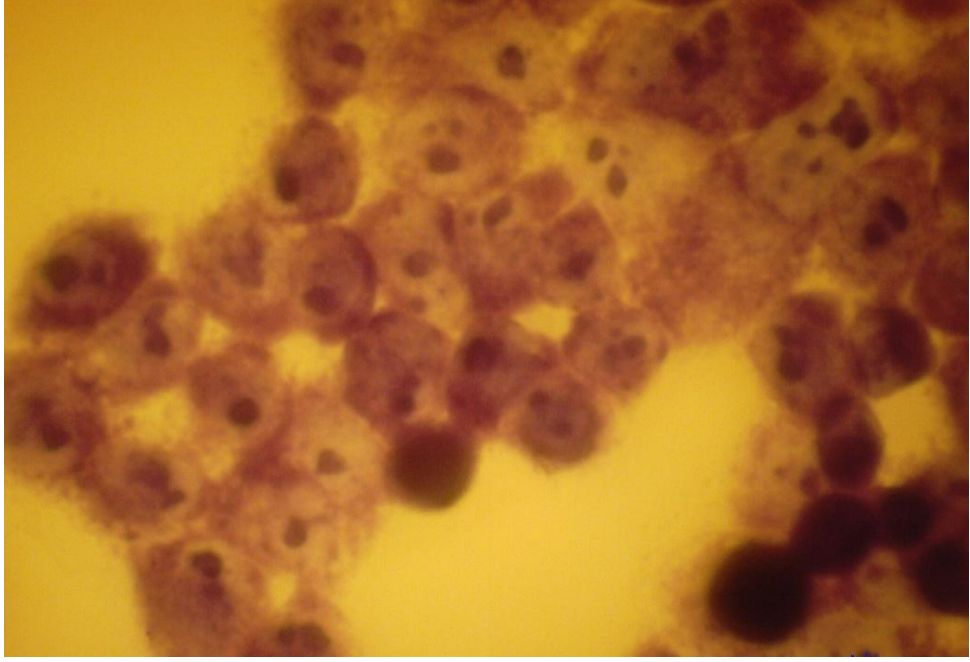
Şekil 4.19: Hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).

(→ :Sitoplazmada granülleşme)

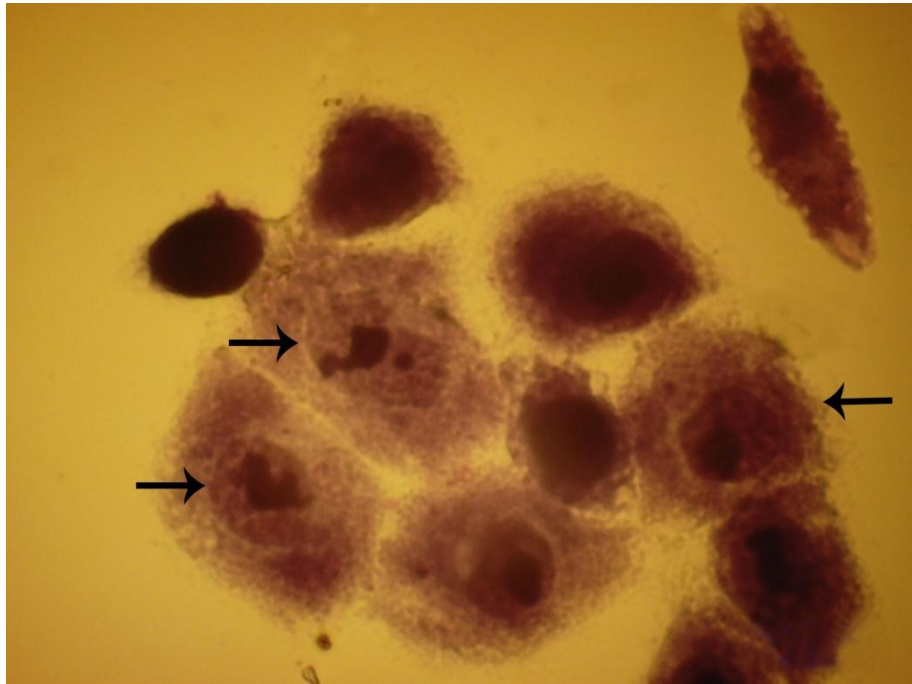


Şekil 4.20: Gama radyasyonu ile hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 0 saatte saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).

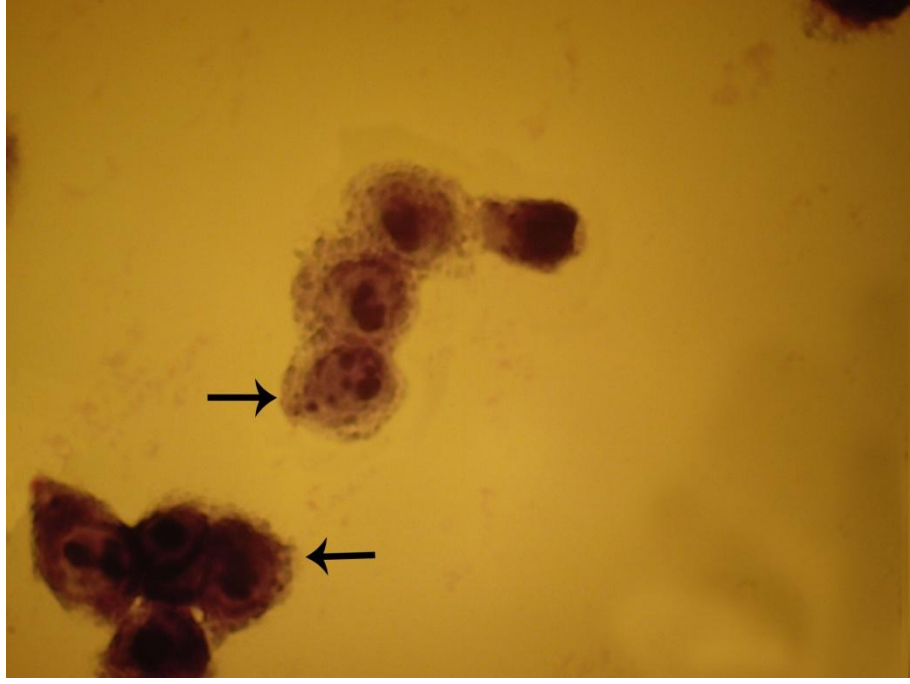
(↔ :Sitoplazmada granülleşme, vakuol oluşumu ve nukleus parçalanması)



Şekil 4.21: HeLa hücre kültürlerinin kontrol grubunun 24 saat sonraki görüntüsü (Giemsa x1000).

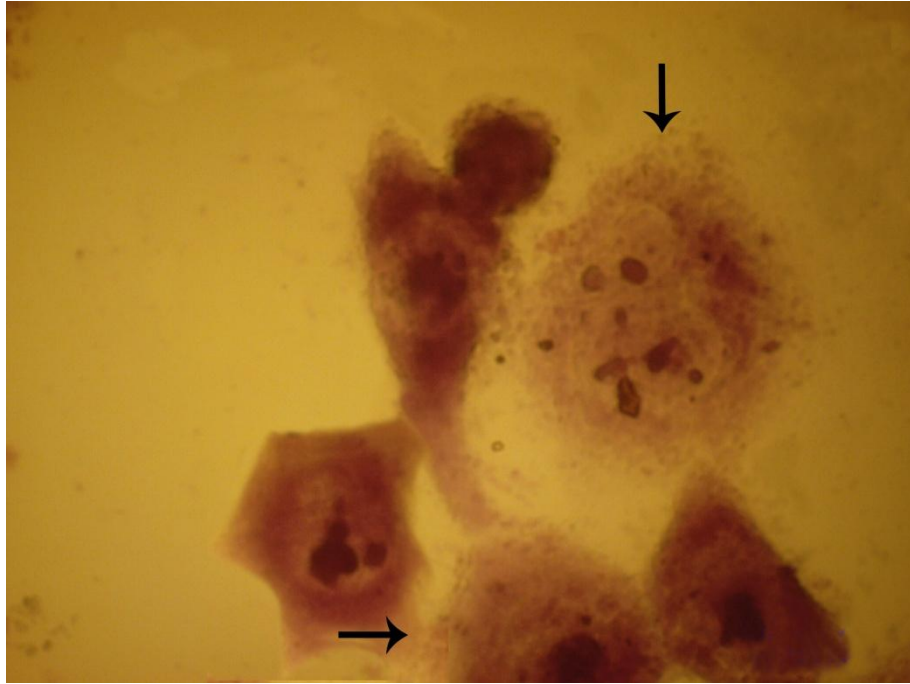


Şekil 4.22: Gama radyasyonu uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).
(→ :Sitoplazmada vakuol oluşumu, granülleşme, hücre şeklinin bozulması)



Şekil 4.23: Hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).

(→ :Sitoplazmada granülleşme ve vakuol oluşumu)



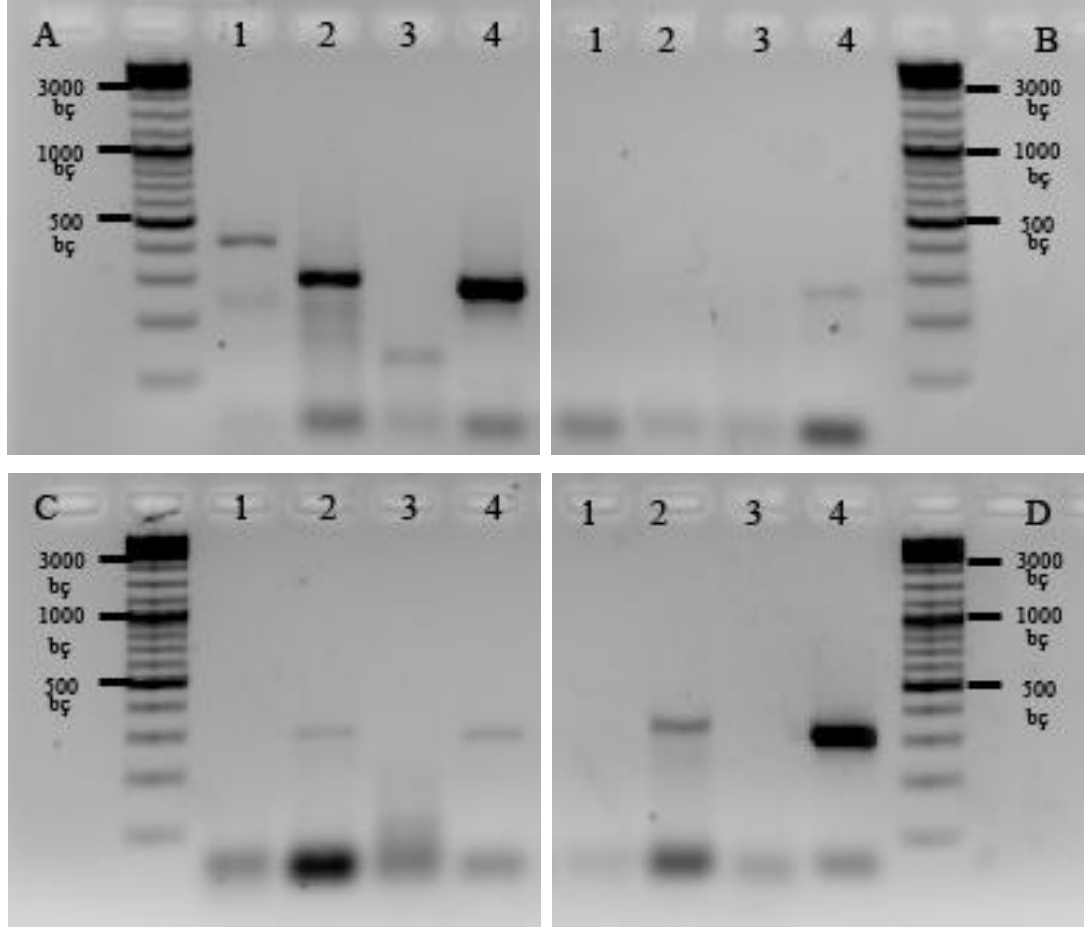
Şekil 4.24: Gama radyasyonu ile hipobarik stres koşulları uygulanan HeLa hücre kültürlerinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda saptanan morfolojik değişiklikler (Giemsa x1000).

(→ :Nukleus zarının parçalanması, apoptotik/nekrotik hücre oluşumu)

4.4. GEN ANLATIMINDAKİ ETKİLER

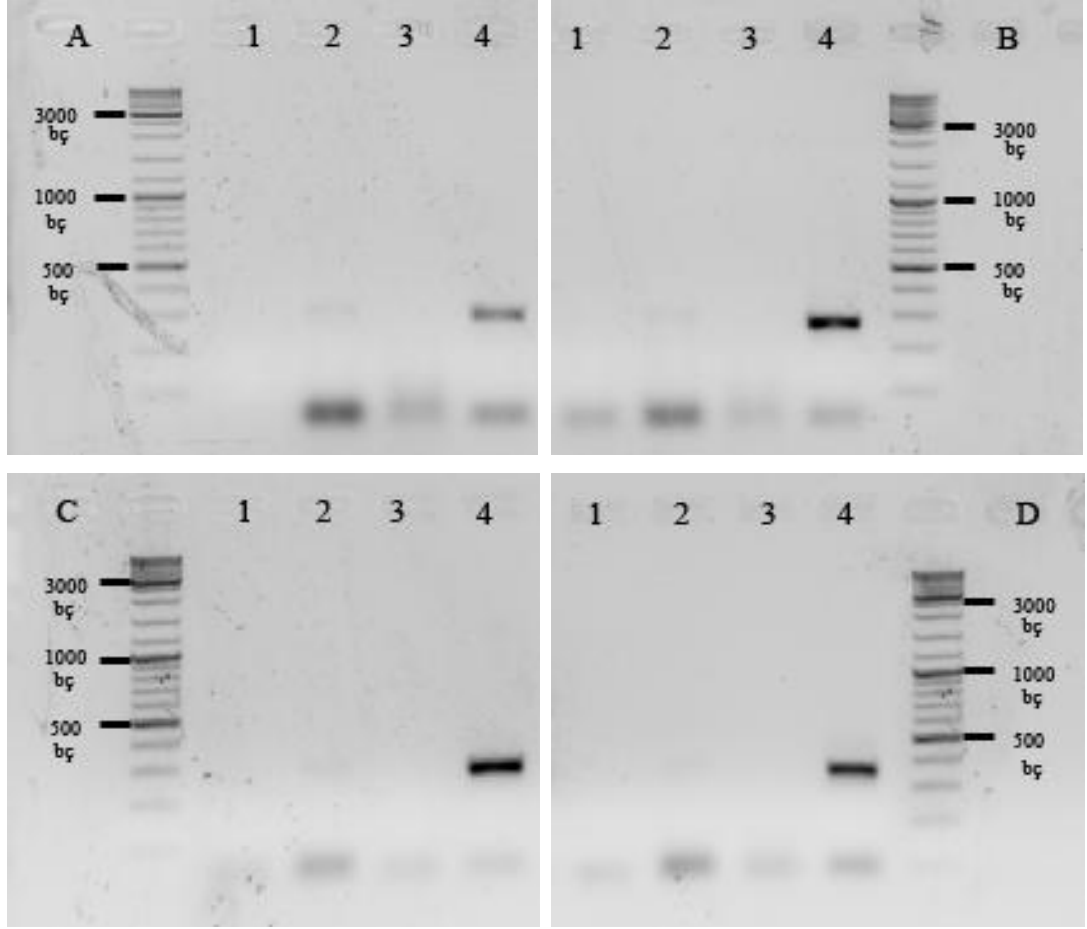
Gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulamasının ardından deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerden 0 ve 24 saat inkübasyon süresi sonrasında total RNA izolasyonu yapılarak RNA miktarı belirlendi. Ardından hücre siklusunda görev yapan *siklin A*, *siklin E*, *p21* ve *β -aktin* genlerinin anlatımına RT-PCR yöntemi ile bakıldı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek 90V'ta 1 saat yürütüldü. *Siklin A*, *siklin E* ve *p21* genlerinin anlatım seviyeleri agaroz jel elektroforezinde kontrol grubuna göre deney grupları arasında karşılaştırıldı.

0 saat grubunda, kontrol grubu hücrelerinde G₁ fazında görevli olan *siklin E* ve G₂ fazında görevli olan *siklin A* genlerinin anlatım yaptığı saptandı. Tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunda *siklin A* geninin anlatım seviyesinin kontrol grubuna ve diğer gruplara nazaran neredeyse yok seviyesinde azaldığı tespit edildi. Tek başına hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunda ve gama radyasyonu ile birlikte hipobarik koşullar uygulanan deney grubunda sadece *siklin A* geninin anlatım yaptığı ve kontrol grubuna göre anlatım seviyesinin azaldığı görüldü (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: HeLa hücrelerinde deney gruplarına göre 0 saat sonunda siklin genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (A:Kontrol grubu, B:Gama radyasyonu, C:Hipobarik stres koşulları, D:Gama radyasyonu+hipobarik stres koşulları; 1:*p21*, 2:*Siklin A*, 3:*Siklin E*, 4:*β-aktin*).

24 saat grubundaki hücrelerde ise bu genlerin anlatım seviyelerine bakıldığında, kontrol grubunda özellikle *siklin A* geninin anlatım seviyesinin her 3 deney grubunda da düştüğü saptandı. Ayrıca bu düşüşün 0 saat grubundakilere oranla daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: HeLa hücrelerinde deney gruplarına göre 24 saat sonunda siklin genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (A:Kontrol grubu, B:Gama radyasyonu, C:Hipobarik stres koşulları, D:Gama radyasyonu+hipobarik stres koşulları; 1:*p21*, 2:*Siklin A*, 3:*Siklin E*, 4:*β-aktin*).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kanserin tedavisinde oldukça sık kullanılmakta olan gama radyasyonu ve çağımızda yeni bir çalışma alanı olan hipobarik stres koşullarının, insan serviks karsinomu kökenli HeLa hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve ayrıca hücre siklusunu düzenleyen genlerin anlatımlarına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucu meydana gelen etkilerin hücresel ve moleküler seviyede karşılaştırılması da hedeflenmiştir. Deneylerde, HeLa hücre soyu üzerinde gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanması ile meydana gelen sitotoksik etkiler, hücre kinetiği parametrelerinden MTT yöntemi, hücre siklusunu düzenleyen genlerin anlatım seviyeleri moleküler biyoloji yöntemlerinden RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Hücrelerin morfolojik yapılarında meydana gelen değişiklikler ise, faz kontrast mikroskobu ve ışık mikroskobunda giemsa boyama ile gösterilmiştir.

Kanserin tedavisinde oldukça sık kullanılan yöntemlerden biri olan gama radyasyonu, hücrelerde doğrudan DNA hasarına neden olabilmekte (Hall, 1988) ve gama radyasyonu gibi iyonizan radyasyona maruz kalan hücrelerin hücre siklusu fazlarında gecikmeler meydana gelmektedir (Kastan ve Bartek, 2004). Bu gecikmeler, hücre siklusunda görev yapan çeşitli siklinler ve bu siklinlere bağlanan CDK'lar aracılığı ile kontrol noktalarında oluşmaktadır.

Son yıllarda yeni bir çalışma alanı olan hipobarik stres koşulları atmosferik basınca bağlı olarak düşük oksijen koşulları olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerde meydana gelen hipoksi, radyasyon direncini arttırmasına rağmen, hücrelerde oksidatif strese neden olmakta (Vats ve diğ., 2008) ve bunun sonucu olarak da hücrelerde çeşitli makromoleküllerde hasarlar oluşmaktadır. Hücrelerin hipoksiye maruz kalma süresi,

hücre bölünmesinin yavaşlamasında ya da hücrelerde apoptotik sürecin oluşmasında önem taşımaktadır. Ayrıca ortamın oksijen koşullarındaki farklılıklar da hücrenin cevabında rol oynamaktadır.

Çalışmamızda HeLa hücre kültürlerine uygulanacak IC₅₀ gama radyasyonu dozunun belirlenmesi amacıyla, 5 farklı gama radyasyonu dozu uygulanmış ve meydana gelen sitotoksik etki MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Deneylerimizde 24 saat inkübasyon süresi sonunda IC₅₀ dozu 32 Gy olarak saptanmıştır (Tablo 4.1-2, Şekil 4.1-4).

Sawant ve diğ. (1999), 0 Gy, 10 Gy, 20 Gy ve 40 Gy gama radyasyonu ile (Doz hızı: 1,1 Gy/dk) HeLa hücreleri üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, hücrelerde 0 saatte 40 Gy gama radyasyonu uygulamasının ardından tripan mavisi yöntemi ile %80 canlılık saptarlarken, 24 saatte kontrol grubunu %100 kabul ederek, 10 Gy için %90, 20 Gy için %80 ve 40 Gy için %60 canlılık oranı saptamışlardır. Bu oran ışınlamanın ardından 6. günde 40 Gy için %10'a düşmüştür. Eriksson ve diğ. (2007) çeşitli gama radyasyonu (Doz hızı: 0,45 Gy/dk) uyguladıkları HeLa hücreleriyle yaptıkları çalışmada, 20 Gy radyasyon dozunu uyguladıkları deney grubunun 7,5 gün sonunda absorbans değerinin 0'a yaklaştığını bildirmişlerdir. Wang ve diğ. (2010) HeLa hücreleri ile yaptıkları çalışmada 4 Gy gama radyasyonu dozunun, 5. günde %27,3 oranında hücre inhibisyonuna neden olduğunu WST-1 yöntemi ile göstermişlerdir.

Deneylerimizde IC₅₀ dozu olarak kullandığımız 32 Gy gama radyasyonu dozu yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik göstermekle birlikte, IC₅₀ dozunun daha düşük bulunduğu (Karthikeyan ve diğ., 2011) başka çalışmalar da bulunmaktadır. Bunun, çalışmamızda ve yukarıda bahsedilen çalışmalarda kullanılan gama radyasyonu kaynağının doz hızının düşük olmasından kaynaklanabileceği; ışınlamadan sonra 2 gün veya daha uzun süreler beklenildiği takdirde IC₅₀ dozunun düşebileceği düşünülmektedir. Ancak, çalışmamızda hipobarik stres koşullarının da uygulanabilmesi açısından 1 gün (HeLa hücreleri için 1 hücre siklusu süresi ~19-21 saat) beklenmiştir.

Ayrıca çalışmada varılan sonuçlar HeLa hücrelerinin radyasyona karşı direncinden dolayı, serviks kanserinde radyoterapinin cerrahi müdahaleden sonra yapılması durumunu desteklemektedir.

Krtolica ve diğ. (1996) insan ovaryum karsinoması kökenli OW-1, SAU ve SKA hücre soyları üzerinde yaptıkları deneylerde, SKA ve OW-1 hücrelerinin hipoksi etkisi sonucu hücre siklusunda G₁ ya da G₁/S kontrol noktasında durduklarını göstermişlerdir. Özcan Arıcan ve diğ. (2011) HeLa hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, hipoksinin hücrelerde meydana getirdiği anti-proliferatif etkinin uygulama zamanına bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Hücrelerin çoğalma hızında anlamlı bir azalma görülürken, buna paralel olarak apoptotik indeks değerlerinde anlamlı artış görüldüğü saptanmıştır.

Tez çalışmamızda ayrı ayrı ve birlikte uygulanan gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda MTT yöntemi kullanılmış ve kontrol grubunun %100 olduğu kabul edilerek, deney gruplarının % canlılık oranları belirlenmiştir. Bunun sonucunda 0 saatte tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunun canlılık oranı %84 (kontrole göre anlamlılık, $p < 0,01$), tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı grupta bu değer %95 ($p > 0,05$), gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stresin uygulandığı grupta ise %83 ($p < 0,01$) olarak ölçülmüştür. Deney gruplarının birbirleri ile olan anlamlılıklarına bakıldığında, gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubuyla, tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p < 0,01$), ancak tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubu ile arasında bir fark olmadığı ($p > 0,05$) belirlenmiştir. Ayrıca tek başına gama radyasyonu ve tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubu arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$). 24 saat sonunda tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunda canlılık oranı %51 iken ($p < 0,01$), tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubunda %73 ($p < 0,01$), gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda ise %48 ($p < 0,01$) olarak ölçülmüştür. Deney grupları arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney

grubu ile tüm deney grupları arasında, tek başlarına gama radyasyonu ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grupları arasında anlamlı bir farkın ortaya çıktığı saptanmıştır ($p<0,01$). Deneyler gerçekleştirildikten sonra her iki inkübasyon süresinin sonunda da meydana gelen sitotoksik etkinin en fazla gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda gerçekleştiği saptanmış, en az sitotoksik etkinin ise tek başına hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubunda meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 4.3-4). Tüm deney gruplarının içinde maksimum sitotoksik etkinin 24 saat inkübasyon süresi sonunda gama radyasyonu ve hipobarik stresin birlikte uygulandığı deney grubunda meydana geldiği saptanmıştır. Sonuç olarak, gama radyasyonunun, hipobarik stres koşulları ile birlikte uygulanmasının hücrelerde meydana gelen sitotoksik etkiyi arttırdığı ve ayrıca bu etkinin hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler ile paralellik gösterdiği de saptanmıştır.

Çalışmamızda, HeLa hücre kültürlerine gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı deney gruplarında meydana gelen morfolojik değişiklikler, kontrol grubuyla karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Faz kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde, 0 saat deney gruplarındaki hücrelerin sitoplazmalarında granülleşme, vakuol oluşumu ve gama radyasyonu ile birlikte hipobarik stres koşullarının uygulandığı deney grubunda hücrelerin küçüldüğü ve yüzeye tutunma yeteneklerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9-12). Faz kontrast mikroskobu ile yapılan gözlemlerde, 24 saat inkübasyon süresi sonunda ise, deney gruplarında hücrelerin küçüldüğü, sitoplazmalarının granüllü olduğu ve apoptotik/nekrotik hücre oluşumlarının başladığı görülmüştür. Buna ek olarak, özellikle gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubundaki hücrelerin tutunma yeteneklerinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.13-16). Işık mikroskobunda giemsa boyama ile yapılan incelemelerde, 0 saatte tüm deney gruplarındaki hücrelerin sitoplazmasında granülleşme, tek başına gama radyasyonu uygulanan deney grubunda buna ek olarak vakuol oluşumu ve nükleus parçalanması tespit edilmiştir (Şekil 4.17-20). 24 saat inkübasyon süresi sonunda deney gruplarındaki hücrelerin sitoplazmasında granülleşme, vakuol oluşumu ve apoptotik/nekrotik hücre oluşumu görülmüştür. (Şekil 21-24).

Mirzaie-Joniani ve diğ. (2002) HeLa hücreleri üzerinde gama radyasyonu ile yaptıkları çalışmada, apoptotik hücrelerin varlığını, bunun yanında kondanse, parçalanmış DNA'ya sahip apoptotik hücrelerin olduğunu da saptamışlardır. Niciforovic ve diğ. (2004) yaptıkları çalışmada, Co-60 ile ışınladıkları HeLa hücrelerinde, apoptotik ve nekrotik hücrelerin oluştuğunu rapor etmişlerdir. Deneylemizde HeLa hücrelerinde gözlemlenmiş olduğumuz morfolojik değişiklikler bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

O'Connell ve diğ. (1998), HSG hücreleri üzerinde radyasyonla yaptıkları çalışmada, hücrelere gama radyasyonu uygulandıktan sonra G_0/G_1 fazındaki hücrelerin arttığını, S ve G_2/M fazındaki hücrelerin azaldığını göstermişlerdir. Wang ve diğ., (2000) yaptıkları çalışmada, gama radyasyonunun neden olduğu DNA hasarını takiben, gama radyasyonunun MKK6-p38 γ kaskadının aktivasyonunu sağladığı ve p38 γ 'nın gama radyasyonunun neden olduğu G_2 yakalanmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Vucic ve diğ., (2006) DU145 hücrelerine Co-60 gama radyasyonu uygulayarak yaptıkları çalışmada, radyasyon dozuna bağlı olarak hücrelerde sitotoksitenin arttığını göstermişlerdir. DU145 hücrelerinin gama radyasyonuna maruz kaldıktan sonra G_2/M kontrol noktasında durdukları rapor edilmiştir. G_2/M kontrol noktasındaki birikmenin, 20 Gy gama radyasyonu uygulanmasının ardından 72 saatlik deney süresi sonunda en belirgin seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Ahmadianpour ve diğ. (2013) gama radyasyonu uygulanan jurkat hücreleri ile yaptıkları çalışmada, hücrelerin G_2 fazında durduklarını göstermişlerdir. Ayrıca G_2 fazında duran hücrelerden bazılarının da apoptoza uğradıklarını saptamışlardır. Niu ve diğ. (2013), BER'de görevli olan DNA tamir proteini XRCC1 bulunmayan HepG2 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hücrelere gama radyasyonu uyguladıktan sonra, XRCC1 proteini bulunmayan HepG2 hücrelerinde, normal HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında G_2/M fazındaki hücrelerde büyük bir artış olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı HeLa hücrelerinde 0 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücre siklusunu

düzenleyen genlerden *siklin A*, *siklin E* ve *p21* genlerinin anlatımına RT-PCR yöntemi ile bakılmıştır.

Brugarolas ve diğ., (1995) radyasyonla uyarılan hücre siklusu durmasında *p21*'in önemini araştırmışlardır. *p21*^{-/-} MEF hücrelerine, gama radyasyonu uygulanmış ve bunu takiben hücrelerin G₁ fazında durdukları görülmüştür. Fujii ve diğ., (1999) yaptıkları çalışmada, normal hücreler G₀/G₁ ve G₂/M fazlarının hepsinde dururken, NBCCS'den elde edilmiş hücrelerin gama radyasyonu uygulandıktan sonra G₂/M fazında biriktiklerini rapor etmişlerdir. Gama radyasyonu uygulamasından sonra görülen apoptotik hücrelerin NBCCS hücrelerinde daha küçük olduğu saptanmıştır. NBCCS hücrelerinde p27 anlatım seviyesinin, gama radyasyonu uygulanmasından sonra önemli derecede düştüğü gözlenirken, normal hücrelerde ve NBCCS hücrelerinde p53, p21 ve pRb anlatımlarının değişiklik göstermediği bildirilmiştir. Green ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmada, MEF hücrelerine çeşitli şiddetlerde hipoksi uygulayarak, hücre siklusuna etkisini gözlemlemişlerdir. %1 oksijen konsantrasyonunda 24 ve 48 saatlik deney süreleri sonunda hücre siklusunda herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. 24 saatlik deney grubunda S fazının uzadığı belirlenmiştir. 48 saatlik deney grubunda S fazının hafifçe düştüğü ancak kontrol grubu ile deney grupları arasında önemli bir farka rastlanmadığı bildirilmiştir. %0,1'lik oksijen konsantrasyonu uygulanan hücrelerin de hücre sikluslarında bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca hücrelerde p21 ve p27 protein seviyelerinin değişmemiş olduğu gözlemlenmiştir. Box ve Demetrick (2004) çalışmalarında, hipoksinin farklı hücre soylarındaki cevaplarını incelemişlerdir. Çalışmalarında HeLa, HTB-30, HMEC gibi hücre soylarının, hipoksiye maruz kalmalarından 6 ile 12 saat arasında değişen süreler sonunda G₁/S fazı kontrol noktalarında durdukları gösterilmiştir. Hep3B ve HMEC hücre soylarında p21 proteininin kaybı görülürken; HeLa, HTB-30 hücre soylarında bu kayıp saptanmamıştır.

Adachi ve diğ. (2001) kardiyomiyosit hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında, hipoksinin hücre siklusunda görev yapan siklin A, siklin E, siklin B proteinlerinin anlatımlarındaki etkileri incelenmiştir. Siklin B ve siklin E protein seviyelerinde çok büyük bir değişiklik gözlenmezken, siklin A seviyesinde artış olduğu görülmüştür.

Ancak miyosit olmayan hücrelerde siklin A seviyesinin kontrol grubuna göre hafifçe düştüğü saptanmıştır. Mazumder ve diğ. (2002) radyasyon uygulanan hücrelerde siklin E'nin proteolitik kırılması ile ilişkili kinaz aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemiştir. Gama radyasyonu uygulanan IM-9 ve U-266 hücrelerinde, siklin E aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir. Cariveau ve diğ. (2006) radyasyon uyguladıkları NIH/3T3 fibroblast hücre soylarında yaptıkları deneylerde, siklin E cevabının gama radyasyonunun dozuna bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca siklin E baskılanmasının p21 bağımlı olduğu gösterilmiştir. Radyasyon uygulanmasını takiben siklin A seviyesinde düşme olduğu saptanmıştır.

Denelerimizde, 0 saatte gama radyasyonu uygulanan deney grubunda ve hipobarik stres koşulları uygulanan deney grubunda sadece *siklin A* geninin anlatım yaptığı görülmüştür. Gama radyasyonu ile birlikte hipobarik koşullar uygulanan deney grubunda ise, *p21* ve *siklin A* genlerinin anlatım yaptığı saptanmıştır. 24 saat deney gruplarında, kontrol grubuna göre *siklin A* geninin anlatımının çok daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. *Siklin E* ve *p21* genlerinin anlatımının olmadığı görülmüştür (Şekil 25, 26). Bu bağlamda çalışmamızda değerlendirdiğimiz parametreler ışığında planlanacak olan ileri çalışmaların senkron kültürler ile yapılması ve daha kapsamlı parametreler ilave edilmesi durumunda geniş çapta değerlendirilmeler yapılabilecektir.

Bu çalışmada varılan sonuçlar, gama radyasyonu ve hipobarik stres koşullarının birlikte ve ayrı ayrı HeLa hücreleri üzerine uygulandığında meydana getirdiği sitotoksik etki ve bununla birlikte hücre siklusu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, hücre siklusunda görev yapan çeşitli siklin ve CKI genlerinin anlatımına bakılması sonucu, moleküler mekanizmada rol oynayan genlerin anlatımlarının araştırılarak literatürde ilk kez ortaya konması açısından oldukça önem taşımaktadır. HeLa hücrelerine, gama radyasyonunun hipobarik stres koşulları ile birlikte uygulandığında meydana gelen sitotoksik etkisinin tesbiti ve 24 saat sonunda gama radyasyonu ile hipobarik stres koşullarının birlikte uygulandığı deney grubunda *siklin A* geninin anlatımının kontrol grubuna göre maksimum oranda düştüğünün gösterilmesi bu bağlamda yapılan çalışmalar arasında bir ilki teşkil etmektedir.

Günümüzde kanser, oldukça sık rastlanan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser hastalığının tedavisinde kanser hücrelerinin yok edilmesi asıl amaç olarak belirlenmektedir. Bu yüzden hücre siklusunun mekanizmaları ve hücre siklusunda görev yapan moleküller ve kontrol noktalarının bilinmesi, tedavinin etkinliğinin artmasını sağlamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda, kanser hastalığının tedavisinde oldukça sık kullanılan gama radyasyonunun ve bununla kombine olarak kullanılabileceği düşünülen hipobarik stres koşullarının hücresel ve moleküler düzeyde etkilerinin ortaya konmuş olması, kanser tedavisinde etkinliğin artması ve çığır açacak yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- ADACHI, S., ITO H., TAMAMORI-ADACHI, M., ONO, Y., NOZATO, T., ABE, S., IKEDA, M., MARUMO, F., HIROE, M., 2001, Cyclin A/CDK2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes, *Circulation Research*, 88, 408-414.
- AGAMI, R., BERNARDS, R., 2000, Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage, *Cell*, 102, 55-66.
- AHMADIANPOUR, M.R., ABDOLMALEKI, P., MOWLA, S.J., HOSSEINKHANI, S., 2013, Gamma radiation alters cell cycle and induces apoptosis in p53 mutant E6.1 jurkat cells, *Applied radiation and isotopes*, 71, 29-33.
- ALİUSTAOĞLU, M., 2008, Temel kanser fizyopatolojisi, *Klinik Gelişim*, 22-3 (8), 46-49.
- AMELLEM, O., STOKKE, T., SANDVIK, J.A., PETTERSEN, E.O., 1996, The retinoblastoma gene product is reversibly dephosphorylated and bound in the nucleus in S and G₂ phases during hypoxic stress, *Experimental Cell Research*, 227 (1), 106-115.
- AMELLEM, O., PETTERSEN, E.O., 1991, Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage, *Cell Prolif.*, 24, 127-141.
- ANONİM A, 2013, Cell cycle phases, <http://www.bdbiosciences.com/research/apoptosis/analysis/>, [Ziyaret Tarihi: 26 Mayıs 2013].
- ANONİM B, 2013, Expression of human cyclins through the cell cycle, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cyclin_Expression.svg, [Ziyaret Tarihi: 19 Nisan 2013].
- ANONİM C, 2013, Graphpad Prism 6, www.graphpad.com, [Ziyaret Tarihi: 19 Kasım 2013]
- ARATA, Y., FUJITA, M., OHTANI, K., KIJIMA, S., KATO, J.Y., 2000, Cdk2 dependent and independent pathways in E2F-mediated S phase induction, *J Biol Chem.*, 275, 6337-45.
- BERGER, M.M., 2005, Can oxidative damage be treated nutritionally?, *Clinical Nutrition*, 24 (2), 172-183.

- BODNER-ADLER, B., BODNER, K., CZERWENKA, K., KIMBERGER, O., LEODOLTER, S., MAYERHOFER, K., 2005, Expression of p16 protein in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis, *Gynecol Oncol.*, 96, 62-66.
- BOX, A.H., DEMETRICK, D.J., 2004, Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines, *Carcinogenesis*, 25 (12), 2325-2335.
- BRANZEI, D., FOIANI, M., 2007, Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks, *DNA Repair (Amst)*, 6, 994-1003.
- BROTHERTON, D.H., DHANARAJ, V., WICK, S., BRIZUELA, L., DOMAILLE, P.J., VOLYANIK, E., XU, X., PARISINI, E., SMITH, B.O., ARCHER, S.J., 1998, Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d, *Nature*, 395, 244-250.
- BRUGAROLAS, J., CHANDRASEKARAN, C., GORDON, J.I., BEACH, D., JACKS, T., HANNON, G.J., 1995, Radiation induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency, *Nature*, 377 (6549), 552-557.
- BRUNELLE, J.K., CHANDEL, N.S., 2002, Oxygen deprivation induced cell death: an update, *Apoptosis*, 7, 475-482.
- CABADAK, H., 2008, Hücre siklusu ve kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51-61.
- CANN, K.L., HICKS, G.G., 2006, Absence of an immediate G1/S checkpoint in primary MEFs following gamma-irradiation identifies a novel checkpoint switch, *Cell Cycle*, 5 (16), 1823-30.
- CARIVEAUA, M.J., KALMUS, G.W., JOHNKE, R.M., ALLISON, R.R., EVANS, M., HOLBERT, D., 2006, Correlations between radiation induced double strand breaks and cell cycle checkpoints in x-irradiated NIH/3T3 fibroblasts, *Anticancer Research*, 26, 3311-3316.
- CARMELIET, P., DO, Y., HERBERT, J. M., FUKUMURA, D., BRUSSELMANS, K., DEWERCHIN, M., NEEMAN, M., BONO, F., ABRAMOVITCH, R., MAXWELL, P., KOCH, C.J., RATCLIFFE, P., MOONS, L., JAIN, R.K., COLLEN, D., KESHET, E., 1998, Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature*, 394 (6692), 485-490.
- CLURMAN, B.E., PORTER, P., 1998, New insights into the tumor suppression function of p27(Kip1), *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 15158-15160.
- COOPER, G.M., HAUSMAN, R.E., 2006, *The Cell: A Molecular Approach*, 4th edition, ASM Press & Sunderland, Washington, D.C.; Sinauer Associates, MA., 0878932194.

- ÇAKATAY, U., KAYALI U., 2006, Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 32, 162-167.
- ÇAKATAY, U., TELCİ A., 2000, Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar, *İst. Tıp Fak. Mecmuası*, 63 (3), 314-317.
- DECKBAR, D., JEGGO, P.A., LÖBRICH, M., 2011, Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46 (4), 271-283.
- DEHAY, C., KENNEDY, H., 2007, Cell cycle control and cortical development, *Nat Rev Neurosci.*, 8 (6), 438-450.
- DELANEY, G., JACOB, S., FEATHERSTONE, C., BARTON, M., 2005, The role of radiotherapy in cancer treatment, *Cancer*, 104, 1129-1137.
- DONOVAN, J.C., ROTHENSTEIN, J.M., SLINGERLAND, J.M., 2002, Nonmalignant and tumor-derived cells differ in their requirement for p27Kip1 in transforming growth factor-beta-mediated G1 arrest, *J Biol Chem.*, 277, 41686-41692.
- DULIC, V., KAUFMANN, W.K., WILSON, S.J., TLSTY, T.D., LEES, E., HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J., REED, S.I., 1994, p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell*, 76, 1013-1023.
- DYSON, N.J., 2002, A revised Picture of the E2F transcriptional network and RB function, *Curr Opin Cell Biol.*, 14 (6), 684-691.
- ELLEDGE, S.J., 1996, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science*, 274, 1664-1672.
- EMA, M., TAYA, S., YOKOTANI, N., SOGAWA, K., MATSUDA, Y., FUJII-KURIYAMA, Y., 1997, A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 4273-4278.
- ERIKSSON, D., LÖFROTH, P-O., JOHANSSON, L., RIKLUND, K.A., STIGBRAND, T., 2007, Cell cycle disturbances and mitotic catastrophes in HeLa Hep2 cells following 2.5 to 10 Gy of ionizing radiation, *Clin Cancer Res.*, 13, 5501.
- FEARSON, E., 1997, Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer, *Science*, 278, 1043-1050.
- FELDSER, D., AGANI, F., IYER, N.V., PAK, B., FERREIRA, G., SEMENZA, G.L., 1999, Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2, *Cancer Res*, 59, 3915-3918.
- FLAMME, I., FROHLICH, T., VON REUTERN, M., KAPPEL, A., DAMERT, A., RISAU, W., 1997, HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain

transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels, *Mech Dev*, 63,51-60.

FLATT, P.M., PIETENPOL, J.A., 2000, Mechanisms of cell cycle checkpoints: at the cross roads of carcinogenesis and drug discovery, *Drug Metab Rev.*, 32, 283-305.

FOSTER, I., 2008, Cancer: A cell cycle defect, *Radiography*, 14, 144-149.

FUJII, K., MIYASHITA, T., TAKANASHI, J, SUGITA, K., KOHNO, Y., NISHIE, H., FURUE, M., YAMADA, M., 1999, Gamma irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells, *Jpn J Cancer Res.*, 90 (12), 1351-1357.

GADBOIS, D.M., LEHNERT, B.E., 1997, Temporal position of G1 arrest in normal human fibroblasts after exposure to gamma rays, *Exp Cell Res*, 232, 161-166.

GARDNER, L.B., LI, Q., PARK, M.S., FLANAGAN, W.M., SEMENZA, G.L., DANG, C.V., 2001, Hypoxia inhibits G₁/S transition through regulation of p27 expression, *J. Biol. Chem.*, 276, 7919-1926.

GIACINTI, C., GIORDANO, A., 2006, Rb and cell cycle progression, *Oncogene*, 25, 5220-5227.

GRAEBER, T.G., OSMANIAN, C., JACKS, T., HOUSMAN, D.E., KOCH, C.J., LOWE, S.W., GIACCIA, A.J., 1996, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours, *Nature*, 379, 88-91.

GRAEBER, T.G., PETERSON, J.F., TSAI, M., MONICA, K., FORNACE, A.J., JR., GIACCIA, A.J., 1994, Hypoxia induces the accumulation of p53 protein, but the activation of a G1-phase checkpoint by low oxygen conditions is independent of p53 status, *Mol. Cell. Biol.*, 14, 6264-6277.

GREEN, S. L., GIACCIA A. J., 1998, Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy, *Cancer J. Sci. Am.*, 4, 218-223.

GREEN, S.L., FREIBERG R.A., GIACCIA, A.J., 2001, p21^{Cip1} and p27^{Kip1} regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest, *Molecular and Cellular Biology*, 21 (4), 1196-1206.

GU, Y.Z., MORAN, S.M., HOGENESCH, J.B., WARTMAN, L., BRADFIELD, C.A., 1998, Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha, *Gene Expr*, 7, 205-213.

GUTTERIDGE, J. M. C., 1994, Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133-140.

HALL, E.J., 1988, *Radiobiology for the radiologist*, 3rd ed., JB Lippincott, Philadelphia, 9780397508488.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2007, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Clarendon Press, Oxford, UK, 978-0-19-856869-8.
- HALLIWELL, B., WHITEMAN, M., 2004, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, 142 (2), 231-255.
- HARBOUR, J.W., LUO, R.X., DEI SANTI, A., POSTIGO, A.A., DEAN, D.C., 1999, Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G₁, *Cell*, 98, 859-869.
- HARTWELL, L.H., KASTAN M.B., 1994, Cell cycle control and cancer, *Science*, 266 (5192), 1821-1828.
- HARTWELL, L.H., WEINERT, T.A., 1989, Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science*, 246, 629-634.
- HEACOCK, C.S., SUTHERLAND, R.M., 1990, Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism, *British Journal of Cancer*, 62 (2), 217-225.
- HOGENESCH, J.B., CHAN, W.K., JACKIW, V.H., BROWN, R.C., GU, Y.Z., PRAY-GRANT, M., PERDEW, G.H., BRADFIELD, C.A., 1997, Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix- PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway, *J Biol Chem*, 272,8581-8593.
- ILGAR, N.N., ÖZCAN ARICAN, G., 2009, Induction of apoptosis and cell proliferation inhibition by paclitaxel in FM3A cell cultures, *African Journal of Biotechnology*, 7, 706-711.
- ILIAKIS, G., WANG, Y., GUAN, J., WANG, H., 2003, DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, *Oncogene*, 22, 5834-5847.
- IYER, N. V., KOTCH, L. E., AGANI, F., LEUNG, S. W., LAUGHNER, E., WENGER, R. H., GASSMANN, M., GEARHART, J. D., LAWLER, A. M., YU, A. Y., SEMENZA, G. L., 1998, Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha, *Genes Dev.*, 12 (2), 149-162.
- İÇLİ F., AKBULUT, H., 2005, *Onkolojiye giriş*, In: İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (ed) İç Hastalıkları, Güneş Kitapevi, Ankara, 2007-2014.
- JAYALAKSHMI, K., SAIRAM, M., SINGH, S.B., SHARMA, S.K., ILAVAZHAGAN, G., BANERJEE, P.K., 2005, Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia induced oxidative stress in primary hippocampal culture, *Brain Res.*, 1046, 97-104.
- JOINER M., VAN DER KOGEL, A., 2009, *Basic Clinical Radiobiology*, 4rd ed., Hodder Arnold, UK, 9780340929667.

- KARTHIKEYAN, S., KANIMOZHI, G., PRASAD, N.R., 2011, Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro, *Toxicology in Vitro*, 25, 1366-1375.
- KASTAN, M.B., BARTEK, J., 2004, Cell cycle checkpoints and cancer, *Nature*, 432, 316-323.
- KASTEN, M., GIORDANO, A., 1998, pRb and the Cdks in apoptosis and the cell cycle, *Cell Death & Differ.*, 5, 132-140.
- KE, Q., COSTA, M., 2006, Hypoxia inducible factor, *Molecular Pharmacology*, 70:1469-1480.
- KEARNS, W.G., LIU, J.M., 2001, Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review, *Current Genomics*, 2, 171-180.
- KHLEIF, S.N., DEGREGORI J., YEE C.L., OTTERSON, G.A., KAYE, F.J., NEVINS, J.R., 1996, Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4350-4354.
- KING, R.J.B., 1996, *Cancer biology*, Longman, Essex, 0582276578.
- KIRSCH, D.G., KASTAN, M.B., 1998, Tumor suppressor p53: implications for tumor development and prognosis, *J Clin Oncology*, 16 (9), 3158-3168.
- KRISHNAMACHARY, B., BERG-DIXON, S., KELLY, B., AGANI, F., FELDSER, D., FERREIRA, G., IYER, N., LARUSCH, J., PAK, B., TAGHAVI, P., 2003, Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1, *Cancer Res*, 63, 1138-1143.
- KRTOLICA, A., KRUCHER, N.A., LUDLOW, J.W., 1998, Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PPI activities, *Oncogene*, 17, 2295-2304.
- KRTOLICA, A., KRUCHER, N.A., LUDLOW, J.W., 1999, Molecular analysis of selected cell cycle regulatory proteins during aerobic and hypoxic maintenance of human ovarian carcinoma cells, *British Journal of Cancer*, 80 (12), 1875-1883.
- KRTOLICA, A., LUDLOW, J.W., 1996, Hypoxia arrests ovarian carcinoma cell cycle progression, but invasion is unaffected, *Cancer Research*, 56 (5), 1168-1173.
- KULA, B., SOBCZAK A., GRABOWSKA-BOCHENEK R., PISKORSKA D., 1999, Effect of electromagnetic field on serum biochemical parameters in steelworkers, *J. Occup. Health*, 41, 177-180.
- KURASHIGE, S., AKUZAWA, Y., ENDO, F., 1999, Effects of astragali radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine, *Cancer Invest.*, 17, 30-35.

- LINKE, S.P., CLARKIN, K.C. , WAHL, G.M., 1997, p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma irradiation, *Cancer Res*, 57, 1171–1179.
- LOFFLER, M., 1985, Characterization of the deoxynucleoside-dependent reversal of hypoxia-induced inhibition of cell cycle progression in Ehrlich ascites tumor cells, *Eur. J. Cell Biol.*, 39, 198–204.
- LOFFLER, M., 1987, Restimulation of cell cycle progression by hypoxic tumour cells with deoxynucleosides requires ppm oxygen tension, *Exp. Cell Res.*, 169, 255–261.
- LOFFLER, M., 1992, A cytokinetic approach to determine the range of O₂- dependence of pyrimidine(deoxy)nucleotide biosynthesis relevant for cell proliferation, *Cell Prolif.*, 25, 169–179.
- LUDLOW, J.W., HOWELL, R.L., AND SMITH, H.C., 1993, Hypoxic stress induces reversible hypophosphorylation of pRb and reduction in cyclin A abundance independent of cell cycle progression, *Oncogene*, 8, 331-339.
- LUKAS, J., LUKAS, C., BARTEK, J., 2004, Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time, *DNA Repair (Amst.)*, 3, 997-1007.
- MAITI, P., SINGH, S.B., SHARMA, A.K., MUTHURAJU, S., BANERJEE, P.K., ILAVAZHAGAN, 2006, Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain, *Neurochem. Int.*, 49, 709–716.
- MAKINO, Y., CAO, R., SVENSSON, K., BERTILSSON, G., ASMAN, M., TANAKA, H., CAO, Y., BERKENSTAM, A., POELLINGER, L., 2001, Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression, *Nature*, 414, 550-554.
- MAKINO, Y., KANOPKA, A., WILSON, W.J., TANAKA, H., POELLINGER, L., 2002, Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 locus, *J Biol Chem*, 277, 32405-32408.
- MAZUMDER, S., GONG, B., CHEN Q., DRAZBA J.A., BUCHSBAUM J.C., ALMASAN, A., 2002, Proteolytic cleavage of cyclin e leads to inactivation of associated kinase activity and amplification of apoptosis in hematopoietic cells, *Molecular and Cellular Biology*, 22 (7), 2398-2409.
- MCCLINTOCK, D.S., SANTORE, M.T., LEE, V.Y., BRUNELLE, J., BUDINGER, G.R., ZONG, W.X., THOMPSON, C.B., HAY, N., CHANDEL, N.S., 2002, Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death, *Mol Cell Biol*, 22, 94-104.
- MIRZAIE-JONIANI, H., ERIKSSON, D., SHEIKHOLVAEZIN, A., JOHANSSON, A., LÖFROTH, P-O., LENNART JOHANSSON, L., STIGBRAND, T., 2002, Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation, *Cancer*, 94 (4), 1210-1214.

- MOLINARI, M., 2000, Cell cycle check points and their activation in human cancer, *Cell Prolif*, 33, 261-74.
- MOSMANN, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- MURRAY, A.W., 1992, Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls, *Nature*, 359, 599-604.
- MUSACCHIO, A., EDWARD, D.S., 2007, The spindle assembly checkpoint in space and time, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8 (5), 379-393.
- NAGAHARA, H., EZHEVSKY, S.A., VOCERO-AKBANI, A.M., KALDIS, P., SOLOMON, M.J., DOWDY, S.F., 1999, Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity, *Proc Natl Acad Sci.*, 96, 14961-14966.
- NAGAR, S., SMITH, L.E., MORGAN, W.F., 2003, Characterization of a novel epigenetic effect of ionizing radiation, *Cancer Res.*, 63, 324–328.
- NATARAJAN A.T., 2002, Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutat. Res.*, 504, 3-16.
- NICIFOROVIC, A., ZARIC, B., DAKIC, A., TISMA, N., RADOJCIC, M.B., 2004, Flow cytometry evaluation of HeLa s3 cell death induced by gamma-radiation, *Jugoslov Med Biohem*, 23 (2), 135-142.
- NIU, Y., ZHANG, X., ZHENG, Y., ZHANG, R., 2013, XRCC1 deficiency increased the DNA damage induced by γ -Ray in HepG2 cell: involvement of DSB repair and cell cycle arrest, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 311-316.
- O'CONNEL, A.C., LILLIBRIDGE, C.D., ZHENG, C., BAUM, B.J., O'CONNEL, B.C., Ambudkar, I.S., 1998, Gamma radiation induced cell cycle arrest and cell death in a human submandibular gland cell line: effect of E2F1 expression, *Journal of Cellular Physiology*, 177, 264-273.
- ÖZCAN ARICAN, G., KHALILIA, W., SERBES, U., AKMAN, G., ÇETİN, İ., ARICAN, E., 2012, Düşük basınç (hipobarik) koşulların doku kültüründe anti-proliferatif ve apoptotik etkilerin moleküler mekanizmasının araştırılması, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012 İzmir, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 1333.
- PAINTER, R.B., YOUNG, B., 1980, Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 7315-7317.
- PARDEE, A.B., 1989, G1 events and regulation of cell proliferation, *Science*, 246, 603-608.

- PAULSEN, R.D., CIMPRICH, K.A., 2007, The ATR pathway: fine-tuning the fork, *DNA Repair (Amst)*, 6 (7), 953-66.
- PLANA-SILVA, M. D., WEINBERG, R. A., 1997, The restriction point and control of cell proliferation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 768-772.
- PROBST, H., SCHIFFER H., GEKELER V., SCHEFFLER K., 1989, Oxygen-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase in vivo and possible significance for replicon initiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163, 334-340.
- PUCCI, B., KASTEN, M., GIORDANO, A., 2000, Cell cycle and apoptosis, *Neoplasia*, 2, 291-299.
- QU, Z., MACLELLAN, W. R., WEISS, J. N., 2003, Dynamics of the Cell Cycle: Checkpoints, Sizers, and Timers, *Biophysical Journal*, 85 (6), 3600-3611.
- RAMANATHAN, L., GOZAL, D., SIEGEL, J.M., 2005, Antioxidant response to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons, *J. Neurochem.*, 93, 47-52.
- REYES, H., REISZ-PORSZASZ, S., HANKINSON, O. 1992, Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor, *Science*, 256, 1193-1195.
- RINGER, D.P., SCHNIPPER, L.E., 2001, Principles of cancer biology, *Clinical Oncology*, 21-35.
- RUSSO, A.A., TONG, L., LEE, J.O., JEFFREY, P.D., PAVLETICH, N.P., 1998, Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a, *Nature*, 395, 237-243.
- SAWANT, S.G., GREGOIRE, V., DHAR, S., UMBRICH, S.C., SUKUMAR, S., PANDITA, T.K., 1999, Telomerase activity as a measure for monitoring radiocurability of tumor cells, *FASEB J.*, 13 (9), 1047-1054.
- SCHMALTZ, C., HARDENBERGH, P. H., WELLS, A., AND FISHER, D. E., 1998, Regulation of proliferation/survival decisions during tumor cell hypoxia, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 2845-2854.
- SCHULER, M., GREEN, D.R., 2001, Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem Soc Trans*, 29:684-688.
- SEMENZA, G.L., 1998, Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis, *Curr Opin Genet Dev*, 8, 588-594.
- SEMENZA, G.L., 2003, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- SHERR, C.J., ROBERTS, J.M., 1999, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁ phase progression, *Genes Dev.*, 13, 1501-1512.

- STIEGLER, P., KASTEN, M., GIORDANO, A., 1998, The RB family of cell cycle regulatory factors, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 30-31, 30-36.
- TIAN, H., MCKNIGHT, S.L., RUSSELL, D.W., 1997, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes Dev*, 11, 72-82.
- TOBIAS, J.S., 1996, The role of radiotherapy in the management of cancer-an overview, *Ann. Acad. Med. Singapore*, 25, 371-379.
- TOURRIÈRE, H., PASERO, P., 2007, Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites, *DNA Repair (Amst)*, 6 (7), 900-913.
- VATS, P., SINGH, V.K., SINGH, S.N., SINGH, S. B., 2008, Glutathione metabolism under high altitude stress and effect of antioxidant supplementation, *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 1106-1111.
- VERMEULEN, K., BERNEMAN Z.N., VANBOCKSTAELE D.R., 2003a, Cell cycle and apoptosis, *Cell Prof.*, 36, 165-175.
- VERMEULEN, K., VANBOCKSTAELE D.R., BERNEMAN Z.N., 2003b, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prof.*, 36, 131-149.
- VOLM, M., KOOMAGI, R., 2000, Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer, *Anticancer Res*, 20,1527-1533.
- VUCIC, V., ISENOVIC, E.R., ADZIC, M., RUZDIJIC, S., RADOJCIC, M.B., 2006, Effects of gamma radiation on cell cycle growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression in DU 145 human prostate cancer cells, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 227-236.
- WANG, G.L., JIANG, B.H., RUE, E.A., SEMENZA G.L., 1995, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92,5510-5514.
- WANG, G.L., SEMENZA,G.L., 1993, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, *J. Biol. Chem.*, 268, 21513-21518.
- WANG, X., MCGOWAN, C.H., ZHAO, M., HE., L., DOWNEY, J.S., FEARNES, C., WANG, Y., HUANG, S., HAN, J., 2000, Involvement of the MKK6-p38 γ cascade in γ -radiation-induced cell cycle arrest, *Molecular and Cellular Biology*, 20, 4543-4552.
- WANG, Y., RADFAR, S., KHONG, H.T., 2010, Activated CD4⁺ T cells enhance radiation effect through the cooperation of interferon- γ and TNF- α , *BMC Cancer*, 10, 60.

- WATANABE, Y., WATANABE, T., KITAGAWA, M., TAYA, Y., NAKAYAMA, K.-I., MOTOYAMA, N., 1999, pRb phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase Cdk2 and Cdk4 in retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells, *Brain Res.*, 842, 342-350.
- WEINBERG, R.A., 1995, The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*, 81, 323-330.
- WILDBURGER, R., MRAKOVČIĆ, L., STROSER, M., ANDRIŠIĆ, L., BOROVIĆ SUNJIC, S., ZARKOVIĆ, K., ZARKOVIĆ, N., 2009, Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence?: Review Citation, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29 (1), 189-193.
- ZADÁK, Z., HYSPLER, R., TICHÁ, A., HRONEK, M., FIKROVÁ, P., RATHOUSKÁ, J., HRNCIARIKOVÁ, D., STETINA, R., 2009, Antioxidants and vitamins in clinical conditions, *Physiological Research*, 58 (1), 13-17.
- ZONG, W.X., THOMPSON C.B., 2006, Necrotic death as cell fate?, *Genes Dev.*, 20, 1-15.
- ZUNDEL, W., SCHINDLER, C., HAAS-KOGAN, D., ve diğ., 2000, Loss of PTEN facilitates HIF-1 mediated gene expression, *Genes Dev.*, 14, 391-396.
- ZYGMUNT, A., TEDESCO, V.C., UDHO, E., KRUCHER, N.A., 2002, Hypoxia stimulates p16 expression and association with cdk4, *Exp. Cell Res.*, 278, 53-60.



ÖZGEÇMİŞ

12.01.1989 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Cemal Diker İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Kadıköy İntaş Süper Lisesi'nde tamamladım.

2007 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yükseköğrenime hak kazandım. 2011 yılında lisans eğitimimi tamamlamamın ardından İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Radyobioloji Programında Yüksek Lisans eğitimine başladım.

Yüksek Lisans eğitimim sırasında, Uluslar arası katılımlı 8. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu'na dinleyici olarak katıldım. Ege Üniversitesi'nde düzenlenen 21.Ulusal Biyoloji Kongresi'nde poster sunumu yapılan "Düşük Basınç (Hipobarik) Koşullarının Doku Kültüründe Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler Mekanizmasının Araştırılması" çalışmasında araştırmacı olarak görev aldım. 2011-2013 yılları arasında Genetik, Doku Kültürü ve Radyobiolojide Kullanılan Yöntemler derslerinin laboratuvarlarında öğrenci asistanı olarak yer aldım.