



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**İYONİZE EDİCİ RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU NÖRAL
HÜCRE HASARININ BAĞIŞIKLIK YANITI İLE ONARILMASI**

DOKTORA TEZİ

AYLA BATU ÖZTÜRK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
OCAK-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İYONİZE EDİCİ RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU NÖRAL HÜCRE HASARININ BAĞIŞIKLIK YANITI İLE ONARILMASI

DOKTORA TEZİ

AYLA BATU ÖZTÜRK

ORCID ID: 0000-0003-3221-4292

DANIŞMAN
PROF. DR. BANU COŞKUN YILMAZ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
OCAK-2023

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

19/01/2023



Ayla Batu Öztürk

ÖZET

İYONİZE EDİCİ RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU NÖRAL HÜCRE HASARININ BAĞIŞIKLIK YANITI İLE ONARILMASI

Radyoterapi (RT) birçok kanser tipinin tedavisinde kullanılmakla beraber, kanser odağı dışındaki sağlıklı dokular üzerinde de etkisini göstermektedir. Öğrenme, hafıza gibi çeşitli bilişsel fonksiyonlar ile yakından ilişkili olan hipokampus (HP), radyasyondan olumsuz yönde etkilenmektedir. HP'te bulunan kök hücrelerin ve farklılaşmış hücrelerin radyasyon maruziyetine bağlı oluşan hasara nasıl cevaplar meydana getirdiği ve bu cevapların hangi faktörlerle işlediği araştırılmaya açık bir konudur. Bu çalışmanın amacı, fare HP'sinden elde edilmiş HT22 hücrelerini kullanarak RT'nin etkisini *in-vitro* ortamda farklı açılardan göstermek ve ardından radyasyonun olumsuz etkilerini immün yanıt yaklaşımı ile (makrofaj hücre hattı olan RAW264.7 medyumunda bulunan parakrin etkilerle) onarmaktır. Bu çalışmayla, iyonize edici radyasyonun 2 Gy ve 8 Gy uygulanan gruplarda hücre kaybına, kalıcı morfolojik değişikliklere, antiinflamatuvar yanıtta etkili olan genlerden *Nrf2* ve *Grn* ekspresyonlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Canlı kalan hücre koloni sayısı, gerçek zamanlı hücre analizi ve apoptoz sonuçlarına göre, fare makrofaj-koşullandırılmış medyumunu ile bu etkiyi *in-vitro* ortamda onarabilme potansiyeli olan en etkili grup (tedavi grubu), radyasyondan önce 24 saat koşullandırılmış medyum uygulanıp radyasyondan 24 saat sonra koşullandırılmış medyum uygulanan grup olarak tayin edilmiştir. Bu grup seçildikten sonra immunoterapi yaklaşımı içeren tedavi grubunun radyasyona karşı 48. ve 72. saatlerde oluşturduğu biyolojik yanıtlar değerlendirilmiştir. Tedavi grubunun 8 Gy'lik radyasyon hasarına bağlı olarak canlı kalan hücre koloni sayısında ve apoptoz oranında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında, radyasyonun HT22 hücreleri üzerindeki etkisi ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiş, immünoterapi yaklaşımlarının radyasyon hasarına karşı koruyucu olabileceği yönünde umut vaat edici ön sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, nöral hücreler üzerindeki bu etki, *in-vivo* ortamlarda test edilerek koşullandırılmış medyumun potansiyel koruyucu ve/veya onarıcı etkisi biyolojik sistemler üzerinde de test edilebilir.

Anahtar Kelimeler: HT22; radyasyon; radyoterapi; immünoterapi; RAW264

ABSTRACT

REPAIRING THE NEURAL CELL DAMAGE INDUCED BY IONIZING RADIATION VIA IMMUNE RESPONSE

Although radiotherapy (RT) is used in the treatment of many cancer types, it also exerts its devastating effect on healthy tissues other than the cancer cells or tissues. The hippocampus (HP), which is closely related to various cognitive functions such as learning and memory, is adversely affected by irradiation. How stem cells and differentiated cells in HP respond to damage caused by radiation exposure and by which factors these responses work is still largely unknown. The aim of the current study was to examine the effect of RT from different angles *in-vitro* using HT22 cells obtained from mouse HP, and then to repair the aversive effects of irradiation by using an immune response approach (with paracrine effects found in the macrophage cell line RAW264.7). In this study, it was shown that 2 Gy and 8 Gy doses of ionizing radiation to HT22 cells caused cellular loss, permanent morphological alterations and an increase in the expression of genes that are effective in the anti-inflammatory response, such as Nrf2 and Grn. Based on the findings of survived colony numbers, real-time cell analysis and apoptosis, the most efficient treatment groups among the others were designated as the group that was treated with the conditioned media of macrophages both 24 hr before and after the irradiation. After selecting this group, the biological responses of the treatment group, which included the immunotherapy approach to radiation at 48th and 72nd hours were evaluated. It was determined that the treatment group caused a decrease in the number of viable cell colonies and apoptosis rate in response to 8 Gy radiation damage. In this thesis, the effects of radiation on HT22 cells were evaluated in detail, and promising preliminary results were obtained that immunotherapy approaches could be protective against radiation damage. In future studies, this effect on neural cells can be tested *in vivo* and the potential protective and/or restorative effect of the conditioned medium can also be tested on biological systems.

Keywords: HT22; radiation; radiotherapy; immunotherapy; RAW264.7

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, kendisinden pek çok konuda birçok şey öğrendiğim, değerli danışman hocam Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ'a,

Eğitim sürecimde yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı, anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Ebru BALLI'ya, Prof. Dr. Savaş AKTAŞ'a ve Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a,

Tez izleme komitemde yer alan, fikirleriyle ve yol göstericiliğiyle tezime önemli katkılar sunan ve her daim beni motive eden Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günlerde tanıştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üy. Gülsen BAYRAK'a, doktora eğitimim sürecinde çalışma ortamımı güzelleştiren sevgili çalışma arkadaşlarımdan Araş. Gör. Zehra DEMİRAY ASOĞLU'na, yüksek lisans öğrencisi Gülşah GÜRBÜZ'e, Dr. Araş. Gör. Münevver ARSLAN'a, Dr. Araş. Gör. Duygu ÖZSAKARYA'ya, Dr. Araş. Gör. İlker KARA'ya, Dr. Araş. Gör. Bora VURAL'a,

Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalının kapılarını açan ve tez modelinin oluşturulmasında önemli katkılar sunan Dr. Öğr. Üy. Eda Bengi YILMAZ'a ve Doç. Dr. Songül BARLAZ US'a,

Akım sitometri deneylerinde yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Derya YETKİN'e,

İmmünotokimya verilerini ikinci bir göz olarak değerlendiren ve çalışma ekibimizin bir parçası olan, tıp dönem beş öğrencimiz sevgili Altınay KOZHAKHAN'a,

Her zaman sevgileri ve bana olan güvenleri ile yanımda olduklarını hissettiren babam Levent BATU, annem Hatice BATU, ve kardeşim H. Berkay BATU'ya,

Hem iş hem de özel yaşamımızda her zaman, bana motivasyon, disiplin, güç ve bol miktarda sevgi aşılayan, her aşamasında tezime önemli bilimsel katkılar sunan, hem meslektaşım hem de hayat arkadaşım olan sevgili eşim Dr. Öğr. Üy. Nail Can ÖZTÜRK'e

sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xx
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Hipokampus	3
2.1.1. Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.2. Embriyonik Gelişimi	5
2.2. İyonize Edici Radyasyon	6
2.2.1. İyonize Edici Radyasyonun Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri	6
2.2.2. Radyoterapi	7
2.2.3. Radyoterapi ve İmmünoterapi	8
2.2.4. Fare Hipokampal Nöronal Hücre Hattı (HT22) ve Radyasyon Çalışmaları	9
2.3. Nöroinflamasyon, Proliferasyon, Apoptoz ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkili Bazı Genler (<i>Nrf2</i> , <i>Grn</i> , <i>Bdnf</i> , <i>Dusp22</i> ve <i>C9orf72</i>)	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Hücre Kültürü	13
3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanması ve Hücrelerin İnkübe Edilmesi	14
3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması	14
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	15
3.2. İyonize Edici Radyasyon Uygulanması İşlemi	15
3.3. Deney Tasarısı ve Basamakları	16
3.3.1. Basamak 1	17
3.3.1.1. Basamak 1.1	18
3.3.1.2. Basamak 1.2	18
3.3.2. Basamak 2	19
3.3.2.1. Basamak 2.1	19
3.3.2.2. Basamak 2.2	20

	Sayfa
3.3.2.3. Basamak 2.3	23
3.4. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi (Clonogical Survival Assay)	24
3.5. Işık ve Elektron Mikroskopik İnceleme	25
3.6. Akım Sitometrik Analiz	26
3.6.1. Anneksin V/PI ile Erken, Geç Apoptozisin ve Nekrozisin İncelenmesi	26
3.7. Gen Ekspresyon Analizlerinin Yapılması	27
3.7.1. Total RNA İzolasyonu	27
3.7.2 cDNA Sentezi	28
3.7.3. Kantitatif- RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi	29
3.7.4. Kantitatif- RT-PCR için Primer Tasarısı	29
3.8. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinin Yapılması	30
3.9. İmmünohistokimyasal İşlemler	31
3.9.1. Hücrelerin İşaretlenmesi	31
3.9.2. Flouresan Mikroskop ile Görüntüleme ve Görüntülerin Analizi	32
3.10. Bulguların İstatistiksel Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1.Basamak 1.1 Bulguları	35
4.1.1. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi (Clonogical Survival Assay) Bulguları	35
4.2. Basamak 1.2 Bulguları	38
4.2.1. Morfolojik Bulgular	38
4.2.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular	38
4.2.1.2. Elektron Mikroskopik Bulgular	44
4.2.2. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi Bulguları	54
4.2.3. Akım Sitometrik Bulgular	56
4.2.4. tRNA İzolasyon ve Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	58
4.2.4.1. tRNA Miktar ve Saflık Bulguları	58
4.2.4.2. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	59
4.3. Basamak 2.1 Bulguları	62
4.3.1. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi Bulguları	62
4.4. Basamak 2.2 Bulguları	65
4.4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları	65
4.5. Basamak 2.3. Bulguları	68
4.5.1. Morfolojik Bulgular	68
4.5.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular	68
4.5.1.2. Elektron Mikroskopik Bulgular	74

	Sayfa
4.5.2. Akım Sitometrik Bulgular	84
4.5.3. tRNA İzolasyon ve Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	87
4.5.3.1. tRNA Miktar ve Saflık Bulguları	87
4.5.3.2. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	88
4.5.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	94
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	115

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo. 2.1. HT22 hücre hatları ile yapılan bazı iyonize edici radyasyon çalışmalarının özetlenmesi	9
Tablo 3.1. tRNA'dan CDNA'ya çevirim için uygulanan PCR reaksiyonu	29
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan RT-PCR primer dizileri, hedef genler ve ampikon (PCR ürünü) büyüklükleri	30
Tablo 4.1. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT ile ölçülen canlı koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n=12)	37
Tablo 4.2. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin canlı kalan hücre kolonisi testi ile ölçülen ve zamana bağlı değişen canlı koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n= 24)	55
Tablo 4.3. Kontrol, 2 Gy (6 saat ve 24 saat sonunda) ve 8 Gy (6 saat ve 24 saat sonunda) radyasyon uygulamasından sonra gruplardan elde edilen tRNA miktar ve saflık tayini (n=4)	59
Tablo 4.4. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve Şekil 3.4A'da özetlenen makrofaj mediası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n=12)	64
Tablo 4.5. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve Şekil 3.4B'de özetlenen makrofaj mediası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan koloni sayılarının ortalama ve standart sapma verileri (n=12)	65
Tablo 4.6. Kontrol (48. ve 72. saat sonunda), 8 Gy (Radyasyon 48. ve 72. saat sonunda) Sham (48. ve 72. saat sonunda) ve Tedavi (48. ve 72. saat sonunda) elde edilen tRNA miktar ve saflık tayini (n=4)	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan beyinde hipokampus, dentat girus ve forniksi gösteren, lateral ventrikül boşluğunu açığa çıkaran sağ beyin hemisferinin gösterilmesi	3
Şekil 2.2. Kemirgen koronal beyin kesitinde hipokampusteki CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinin ve GD'deki erişkin hipokampal nörogenezin şematik olarak gösterilmesi. Cornu Ammonis: CA, Radial Glia Benzeri Nöral Kök Hücre: RGB-NKH, Nöral Progenitör Hücre: NPH	4
Şekil 2.3. Nöral tüpün embriyonik gelişiminin şematik gösterilmesi	5
Şekil 2.4. Hipokampusun fetal gelişiminin şematik olarak gösterilmesi	6
Şekil 3.1. Fare makrofaj hücre hattının (RAW264.7) genel morfolojik görüntüsü. (A) Hücrelerin az yoğun olduğu görüntü, (B) Hücrelerin çok yoğun olduğu görüntü. Pasaj 6, objektif büyüklüğü:10X	13
Şekil 3.2. Fare nöral hipokampal hücre hattının (HT22) genel morfolojik görüntüsü. (A) Hücrelerin az yoğun olduğu görüntü, (B) Hücrelerin çok yoğun olduğu görüntü. Pasaj 4, objektif büyüklüğü:10X	13
Şekil 3.3. Kaynağı X-ışını olan iyonize edici radyasyon cihazı (A) Cihazın yazılım ve donanım bölümü (B) Cihazın mekanik bölümü ve hücre kültür flasklarına X-ışının verildiği platformun gösterilmesi	16
Şekil 3.4. Deney tasarısı ve basamaklarının şematik olarak özetlenmesi	17
Şekil 3.5. Basamak 1'deki grupların şematik olarak gösterilmesi. (A) Basamak 1.1'deki deney gruplarının şematik gösterimi (B) Basamak 1.2'deki deney gruplarının şematik gösterilmesi	19
Şekil 3.6. Koşullandırılmış medyum (KM) ile çeşitli basamaklarda ve çeşitli sürelerde muamele edilen HT22 hücre hatları ile oluşturulmuş canlı kalan hücre kolonisi testi ile sınanmış deney gruplarının gösterilmesi (A) 24 saat KM ve 48 saat KM ile muamele basamaklarının kombinasyonlarının gösterilmesi (B) 24 saat KM ile muamele süresinin farklı basamaklarda sham grupları ile uygulanmasının gösterilmesi	20
Şekil 3.7. Basamak 2.1 sonuçlarına göre belirlenmiş tedavi grupları üzerindeki gerçek zamanlı hücre bölünmesi analizi (xCELLigence) deneylerinin şematik olarak gösterilmesi	22
Şekil 3.8. Basamak 2.2 sonuçlarına göre belirlenmiş tedavi grupları üzerindeki deneylerin şematik olarak gösterilmesi. (A) Zaman 1 (48. saat) ve Zaman 2 (72. saat) olarak belirlenmiş zaman noktalarındaki deney gruplarının gösterilmesi ve gruplar üzerinde uygulanan yöntemler (B) Zaman 1 ve 2 için oluşturulan grupların şematik olarak açıklanması	24
Şekil 3.9. Cam tabanlı konfokal platelerinde resim çekilen alanların gösterilmesi	33
Şekil 3.10. Fotoğrafların Image J/Fiji yazılımı ile 8 bit'lik gri skalaya çevrilmesi. Objektif büyüklüğü: 20X	33
Şekil 3.11. Gri skalaya çevrilen fotoğraflar üzerinde hücrelerin işaretlenmesi. Objektif büyüklüğü: 20X	34
Şekil 4.1. Kuyucuk başına koloni sayısı belirlemek için yapılan ön çalışma. (A) Kuyucuk başına 500 hücre ekim sonuçları, (B) Kuyucuk başına 1000 hücre ekim sonuçları, (C)	36

Kuyucuk başına 2000 hücre ekim sonuçları, (D) Kuyucuk başına 4000 hücre ekim sonuçları, (E) Kuyucuk başına 10000 hücre ekim sonuçları. %0,5'lik kristal violet	
Şekil 4.2. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen kolonileri. (A) 0 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (B) 2 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (C) 4 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (D) 6 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (E) 8 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (F) 10 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler. %0,5'lik kristal violet	37
Şekil 4.3. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin canlı kalan hücre kolonisi testi (CKHKT) sonucunda gözlenen canlı koloni sayıları grafiği. (n=12)	37
Şekil 4.4. Kontrol grubunun genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. (A) Objektif büyütmesi 10X; ölçek:10 µm (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi. Normal morfolojideki nükleus (asterisk), nörin benzeri uzantılar (beyaz oklar)	38
Şekil 4.5. 2 Gy iyonize edici radyasyona maruz bırakılan grubun zamana göre değişen (6 sa ve 24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (A, B) 2 Gy radyasyon uygulanan grubun 6 saat sonrasındaki (2 Gy_6sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (C, D) 2 Gy radyasyon uygulanan grubun 24 saat sonrasındaki (2 Gy_24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (D) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (A, C). Objektif büyütmesi: 10X; ölçek: 10 µm. Nükleus (asteriskler), vezikül (siyah oklar), küntleşmiş hücre uzantıları (beyaz ok başları)	39
Şekil 4.6. 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz bırakılan grubun zamana göre değişen (6 sa ve 24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (A, B) 8 Gy radyasyon uygulanan grubun 6 saat sonrasındaki (8 Gy_6sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (C, D) 8 Gy radyasyon uygulanan grubun 24 saat sonrasındaki (8 Gy_24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (D) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (A, C) Objektif büyütmesi: 10X; ölçek: 10 µm. Nükleus (asteriskler), vezikül (siyah oklar), multipolar nükleus (siyah ok başları), küntleşmiş hücre uzantıları (beyaz ok başları)	40
Şekil 4.7 HT22 hücre hattının kontrol ve farklı dozlardaki iyonize edici radyasyon maruziyeti sonrası morfolojilerinin ışık mikroskopik görüntüleri. (A, D) Kontrol, (B, E) 2 Gy (C, F) 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulanmasından sonra, 6. saatteki morfolojik görüntüleri, (D) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi, (E) B'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi, (F) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	41
Şekil 4.8. HT22 hücre hattının kontrol grubu ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), nükleoluslar (N), lamellipodia (sarı oklar), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	42
Şekil 4.9. HT22 hücre hattının 2 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 6. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	42

	Sayfa
Şekil 4. 10. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 6. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	43
Şekil 4. 11. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 24. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın oklar), mikronükleus (sarı ok başları). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	43
Şekil 4. 12. HT22 hücrelerine uygulanan iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) Kontrol grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi (B) 2 Gy grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi (C) 8 Gy grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme 5000X, ölçek: 5 µm	44
Şekil 4.13. HT22 hücrelerinin elektron mikroskopik olarak görüntüsü. (A) Kontrol grubundaki hücrelerin 6 saat sonundaki genel morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek 5 µm. (B) kontrol grubunun 6 saat sonundaki normal yapıdaki granüllü endoplazmik retikulumların (siyah oklar) ve mitokondriyonların (siyah ok başları) morfolojisi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler) ve lamellipodia (sarı oklar)	44
Şekil 4.14. HT22 hücre hattının kontrol grubu hücreleri. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 6000X, ölçek: 5 µm	45
Şekil 4.15. HT22 hücre hattının kontrol grubu hücreleri. Normal yapıdak nükleus (asterisk), lamellipodia (sarı oklar), granüllü endoplazmik retikulumların (siyah oklar), mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 25000X, ölçek: 1 µm	45
Şekil 4.16. HT22 hücre hattının kontrol grubu elektron mikroskopik görüntüsü. Nükleus (asterisk), granüllü endoplazmik retikulumlar (siyah oklar), mitokondriyonlar (siyah ok başları), lizozomlar (kırmızı oklar). Büyütme: 25000X; ölçek :1 µm	46
Şekil 4.17. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 2 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki genel morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek :5 µm. (B) 2 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki lamellipodia (sarı oklar) ve artış gösteren veziküllerin (mavi oklar) morfolojisi. Büyütme: 15000X, ölçek :2 µm. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar)	46
Şekil 4.18. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	47
Şekil 4.19. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), otofagozom (beyaz ok), normal yapıdaki mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm	47
Şekil 4.20. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), sayısı artmış veziküller (mavi oklar) ve sayısı artmış lizozomlar (kırmızı oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm	48
Şekil 4.21. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi.	48

Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 5 µm. Nükleus (asterisk), izolasyon membranı (siyah kalın oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 5 µm	
Şekil 4.22. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 8 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm. (B) Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm. (C) Büyütme: 7500X, ölçek: 0,5 µm. Nükleus (asteriskler), otofagozom (beyaz ok), dejenere mitokondriyonlar (siyah ok başları)	49
Şekil 4.23. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), dejenere mitokondriyonlar (siyah ok başları), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:20000X, ölçek: 2 µm	50
Şekil 4.24. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:12000X, ölçek: 2 µm	50
Şekil 4.25. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:12000X, ölçek: 2 µm	51
Şekil 4.26. HT22 hücrelerine uygulanan iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 8 Gy radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme:5000X, ölçek: 5 µm. (B) Büyütme:15000X, ölçek: 2 µm. Nükleus (asteriskler), izolasyon membranı (kalın siyah oklar), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), mikronükleuslar (sarı ok başları)	51
Şekil 4.27. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (kalın siyah oklar), Büyütme:10000X, ölçek: 2 µm	52
Şekil 4.28. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (kalın siyah oklar), filopodia (kalın beyaz ok). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm	52
Şekil 4.29. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme:15000X, ölçek: 2 µm	53
Şekil 4.30. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), mikronükleus (sarı ok başı), lizozom (kırmızı ok), veziküller (mavi ok). Büyütme:15000X, ölçek: 2 µm	53
Şekil 4.31. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	54

	Sayfa
Şekil 4.32. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve zamana bağlı değişen koloni görüntüleri. %0,5'lik kristal violet	55
Şekil 4. 33. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen ve zamana bağlı değişen koloni sayısı grafiği (n=24)	55
Şekil 4.34. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve erken apoptoza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4)	56
Şekil 4.35. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve geç apoptoza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4)	57
Şekil 4.36. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve nekroza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4)	57
Şekil 4.37. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan grupların erken, geç apoptoz ve nekroza uğrayan HT22 hücrelerinin popülasyon oranlarının gösterilmesi. İşaretlenmemiş hücreler (A), Kontrol (B), 2 Gy_6 sa (C), 2 Gy_24 sa (D), 8 Gy_6 sa (E), 8 Gy_24 sa (F). (n=4)	58
Şekil 4. 38. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin <i>Nrf2</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	59
Şekil 4. 39. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin <i>Grn</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	60
Şekil 4. 40. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin <i>Bdnf</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	61
Şekil 4.41. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin <i>Dusp22</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	61
Şekil 4. 42. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin <i>C9orf72</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	62
Şekil 4.43. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve Şekil 3.4A'da özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan kolonileri. (A) G1-A, (B) G2-A, (C) G3-A, (D) G4-A, (E) G5-A, (F) G6-A, (G) G7-A, (H) G8-A, (I) G9-A, (J) G10-A, (K) G11-A, %0,5'lik kristal violet	63
Şekil 4. 44. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin Şekil 3.6A'daki gruplar arasındaki CKHKT testi sonucu ölçülen yüzde canlı kalan koloni oranı grafiği. Grup (G), radyasyon (Rad), makrofaj medyası (Mak), saat (s). (n=12)	63
Şekil 4. 45. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve Şekil 3.4B' de özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan kolonileri. (A) G1-B,	64

	Sayfa
(B) G2-B, (C) G3-B, (D) G4-B, (E) G5-B, (F) G6-B, (G) G7-B, (H) G8-B, (I) G9-B, (J) G10-B, (K) G11-B, %0,5'lik kristal violet	
Şekil 4. 46. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin Şekil 3.6B'deki gruplar arasındaki CKHKT testi sonucu ölçülen yüzde canlı kalan koloni oranı grafiği. Grup (G), radyasyon (Rad), makrofaj medyası (Mak), saat (s). (n=12)	65
Şekil 4.47. Tüm grupların (G1-G10) zamana bağlı (120 saat) gerçekleştirilen hücre indeks eğrisi (n=4)	66
Şekil 4.48. Zamana bağlı (120 saat) gerçekleştirilen hücre indeks eğrisi. (A) G1, G2, G3 ve G5 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi (B) G2, G3, G4, G5 ve G6 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi (n=4)	67
Şekil 4. 49. G2, G3 ve G5 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi. (A) G2, G3 ve G5 gruplarının 0- 120 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi (B) G2, G3 ve G5 gruplarının 36-72 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi (n=4)	67
Şekil 4. G1, G2, G3 ve G5 gruplarının 36-72 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi. (n=4)	68
Şekil 4.51. HT22 hücre hattının kontrol grubunun ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyütmesi: Normal yapıda nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar), nükleolus (N). Objektif büyüklüğü:100X; ölçek:10 µm	69
Şekil 4. 52. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), dev polimorfonükleer hücre (siyah yıldız). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm	70
Şekil 4. 53. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), mikronükleus (sarı ok başı). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm	70
Şekil 4. 54. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), mikronükleus (sarı ok başı). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm	71
Şekil 4. 55. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), apoptotik hücreler (A). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm	71
Şekil 4. 56. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulanmayıp sadece KM ile muamele edilen sham grubunun 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10 µm	72
Şekil 4.57. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin ışık mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı azalma gösteren izolasyon membranı (siyah	73

kalın ok) ve sayısı azalma gösteren mikronükleuslar (sarı ok başları). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10µm	
Şekil 4. 58. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin ışık mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı azalma gösteren veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10 µm	73
Şekil 4. 59. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	74
Şekil 4. 60. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm	75
Şekil 4. 61. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asterisk), mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 20000X, ölçek: 1 µm	75
Şekil 4.62. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleuslar (asteriskler), sayısı artmış mikronükleuslar (sarı ok başları), filopodalar (kalın beyaz oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), sayısı artmış veziküller (mavi oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	76
Şekil 4.63. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı artmış veziküller (mavi oklar) ve sayısı artmış otofagozomlar (beyaz oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	77
Şekil 4.64. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme:5000X, ölçek: 5 µm	77
Şekil 4.65. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki bozulmuş kromozom morfolojisinin (kırmızı asteriskler) elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	78
Şekil 4.66. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	79
Şekil 4.67. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.	79
Şekil 4.68. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	80
Şekil 4.69. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	80
Şekil 4.70. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	81

	Sayfa
Şekil 4.71. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asterisk), mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	81
Şekil 4.72. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm	82
Şekil 4.73. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm.	82
Şekil 4.74. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm	83
Şekil 4.75. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	83
Şekil 4.76. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm	84
Şekil 4.77. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki erken apoptoz yüzdesi. (n=6)	85
Şekil 4.78. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki geç apoptoz yüzdesi. (n=6)	86
Şekil 4.79. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki nekrozis yüzdesi. (n=6)	86
Şekil 4.80. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki erken, geç apoptoz ve nekroz yüzdelерinin dağılımının gösterilmesi. İşaretlenmemiş hücreler_48. saat (A), işaretlenmemiş hücreler_72. saat (F), kontrol_48. saat (B), kontrol_72. saat (G), 8 Gy radyasyon_48. saat (C), 8 Gy radyasyon_72. saat (H), sham_48. saat (D), sham_72. saat (I), tedavi_48. saat (E), tedavi_72. saat (J). (n=6)	87
Şekil 4.81. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki <i>Nrf2</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	88
Şekil 4.82. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve Sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki <i>Grn</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	89

	Sayfa
Şekil 4. 83. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki <i>Bdnf</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	90
Şekil 4. 84. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki <i>Dusp22</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	90
Şekil 4.85. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki <i>C9orf72</i> mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4)	91
Şekil 4.86. Anti-Ki67 primer antikoru ile işaretlenmiş HT22 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki gruplar arası karşılaştırılması. (A-D, I-K) FITC, (E-H, L-O) Hoechst 33342. (A, E) Kontrol_48, (B, F) Rad_48, (C, G) Sham_48, (D, H) Ted_48, (I, L) Kontrol_72, (İ, M) Rad_72, (J, N) Sham_72, (K, O) Ted_72. Objektif büyütmesi: 40X. (n=5)	92
Şekil. 4.87. Gruplar arası farklı zaman noktalarındaki (48 ve 72. saat) anti-Ki67 primer antikoru ile işaretlenmiş HT22 hücrelerinin işaretlenme yoğunluklarının karşılaştırılması. (n=5)	92
Şekil. 4.88. Gruplar arası farklı zaman noktalarındaki (48 ve 72. saat) Hoechst 33342+/DAPI+ HT22 hücre sayılarının karşılaştırılması. (n=5)	93

KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amiloyid Lateral Sklerozis
AS	Akım Sitometri
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BT	Bilgisayarlı Tomografi
C9ORF72	Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CA	Cornu Ammonis
CKHKT	Canlı kalan hücre kolonisi testi
CR	Calretinin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DUSP22	Dual Specificity Phosphatase
EHN	Erişkin Hipokampal Nörogenez
eNKH	Erişkin Nöral Kök Hücre
ER	Endoplazmik Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
FTD	Frontotemporal Demans
GD	Gyrus Dentatus
GHT	Granüler Hücre Tabakası
GRN	Granülin
GSH	Glutatyon
Gy	Gray
HH	Hungtinton Hastalığı
HO	Hipokampal Oluşum
HP	Hipokampus
KM	Koşullandırılmış Medyum
MDA	Malondialdehid
MSC-KM	Mezankimal Kök Hücre ile Koşullandırılmış Medyum
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MT	Moleküler Tabaka
NH	Nörodejeneratif Hastalıklar
NPH	Nöral Progenitör Hücre
NRF2	Nükleer Faktör Eritroid 2- İlişkili Faktör

Kısaltma/Simgesi	Tanım
PH	Parkinson Hastalığı
PSS	Periferik Sinir Sistemi
RD	Radyasyon Duyarlı
RGB-NKH	Radial Glia Benzeri Nöral Kök Hücre
RGH	Radyal Glial Hücre
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RS	Radyosensitif
RT	Radyoterapi
SGT	Subgranüler Tabaka
SGZ	Subgranüler Zon
SI	Uluslararası Birim Sistemi
SOD	Süperoksit dismutaz
SS	Standart Sapma
St	Stratum
SVZ	Subventriküler Zon

1.GİRİŞ

Tedavi amaçlı kullanılan iyonize edici radyasyon (radyoterapi, RT), primer ve metastatik beyin tümörleri, merkezi sinir sistemi (MSS) odaklı lösemik lenfomalar ve baş boyun kanserleri de dahil olmak üzere, tüm kanser hastalarının %60'ında tek başına veya cerrahi ya da kemoterapi ile birlikte kullanılan esas tedavi biçimlerinden birisidir [1-3]. RT' nin kanseri tedavi ederken sağlıklı dokular üzerinde tahrip edici etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Örneğin, öğrenme ve hafıza gibi temel bazı bilişsel fonksiyonların ortaya çıkmasında önemli payı olan hipokampus (HP) dokusunun RT' den etkilenen başlıca dokulardan biri olduğu gözlenmektedir. Öte yandan, RT' nin HP üzerinde oluşturduğu patolojik sonuçların altında yatan hücresel ve moleküler düzeydeki etmenler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Erişkin Hipokampal Nörogenez (EHN) adı verilen nörobiyolojik süreçler sonucunda oluşan granüler nöronların lokal nöral ağda kurduğu bağlantıların, hipokampal fonksiyonların oluşmasında başrol oynadığı bilinmektedir. HP' nin gyrus dentatus'unda (DG) gerçekleşen hipokampal nörogenez; her bir seferinde yeni doğan kök hücrelerin sayılarını arttırdığı, aşamalı olarak farklılaştığı ve programlı hücre ölümlerinden sonra kalanların olgun ve fonksiyonel nöronlara dönüştüğü, tüm hayat boyunca işleyen bir nöron yapım döngüsü olarak adlandırılabilir [4-8]. Diğer yandan, öğrenme ve hafıza gibi önemli bilişsel işlevlerin ortaya çıkmasından sorumlu HP' deki nörobiyolojik olaylar, genetik ve çevresel birçok faktörün etkisi altındadır. Söz konusu liste oldukça uzun olmakla birlikte, bu tez kapsamının ana unsurlarından biri olan iyonize edici radyasyon maruziyeti, sağlıklı ve hipokampal bağımlı bilişsel fonksiyonlar üzerindeki önemli çevresel risk faktörlerinden biridir.

Baş bölgesi tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan RT işlemi, kanser odağını ortadan kaldırırken, sağlıklı beyin dokusu üzerinde oluşturduğu hasardan dolayı kısa süreli veya kalıcı bilişsel sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Çalışmamız, özellikle tedavi amaçlı uygulanan RT'nin oluşturduğu etkiler ile ilgilenmektedir. Amacımız, kanser tedavisinde kullanılan RT'nin limbik sistemin önemli anatomik yapılarından biri olan ve öğrenme ve hafıza başta olmak üzere, normal bilişsel fonksiyonların düzenlendiği, aynı zamanda stres, anksiyete gibi anormal durumlara karşı direncin yönetildiği bir beyin bölgesi olan [4,5] HP üzerinde oluşturduğu tahrip edici etkisini incelemektir. Bunun için ilk olarak, HT22 fare hipokampal nöral hücre hattını kullanarak, hücreleri iyonize edici radyasyona maruz bırakıp *in-vitro* düzeyde RT'yi modelleyip, daha sonrasında radyasyonun olumsuz etkilerini immünoterapi yaklaşımıyla *in-vitro* olarak onarmaktır.

Bu çalışmada ilk olarak, HT22 hücreleri için literatürden seçilen en uygun iki farklı radyasyon dozu belirlenmiştir. Bu dozların zamana bağlı hücreler üzerinde oluşturduğu değişiklikler, morfolojik düzeyde ışık ve elektron mikroskopisiyle ve farklı seviyelerdeki apoptotik

etkileri akım sitometrisi ve canlı kalan hücre kolonisi testi ile incelenmiştir. Buna paralel, iki farklı doz uygulandıktan sonra farklı zamanlarda, HT22 hücrelerinde nöroinflamasyon, proliferasyon, nörogenез ve apoptotik/anti apoptotik olaylarda rol oynadığı bilinen bazı genlerin (*Nrf2*, *Grn*, *Bdnf*, *Dusp22*, *C9orf72*) ifadeleri kantitatif-RT-PCR yöntemi ile analiz edilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızın ilk basamağında gerçekleştirilen değerlendirmeler neticesinde, bir sonraki basamaktaki *in-vitro* kraniyal RT modelinin ana hatları belirlenmiştir. İkinci basamakta, iyonize edici radyasyonun HT22 hücreleri üzerinde oluşturduğu çeşitli düzeylerdeki hasarın, *in-vitro* ortamda makrofaj (RAW264.7 hücre hattı) medyumunu (Koşullandırılmış Medyum, KM) kullanılarak onarılması amaçlanmıştır. Böylece, radyasyona bağlı olarak çalışma düzeni bozulan hücrelerin, makrofaj medyumundaki parakrin yollarla, radyasyonun HT22 hücrelerinde oluşturduğu hücresel ve moleküler hasarları onarabileceği veya azaltabileceği hipotezi kurulmuş ve sonuçlar bu çerçevede tartışılmıştır.



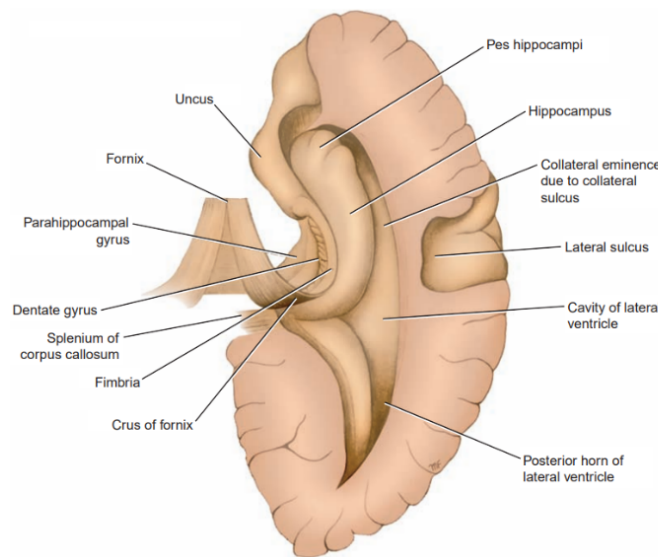
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Hipokampus

2.1.1. Anatomisi ve Histolojisi

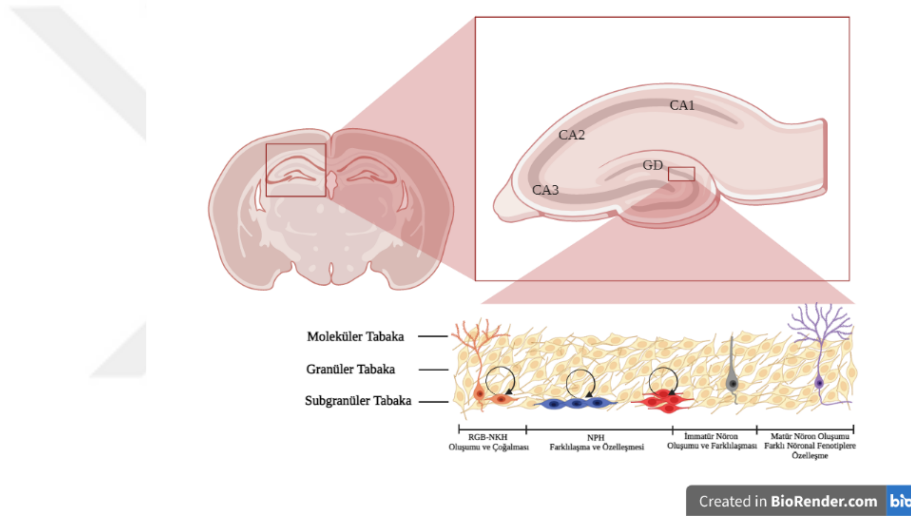
Beynin hafıza işleme, öğrenme, karar verme, uzamsal konumlanma ve duygularla ilişkili, limbik sisteminin bir parçası olan hipokampal oluşum (HO), hipokampus (HP), HP'nin yüzeyi olan alveus, fimbria hipocampi ve gyrus dentatustan (GD) oluşmaktadır [9–13] (Şekil 2.1). Hipokampal oluşumun önemli bir parçası olan HP, morfolojik olarak denizatına benzediğinden dolayı, Yunanca denizati anlamına gelecek şekilde (Yunanca: ιππος, hippos = at, κάμπος, kampos = deniz) isimlendirilmiştir [14]. Hipokampus, kısa süreli hafızayı (epizodik hafıza) uzun süreli hafızaya dönüştürür, uzamsal belleği çözer ve yerlerin geçmiş deneyimlerini hatırlamamızı sağlar. Aynı zamanda bir kişinin duygu ve davranışlarında önemli bir rol oynar [9].

İnsan beyinde, yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda olan ve lobus temporalisin derinlerine yerleşmiş olarak bulunan HP, ventriculus lateralisin cornu inferiusunun tabanı boyunca uzanmaktadır [9,11] (Şekil 2.1). Hipokampusun ventriküllere bakan yüzeyi konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzeyi ise konkavdır ve pes hipokampi denilen geniş bir ön uca sahiptir [11,15] (Şekil 2.1). Kemirgenlerde ise HP, neokorteksin altında yer alan ve nispeten büyük, kaju şeklinde bir yapıdır [16]. HP'nin uzunlamasına eksenine genelde dorsal-ventral eksen denir. Dorsal HP, primatların arka HP'sine denk gelir ve HP'nin en rostral kısmıdır. Daha kaudal seviyelerde ise ventral olarak kıvrılır. Ventral HP, primatların ön HP'sine karşılık gelmektedir ve amigdala ve prefrontal korteks ile bağlantılıdır [16,17].



Şekil 2.1. İnsan beyinde hipokampus, dentat girus ve forniksi gösteren, lateral ventrikül boşluğunu açığa çıkaran sağ beyin hemisferinin gösterilmesi [11].

Koronal beyin kesitlerinde C harfi şeklinde görülen HP, HP'nin farklı katmanlarını tanımlayan ve koç boynuzuna benzeyen Cornu Ammonis 1 (CA1), CA2, CA3 ve CA4 hipokampal alt alanlarından ve GD olarak uzanan bölgeden meydana gelir. CA1 subikuluma, CA4 ise GD'a en yakın olan bölgedir [9,13,14,17,18]. Kemirgenlerde ise CA1, CA2, CA3 hipokampal alt alanlarından ve GD'den oluşmaktadır [9,17,18] (Şekil 2.2). CA bölgelerinin boyutları hipokampal segmentlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, hipoksiye duyarlılıklarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre, CA1 hipoksiye karşı hassas bir alan olarak bilinirken CA3'ün daha dirençli olduğu düşünülmektedir [9]. HP, histolojik olarak 4 ile 7 tabaka arasında olduğu literatürde değişkenlik göstermekle birlikte, temel olarak GD'ye en uzak alandan başlayarak alveus, Stratum (St.) oriens, St. pramidalis, St. lusidum, St. radiatum, St. lakünozum ve St. molekülare tabakalarından oluşmaktadır [14,19,20].

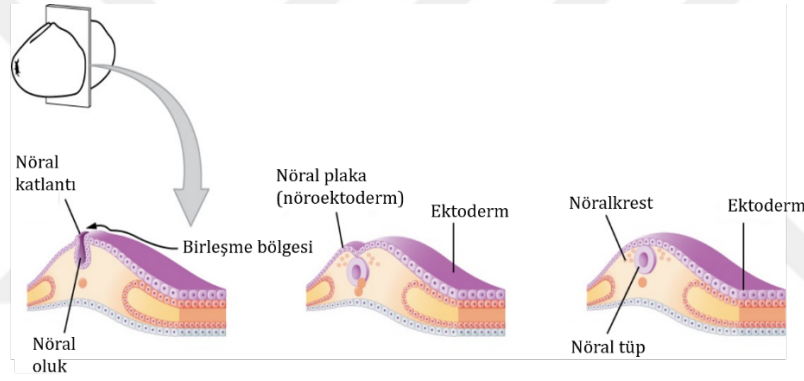


Şekil 2.2. Kemirgen koronal beyin kesitinde hipokampusteki CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinin ve GD'deki erişkin hipokampal nörogenezin şematik olarak gösterilmesi. Cornu Ammonis: CA, Radial Glia Benzeri Nöral Kök Hücre: RGB-NKH, Nöral Progenitor Hücre: NPH.

Hipokampusün bir diğer tabakası GD'dir ve insanlarda U şeklinde bir yapı olup adını morfolojik olarak dişli görünümünden almaktadır [9]. GD, histolojik olarak, GD'nin en yüzeydeki tabakası olan moleküler tabakadan (MT), GD'nin ana nöronları olan, granüler hücre gövdelerinin bulunduğu ve 6-8 tabakadan oluşan granüler hücre tabakasından (GHT), subgranüler tabakadan (SGT) ve GD'nin en iç kısmında, polimorfik tabaka olarak da isimlendirilen, GHT aksonlarının, sepet hücrelerinin (basket cell), yosunsu hücrelerin (mossy cell) ve GABAerjik ve glutamerjik internöronların bulunduğu hilustan oluşmaktadır [21-23] (Şekil 2.2). HP'de en temel hücresel işleyiş olarak bilinen EHN, GD'deki tek bir hücre tabakası olan SGT'de meydana gelmektedir. Bu hücre tabakasında nörogenez, radyal glia benzeri nöral kök hücrelerin (RGB-NKH) sessiz evreden çıkıp, çoğalarak nöral progenitor hücrelere (NPH) farklandığı, bir kısmının apoptoza uğradığı ve en sonunda fonksiyonel olgun nöronlara dönüştüğü süreçte gerçekleşmektedir [6-8,23-25].

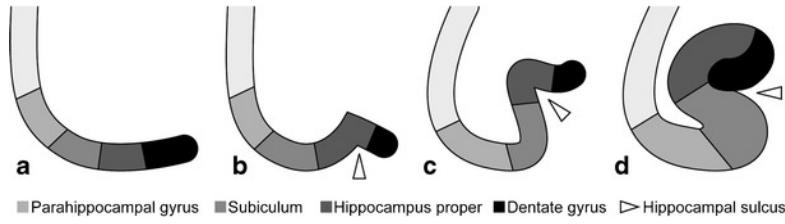
2.1.2. Embriyonik Gelişimi

Merkezi sinir sisteminin (MSS) embriyonik olarak gelişimi, nöral ektodermin belirip nöral tüpün oluşumunu takiben, nörolasyon olarak bilinen bir süreçle nöroektodermal (nöroepitelyal) hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasıyla başlamaktadır [26,27] (Şekil 2.3). Nörogenез başladığında, nöral tüpteki tüm nöroepitelyal hücreler radyal glial hücrelere (RGH) dönüşür. Birkaç nöron doğrudan nöroepitelden gelişse de RGH'ler, hem nöronlar hem de glial hücrelerin progenitörlerine farklanır [28,29]. RGH'ler, perinatal ve postnatal dönemde parankimal astrositlere ve ependimal hücrelere dönüşür ya da lateral ventriküllerin duvarında (subventriküler zon, SVZ) ve hipokampüsteki GD'nin subgranüler zonunda (SGZ) erişkin nöral kök hücreler (eNKH) olarak da gelişmektedir [30]. Bu bölgelerdeki olgunlaşmamış nöroblastlar, SVZ'de farklı nöron tiplerine dönüşürken, SGZ'de tek nöron tipi olan granüler nöronlara farklanmaktadır [30–33].



Şekil 2.3. Nöral tüpün embriyonik gelişiminin şematik gösterilmesi [34].

Embriyonik olarak, telensefalonun medial bölgelerinden gelişen HP, erken fetal hayatta temporal lobun medial duvarı ve tabanı boyunca hipokampal fissür ile çevrili, katlanmamış bir yapıda, düz bir kortikal plaka olup, serebral hemisferin inferomedial yüzeyi boyunca, gelişim sırasında C şeklindeki koroid fissürünün dış sınırını takip eder [14,35,36] (Şekil 2.4). Fetal dönemin ilerleyen haftalarında, çeşitli bileşenlerin kademeli olarak katlanması, neokorteksin genişlemesi ve birçok hipokampal yapının eşit olmayan büyümesinin bir sonucu olarak GD ve CA içe doğru katlanmaya başlar [35]. Katlanma, ilk başlarda GD ve CA arasında gelişirken daha sonra GD ve subikulum arasında bir konuma kayan ve hipokampal sulkus olarak isimlendirilen sulkusun çevresinde gerçekleşmektedir [35] (Şekil 2.4). Bu süreçte sulkus hala açıkken gelişimin sonlarında hipokampal sulkus oblitere olur [35]. 20. haftalarda, fetal hipokampus erişkin hipokampusuna benzemeye başlar [14,27,35,36] (Şekil 2.4) ve nihayetinde, anatomik olarak temporal lobun medial kısmında gömülü olarak yerleşim gösterir [9,15,20].



Şekil 2.4. Hipokampusün fetal gelişiminin şematik olarak gösterilmesi [35].

2.2. İyonize Edici Radyasyon

Radyasyon, ısı, ışık, mikrodalgalar, X-ışınları, radyoaktif elementlerden yayılan ışınlar gibi bir kaynaktan yayılan elektromanyetik dalga veya parçacıklar biçimindeki enerji yayılımıdır ve iyonize edici ve iyonize edici olmayan olarak sınıflandırılmaktadır [37–39]. İyonize edici olmayan radyasyon, görünür ışık, kızılötesi ışınlar, radyo dalgaları, mikrodalgalar ve güneş ışığı gibi kaynaklar olup iyonize edici olan radyasyona göre daha az enerjiye sahiptir [40,41]. Alfa (α), beta (β), gamma (γ), X-ışını ve nötron radyasyonu (n) gibi iyonize edici radyasyon ise atomların etrafındaki elektronları yörüngelerinden dışarı çıkartabilir, elektron/proton dengesini bozabilir ve atoma pozitif bir yük kazandırabilir [40]. Tıp alanında, kırık kemikleri tespit etmek veya hastalıkları teşhis etmek amacıyla röntgen cihazlarında veya nükleer tıpta radyoaktif izotoplar ile kanser gibi hastalıkları teşhis ve tedavi etmek için iyonize edici radyasyon kullanılmaktadır [40]. Curie, Becquerel gibi aktivite birimleri, Roentgen gibi maruz kalma birimleri, efektif doz birimleri veya Gray (Gy) gibi doz birimleri şeklinde çeşitli şekillerde sınıflandırılrsa da günümüzde en sık kullanılan ve geçerli olan doz birimi Gy'dir [39]. Uluslararası Birim Sistemine (SI) göre Gy, bir kg maddenin soğurduğu bir jul (10^7 erg) radyasyon enerjisi olarak tanımlanmaktadır [39].

2.2.1. İyonize Edici Radyasyonun Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri

19. yüzyılın sonlarında X-ışınlarının keşfiyle birlikte, iyonize edici radyasyonun biyolojik sistemler üzerindeki etkisinin incelenmesi, ilk olarak Becquerel'in doğal radyasyon kaynaklarının inflamatuvar cilt yanıklarına neden olabileceğini göstermesiyle başlamıştır ve halen de önemli bir konu olarak çalışılmaya devam edilmektedir [42]. Günümüzdeki ortak kanı, radyasyonun etkisinin uygulanan fraksiyon başına doz büyüklüğüne ve/veya süresine bağlı olarak hücre ve/veya doku tipi farklılıklarına göre değişkenlik gösterdiğidir [42–49].

Radyasyonun hücreler üzerindeki etkisi, direkt ve indirekt etki olarak ikiye ayrılmaktadır [43]. Direkt etki sonucu radyasyon, DNA üzerinde tek ya da çift zincir kırıkları yaratarak hücrelerin mutasyona uğramasına, hücre siklusunda aksamalara veya hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmaktadır [43,48,50]. İndirekt etkide ise radyasyon sonucu hücrelerde hidrojen

peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) salınmasına bağlı olarak, lipid peroksidasyonuna, yanlış protein katlanmalarına, endoplazmik retikulum (ER) stresine, DNA kırıklarına ve mitokondriyal hasara neden olarak, dolaylı yollardan hücrelerin apoptozise uğradığı görülmektedir [43,48,50].

2.2.2. Radyoterapi

Radyoterapi (RT), X ışınları gibi, iyonize edici radyasyonun vücutta belli bir dokuya yoğun bir şekilde uygulanarak, kanserli dokunun yok edilmesini amaçlayan ve birçok ölümcül kanser tipinin tedavisinde güçlü bir araç olarak sıklıkla kullanılan bir tedavi biçimidir [48,51,52]. Günümüzde kanser hastalarının %50-60'ından fazlasında RT ile birlikte cerrahi ve/veya kemoterapi hem tedavi edici amaçlı hem de palyatif amaçlarla kullanılmaktadır [51,52]. RT, kanser hücrelerinde ROT üretilmesi sonucu, DNA hasarı yaratarak ya da ER ve mitokondriyon gibi organellerde stres yanıtı oluşturarak, apoptotik sinyallerin aktivasyonunu başlatıp hücre ölümünü indükleyerek bu hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır [50,53-55]. RT'de gözlenen olumlu gelişmelerin yanı sıra, kanser hücrelerinde radyorezistansın gelişmesi ve radyasyonun kanser odağı dışındaki sağlıklı doku/lar üzerinde de etkisini göstererek, bu dokularda tahribata yol açması, bu tedavi biçiminin en önemli yan etkileri olarak kabul edilmektedir [47,53].

Öğrenme ve hafıza başta olmak üzere çeşitli bilişsel fonksiyonların ortaya çıkması ile yakından ilişkili olan HP'nin, RT kaynaklı direkt ya da indirekt radyasyon maruziyetinden olumsuz yönde etkilendiği ve RT gören hastaların kısa ve/veya uzun vadeli bilişsel fonksiyon bozuklukları ile yüzleştikleri bilinmektedir [56-61]. Aslında, MSS en radyosensitif (RS) sistem olarak kabul edilmese de bu sistemdeki organlarda meydana gelen radyasyon kaynaklı hasarların nedenlerinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Çünkü özellikle sağlık ve yaşam kalitesi açısından yıkıcı etkileri bulunan radyasyon hasarının bu etkilerinin onarılması oldukça güçtür [62]. Klinikte gözlenen bu olgunun *in-vivo* ve *in-vitro* modeller üzerinde taklit edilerek çeşitli düzeylerde (davranışsal, hücresel ve moleküler) incelendiği bir araştırma alanı uzun süredir varlığını sürdürmektedir. Literatürde, radyasyon maruziyeti sonrasında kısa veya uzun dönem hafızasındaki önemli bazı yolların düzeninin bozulduğu ve HP'de bulunan kök hücre popülasyonunun harabiyete uğradığı anlaşılmıştır [63-73]. Nöral kök hücreler üzerindeki radyasyona bağlı olarak gözlenebilen yıkıcı etki, farklılaşmamış kök hücrelerin farklılaşmış hücrelere kıyasla radyasyona karşı daha hassas, yani radyasyon duyarlı (RD) olmalarıyla açıklanabilmektedir [65,72-74]. Bu durum göz önüne alınarak, radyasyonun etkisini giderebilecek birtakım radyoprotektif ilaçlar tasarlanmış, bu ilaçlar *in-vitro* düzeyde kendilerini

kanıtlamış fakat *in-vivo* olarak başarılı biçimde tekrar edilememeleri sebebiyle büyük çoğunluğu gelişim aşamasında kalmıştır [75–77].

Literatür incelendiğinde, kök hücrelerin ve farklılaşmış hücrelerin radyasyona bağlı oluşan DNA hasarına farklı cevaplar oluşturup oluşturmadığı, kök hücrelerin radyasyon maruziyetinden sonra hasar tamir yoluyla yaşamda kalmak değil de hücre ölüm yoluna gitmek biçiminde mi programlandığı, eğer öyle ise bu programlanmanın hangi faktörlerle düzenlendiği, kök hücrelerin radyasyon hassasiyetini kontrol eden mekanizmaların neler olduğu, radyasyona bağlı oluşan hasarı başarılı biçimde geri döndürmenin mümkün olup olmadığı gibi birçok sorunun hala cevaplanmaya açık olduğu görülmektedir [78–80].

2.2.3. Radyoterapi ve İmmünoterapi

Klasik RT, radyasyon tedavisi sonucunda hücre içi mekanizma tahribatının ve DNA hasarının aracılık ettiği hücre ölümüne odaklanarak tümörü yok etmeyi amaçlamaktadır [81]. İmmünoterapi, kanser tedavisinde kullanılan RT ya da kemoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarının aksine daha yenilikçi bir tedavi biçimi olup immün sistemi modüle ederek, kanser hücrelerine çok yönlü ve farklı hedeflerden saldırarak kanser hücrelerini ortadan kaldırmayı amaçlayan bir tedavi biçimidir [82]. Onkolojide, immün hücreler ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler uzun zamandır araştırılmaktadır [83]. Bağışıklık sistemi, kanser gelişiminde hem kanser hücrelerinin büyümesini engelleyerek veya yok edilmesini sağlayarak hem de hayatta kalmaya daha uygun tümör hücrelerini seçerek veya tümörün büyümesini kolaylaştıran ortamlar oluşturarak tümör ilerlemesini de destekleyecek şekilde ikili bir rol oynamaktadır [84]. Bu olguyu Schreiber ve ark. “kanser immüno-düzenleme” olarak isimlendirilmiştir ve bu düzenleme karmaşık bir dizi mekanizmayla açıklanmaktadır [85]. Günümüzde uygulanan immünoterapi yaklaşımları bu olgudan faydalanarak, tümöre karşı oluşturulan immün yanıtını yeniden etkinleştirmek ve tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına yol açan yolların üstesinden gelmeye çalışarak bağışıklık sistemini manipüle etme şeklindedir [86].

İmmünoterapi ile birlikte uygulanan radyasyon, sistemik kanser tedavisinin önemli bir bileşenidir. Retrospektif veriler ve ileriye dönük klinik araştırmalar, immünoterapi ile kombine yaklaşımların, hastalarda radyasyon tedavisinin iyileştirici kapasitesini ve hasta sağ kalım oranlarını artırdığını göstermektedir [83]. Ayrıca, terapötik potansiyeli olan radyasyon ve immünoterapi kombinasyonlarının klinik testleri için çok miktarda olumlu klinik öncesi çalışmalar bulunmaktadır. Ancak yine de bu yaklaşımın daha fazla test edilmesi için daha fazla klinik öncesi çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [83].

İmmünoterapi, kanser hücreleri üzerinde *in-vivo* veya *in-vitro* ortamda uygulanmış ve bu yaklaşımın birçok çalışmada olumlu sonuçları gözlemlenmiştir [83]. Bu sebeple çalışmamızda, bu

hipotezden yola çıkarak, radyoterapinin kanser hücreleri yerine sağlıklı dokulara verdiği hasarı *in-vitro* ortamda immünoterapi yaklaşımıyla tedavi etmeyi amaçladık.

2.2.4. Fare Hipokampal Nöronal Hücre Hattı (HT22) ve Radyasyon Çalışmaları

HT22 hücreleri, fare HP dokusundan elde edilmiştir ve HT4 hücrelerinin bir subklonu olup nöral özelliklere sahip ve glutamata karşı aşırı duyarlıdır. Bu nedenle, bu hücre hattı literatürde çoğunlukla Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkları *in-vitro* ortamda modellemek için kullanılmaktadır [87–90]. Ancak bu tez çalışması kapsamında HT22 hücreleri, *in-vitro* kranial radyoterapiyi modellemek amacıyla kullanılmıştır. Bu sebeple, literatür incelenmiş olup HT22 hücreleri üzerinde yapılan bazı iyonize edici radyasyon çalışmaları, radyasyon kaynağı, uygulanan dozlar, radyasyon sonrası bekleme süreleri, çalışmada değerlendirilmiş olan biyolojik olaylar ve bulgular şeklindeki bazı başlıklarda bir tabloda özetlemiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. HT22 hücre hatları ile yapılan bazı iyonize edici radyasyon çalışmalarının özetlenmesi

Radyasyon Kaynağı	Uygulanan Dozlar	Radyasyon Sonrası Bekleme Süreleri	Değerlendirilen Biyolojik Olaylar	Bulgular	Kaynaklar
X-ışını	5 Gy 10 Gy 15 Gy	24 sa?	Morfoloji Canlı kalan hücre kolonisi testi Gen ve protein ekspresyonu	Mezenkimal kök hücre medyumuna ile oksidatif stresi ve apoptozu bastırarak hipokampal nöronları radyasyon hasarından koruyabilmektedir	[91]
X-ışını	4 Gy	24 sa	Canlı kalan hücre kolonisi testi Gen ve protein ekspresyonu	Honokiol tedavisi, ışınlama hasarı modelinde ROS, TNF- α ve IL-1 β seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca, SIRT3 ekspresyonunu arttırmış ve COX-2 ekspresyonunu azaltmıştır	[92]
X-ışını	4 Gy 6 Gy 8 Gy 10 Gy 12 Gy	30 dk 1 sa 24 sa 48 sa 72 sa	Apoptozis Hücre siklusu Canlı kalan hücre kolonisi testi	Minocycline radyasyon hasarına karşı otofajiyi engelleyebilir	[77]
X-ışını	6 Gy	24 sa	Canlı kalan hücre kolonisi testi Gen ve protein ekspresyonu	Sodyum valproat Nrf2/HO-1 aktivasyonu ile hipokampal nöronlarda radyasyona bağlı hasarları önleyebilir	[76]

Tablo 2.1. HT22 hücre hatları ile yapılan bazı iyonize edici radyasyon çalışmalarının özetlenmesi (devamı)

X-ışını	2 Gy 4 Gy 6 Gy 8 Gy	6 sa 24 sa	Apoptozis Canlı kalan hücre kolonisi testi Protein ekspresyonu	shRNA ile Egr1 ekspresyonunun ortadan kaldırılması ile radyasyona uğramış HT22 hücrelerinde apoptoz azalıp hücrel sağ kalım artmıştır	[93]
γ-ışını	0.5 Gy 1 Gy 4 Gy	4 sa 24 sa	Sinaptogenez Kütle spektrofotometrisi Gen ve protein ekspresyonu	İyonize edici radyasyon, HT22 hücrelerinde sinaptik plastisite ile ilişkili hücre iskeleti sinyal yollarını bozmaktadır	[94]
X-ışını	2 Gy 3 Gy 4 Gy 6 Gy 8 Gy	6 sa 16 sa 24 sa	Apoptozis Canlı kalan hücre kolonisi testi Protein ekspresyonu	Glikojen sentaz kinaz 3β inhibitörleri, MDM2- p53 yolunu düzenleyerek hipokampal nöronları radyasyona bağlı apoptozdan korumaktadır	[95]
γ-ışını	3 Gy	15 dk 30 dk 1 sa 4 sa 8 sa 24 sa	DNA hasarı Gen ve protein ekspresyonu	Glikojen sentaz kinaz 3β inhibisyonu, radyasyona maruz bırakılmış hipokampal nöronlarda DNA çift sarmal kopmalarının onarımını arttırmaktadır	[96]

2.3. Nöroinflamasyon, Proliferasyon, Apoptoz ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkili Bazı Genler (*Nrf2*, *Grn*, *Bdnf*, *Dusp22* ve *C9orf72*)

Bu çalışma kapsamında ekspresyon düzeyleri incelenen genler, nöroinflamasyon, proliferasyon, apoptoz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bir çok biyolojik olayla ilişkili olduğu bilinen ve literatürden seçilmiş genlerdir.

Nükleer faktör eritroid 2- ilişkili faktör (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, *Nrf2*), hücreyi oksidatif strese karşı koruyan genlerin ekspresyonunu kontrol eden hücrel antioksidan yanıtın en önemli düzenleyicilerinden biridir [97–99]. *Nrf2* ekspresyonunun herhangi bir sebeple bozularak tehlikeye girmesi durumunda, *Nrf2* hücrelerde antioksidan ve antiinflamatuvar yanıt oluşturulmasını başlatmak için çekirdeğe geçiş yapabilmektedir [98,100]. Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların çoğunda *Nrf2* bozuklukları gözlenmektedir [99,100]. Oksidatif stresin artması, hafıza bozuklukları ve sinaptik plastisitenin zarar görmesi ile ilişkilendirilmektedir. Kemirgen modellerinde, *Nrf2* aktivatörlerinin uygulanması sonucunda, hafıza ve sinaptik plastisite bozukluklarını tersine çevirdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, *Nrf2*

aktivatörleri, Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklar için potansiyel bir yeni terapötik ajan olarak düşünülmektedir [100]. Hücrelerin radyasyona karşı gösterdiği hücresel yanıtta *Nrf2* gen ekspresyonunun düzenlenmesi önemli bir role sahiptir. Birçok çalışmada, *Nrf2* eksikliğinin radyosensitivite ile ilişkili olduğu ve *Nrf2*'nin aşırı ekspresyonunun hücrelerde radyorezistansa neden olduğunu gösterse de *Nrf2*'nin radyasyon tepkisine aracılık etmesindeki rolü hücreden hücreye değişmektedir [101].

Granülin (*Grn*), *Grn* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Lizozomal proteinleri kodlayarak hücrenin lizozom homeostazında görev almaktadır [102–105]. Bu gendeki mutasyonların lizozomal enzimatik aktiviteyi azalttığını ve nörodejenerasyonu başlatıcı faktörlerden biri olduğunu göstermektedir [103–105]. Ayrıca, yapılan çalışmalar bu gendeki mutasyonların, amiotrofik lateral sklerozis (ALS), frontotemporal demans-GRN'ye (FTD-GRN) veya nöronal ceroid lipofuscinosis'e neden olduğunu belirtmektedir [106–108].

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor, *Bdnf*) memeli beyinde yaygın olarak üretilen ve üzerinde en çok çalışılan nörotrofinlerden biri olup glutamaterjik ve GABAerjik sinapsların uygun bir şekilde büyümesi, gelişmesi ve plastisitesinde önemli bir rol oynamaktadır [109,110]. *Bdnf*'nin nörotrofik etkisine ek olarak, anti-apoptozis, anti-oksidasyon ve otofajinin baskılanması gibi diğer nöroprotektif etkileri de bulunmaktadır [111]. Ayrıca, *Bdnf* nöronal farklılaşmanın düzenlenmesinde serotonerjik ve dopaminerjik nörotransmitter aktivitesinde önemli bir role sahiptir [109]. Yapılan çalışmalar, *Bdnf*'nin inflamasyonla ilişkili depresyonda, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve beyin kanserlerinde önemli bir terapötik ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir [109,111–114].

İkili özgül fosfataz (Dual Specificity Phosphatase; *Dusp22*), *Dusp22* geni tarafından kodlanan bir proteindir ve JKAP veya JSP-1 olarak da isimlendirilmektedir [115,116]. Çok sayıda dokuda eksprese edilen *Dusp22*, bağışıklık yanıtı ve tümör büyümesi gibi bazı biyolojik işlevlerde etki göstermektedir [116–119]. Ancak, literatürde *Dusp22* ile ilgili sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır ve etkileri hala bilinmemektedir.

C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72) transkriptleri ise birçok dokuda aktivite göstermekle birlikte özellikle tüm beyin bölgelerinde ve omurilikte yüksek oranda bulunmaktadır [120–122]. Yapılan çalışmalarda, *C9orf72* eksikliğinin, ALS gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve frontotemporal demansta (FTD) fenotipe kesinlikle bir katkısının olduğu göstermektedir, ancak etkisi henüz tam olarak anlaşılmamaktadır [120,122,123]. Primer embriyonik fare motor nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada, *C9orf72*'nin aşırı ekspresyonunun daha uzun aksonlara ve artan büyüme konisi boyutuna yol açtığı, buna karşılık ekspresyonun azalmasının aksonal uzunluğun azalmasına ve daha küçük büyüme konilerine neden olduğu gösterilmiştir [124]. Bu

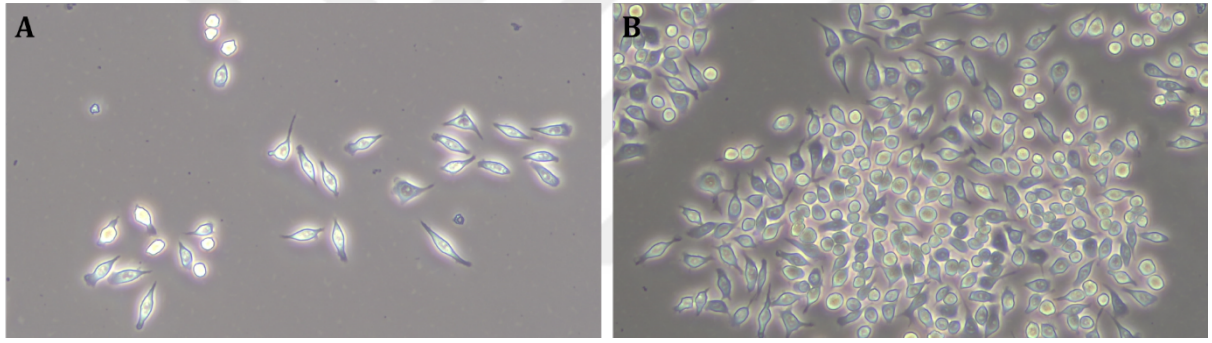
bulguların dışında, başka bir çalışma *C9orf72*'deki herhangi bir mutasyonun, Rab protein aktivitesini azaltarak hücre içindeki endo-lizozomal yolun işlevinde bozukluğa neden olup protein agregatlarının birikmesine yol açtığını göstermektedir [125]. *C9orf72*, nörodejenerasyon, inflamasyon ve çevre ile bağışıklık sisteminin etkileşiminin düzenlenmesinde yeni bir protein olarak görülmektedir [120]. Dahası, *C9orf72*'nin işlevleri hakkında artan çalışmalar, bu proteinin, otofaji ve inflamasyonla ilişkili bir kompleksin parçası olduğunu ortaya çıkarmaktadır [120,126].



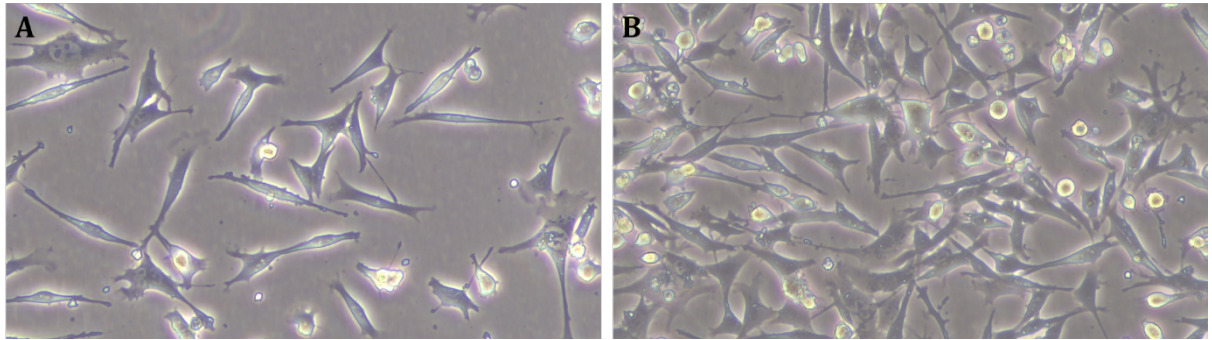
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Deneylerde HT22 hücre hattı (fare hipokampal nöronal hücre hattı; MERCK SCC129: Lot 3159205) ve RAW264.7 hücre hattı (fare makrofaj hücre hattı; ATCC TIB-71) kullanılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Bu hücre hatları, Mersin Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı hücre stokunda mevcuttur ve buradan temin edilmiştir. Deney süresince HT22 ve RAW264.7 hücrelerinin çoğaltılması, pasajlanması, dondurularak saklanması, sayımı ve canlılık testleri gibi işlemler, Mersin Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'nda bulunan hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında, hücre kültürü deneylerinin tutarlılığını sağlamlaştırmak amacıyla ve literatürde HT22 hücre hatları ile ilgili önerilen pasaj aralıkları olmasından dolayı, her 2 hücre hattı için de 3 ve 8. pasaj arasındaki (P3-P8) dondurulmuş hücre stokları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Fare makrofaj hücre hattının (RAW264.7) genel morfolojik görüntüsü. (A) Hücrelerin az yoğun olduğu görüntü, (B) Hücrelerin çok yoğun olduğu görüntü. Pasaj 6, objektif büyüklüğü:10X.



Şekil 3.2. Fare nöral hipokampal hücre hattının (HT22) genel morfolojik görüntüsü. (A) Hücrelerin az yoğun olduğu görüntü, (B) Hücrelerin çok yoğun olduğu görüntü. Pasaj 4, objektif büyüklüğü:10X.

3.1.1 Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanması ve Hücrelerin İnkübe Edilmesi

HT22 ve RAW264.7 hücre hatları için %10' luk fetal sıgır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS, (Katolog No: ES-009-B); %1'lik penisilin ve streptomisin (Katolog No: TMS-AB2-C) ve 2mM L-Glutamin (Katolog No: TMS-002-C) ile takviye edilmiş yüksek glikozlu DMEM (High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium; HG-DMEM, Katolog No: D6546) medyum (katkılı medyum) hazırlanmıştır. Ayrıca, deneyler boyunca hücreler 37°C sıcaklık ve %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde tutularak, hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması

-80°C derin dondurucuda, özel dondurma tüplerinde (kriyo vial) donmuş halde bulunan hücrelerin istenilen sayıya ulaşması ve daha sonrasında deneylerde kullanılması amacıyla, çözündürme ve çoğaltma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler için standart çözme ve pasajlama işlemleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda, aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Bunun için,

- Hızlı bir şekilde 37°C' lik su banyosuna alınıp yaklaşık 1-2 dk bekletilmiş, donmuş haldeki hücre süspansiyonunun çözünmesi sağlanmıştır.
- Çözünen hücrelere yavaş bir şekilde birkaç kez pipetaj yapılmıştır.
- Kriyo vial içindeki hücreler 15 ml' lik Falcon tüpüne alınmıştır ve üzerine, hücrelerin osmotik şoka uğramaması için çok yavaş bir şekilde katkılı medyumdan 9 ml ilave edilmiştir.
- Yavaş bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra çözünmüş HT22 hücreleri 300 g'de 2-3 dk, RAW264.7 hücreleri 125 g'de 5-10 dk sanrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılarak aşağıda kalan pellete katkılı medyumdan 10 ml ilave edilip yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak hücrelerin birbirinden ayrılması sağlandıktan sonra tüm süspansiyon 75 cm²' lik yüzey alanına sahip (T75) flasklara ekilmiştir.
- Ekilen hücreler, standart koşullar altında, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatör içinde %70-80 konfluense ulaşana kadar kültüre edilmiş ve bu süre içinde 2-3 günde bir medyumları değiştirilmiştir.

%70-80 konfluens duruma ulaşan hücreler pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi için,

- Flask içindeki medyum uzaklaştırılıp 1-2 kez Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 1X) ile yıkanmıştır.

- Daha sonra flaskın bütün yüzeyini kaplayacak kadar %0,25 tripsin-EDTA (SM-2003-C) solüsyonu ilave edilip, hücreler 3-5 dk 37°C'de inkübe edilerek hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlanmıştır.
- Hücreler 15 ml'lik Falcon tüplere alınarak tripsin aktivitesini durdurmak için üzerlerine eşit hacimde katkılı medyum ilave edilmiştir.
- HT22 hücreleri 300 g'de 3 dk ve RAW264.7 hücreleri 125 g'de 10 dk santrifüj edilip tüpteki süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 5 ml medyum ilave edilmiş ve hücrelere yavaş bir şekilde pipetaj yapılmıştır.
- Hücre süspansiyonunun bir kısmı, hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla HT22 hücreleri için 1:10 dilüsyon oranında, RAW264.7 hücreleri için 1:3- 1:6 dilüsyon oranında, T75 tip flasklara, bir kısmı da sayım işlemi yapıldıktan sonra, deneylerin amacına bağlı olarak istenilen sayıda 6'lı, 96'lı kuyucuklu platelere (well plate), 2 cm'lik konfokal platelerine veya 25 cm²' lik yüzey alanına sahip (T25) flasklara ekilmiştir*¹ Ekim işlemi yapılan hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.²

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre çoğaltma işlemi sonrasında hücre süspansiyonu, deneylerin yapılacağı güne kadar ya da hücre stokunun korunması amacıyla dondurulmuştur.

Bunun için,

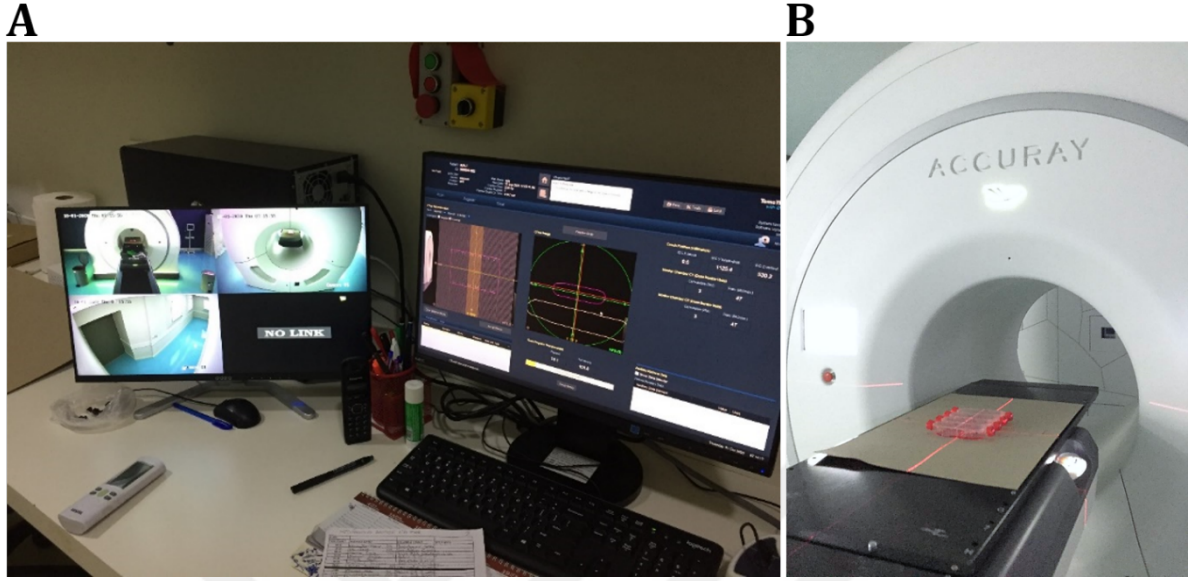
- Hücre süspansiyonu üzerine HT22 hücre hattı için %10'luk, RAW264.7 hücre hattı için %5'lik DMSO (dimetilsülfoksit), %40-50 oranında FBS karışımı ilave edilmiştir.
- Daha sonra hücre süspansiyonu 1 ml'de 1X10⁶ hücre olacak şekilde kriyo viallere alınarak sırsıyla, +4°C'de 10 dk, -20°C'de 2 saat bekletildikten sonra, -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2. İyonize Edici Radyasyon Uygulanması İşlemi

HT22 hücrelerine verilmesi planlanan iyonize radyasyon (kaynağı X-ışını), Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Radyasyon Onkolojisi A.D.' ye danışılarak radyasyon uygulama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için hücrelere X-ışını verilmeden önce, bilgisayarlı tomografi (BT) (Canon Medical Systems, Neuss, Germany) cihazıyla, ışınlama yapılacak yeri spesifik olarak belirlemek amacıyla petrilerin ve flaskların topografik yapıları çıkarılmıştır.

¹ *Sayım işlemi için %0,4'lük trypan mavisi ile boyanan hücreler Neubauer hemositometresi üzerine alınmış ve hücrelerin ml'deki canlılık oranları ve sayıları belirlenmiştir.

Sonrasında, hücrelere iyonize edici radyasyon uygulanması işlemi, iyonize edici radyasyon cihazı (Accuray TomoTherapy, Sunnyvale, CA, USA) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



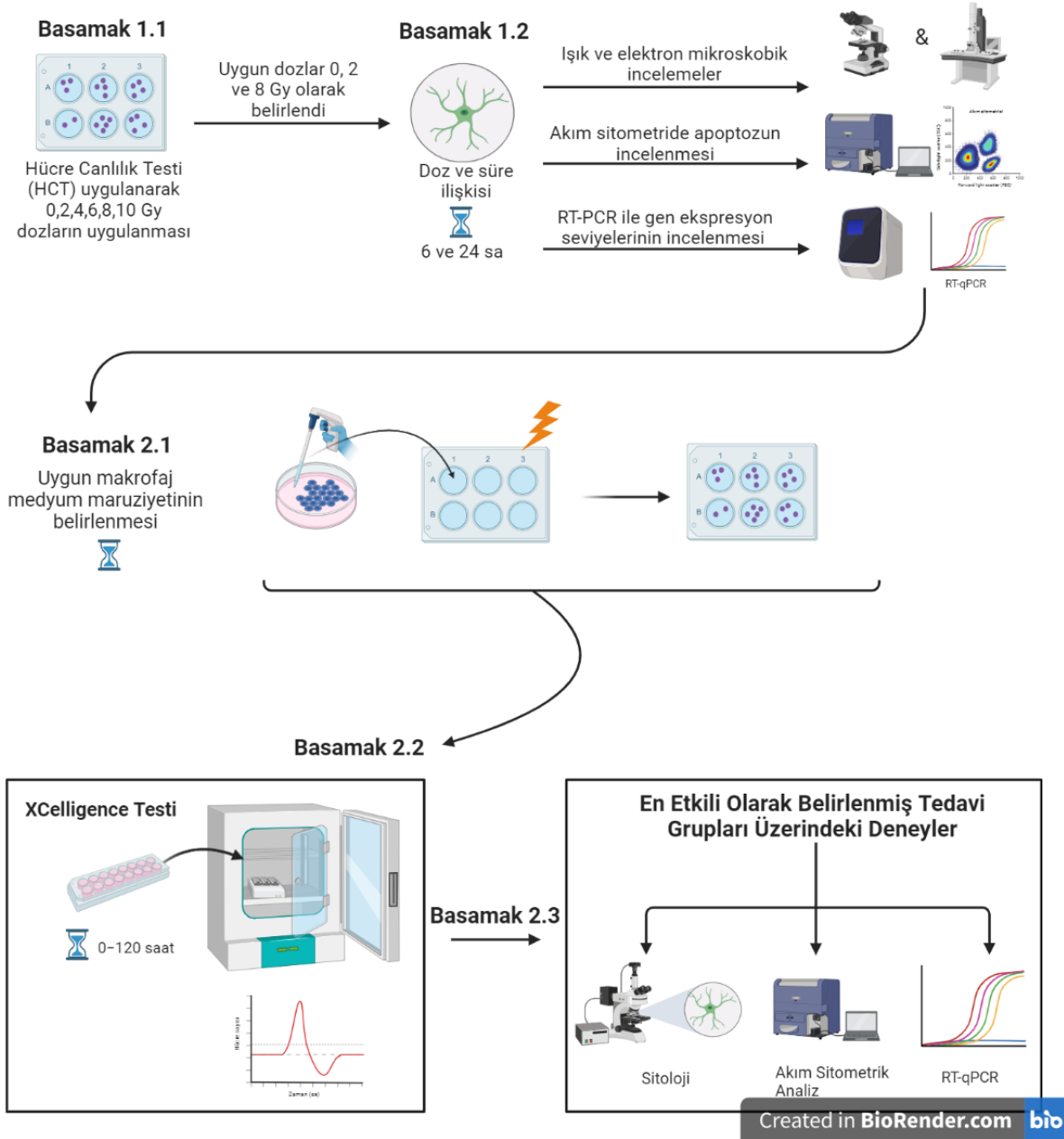
Şekil 3.3. Kaynağı X-ışını olan iyonize edici radyasyon cihazı (A) Cihazın yazılım ve donanım bölümü (B) Cihazın mekanik bölümü ve hücre kültür flasklarına X-ışının verildiği platformun gösterilmesi.

3.3. Deney Tasarısı ve Basamakları

Bu tez çalışmasının esas amacı bağışıklık hücrelerinden biri olan makrofajların normal fizyolojik koşullar altında sentezleyip hücre dışına saldırdığı, sitokinler de dahil birçok faktörü içeren karışımın; kraniyal RT uygulamasının sağlıklı beyin dokusunda oluşturduğu nöral hasarı olası onarma potansiyelini *in-vitro* olarak sınamaktır.

İlk etapta RT' nin oluşturduğu nöral hasarı modellemek için HT22 hipokampal hücreleri kullanılmıştır. Nöral hasarı onarabilmek için ise hiçbir deneysel uyarana maruz bırakılmamış standart şekilde kültüre edilen RAW264.7 makrofaj hücrelerinin besiyeri solüsyonu, HG-DMEM ile 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Literatürde, kültüre edilen hücrelerin besiyerini başka hücreler üzerinde tedavi amaçlı olarak kullanan çalışmalarda, besiyeri “Koşullandırılmış Medyum (KM), (Conditioned Media)” olarak isimlendirildiği için çalışmamızda da aynı terminoloji kullanılmıştır [127–129].

Çalışmanın esas amacına ulaşabilmek amacıyla çalışma iki ana deneysel basamağa ve alt basamaklara ayrılmıştır. Alt basamaklar çoğunlukla kronolojik olarak ilerlemiştir. Her bir alt basamak için ölçülebilir hedefler belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar bir sonraki alt basamakta analiz edilecek faktör ve/veya deneysel şartları şekillendirmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Deney tasarısı ve basamaklarının şematik olarak özetlenmesi.

3.3.1. Basamak 1

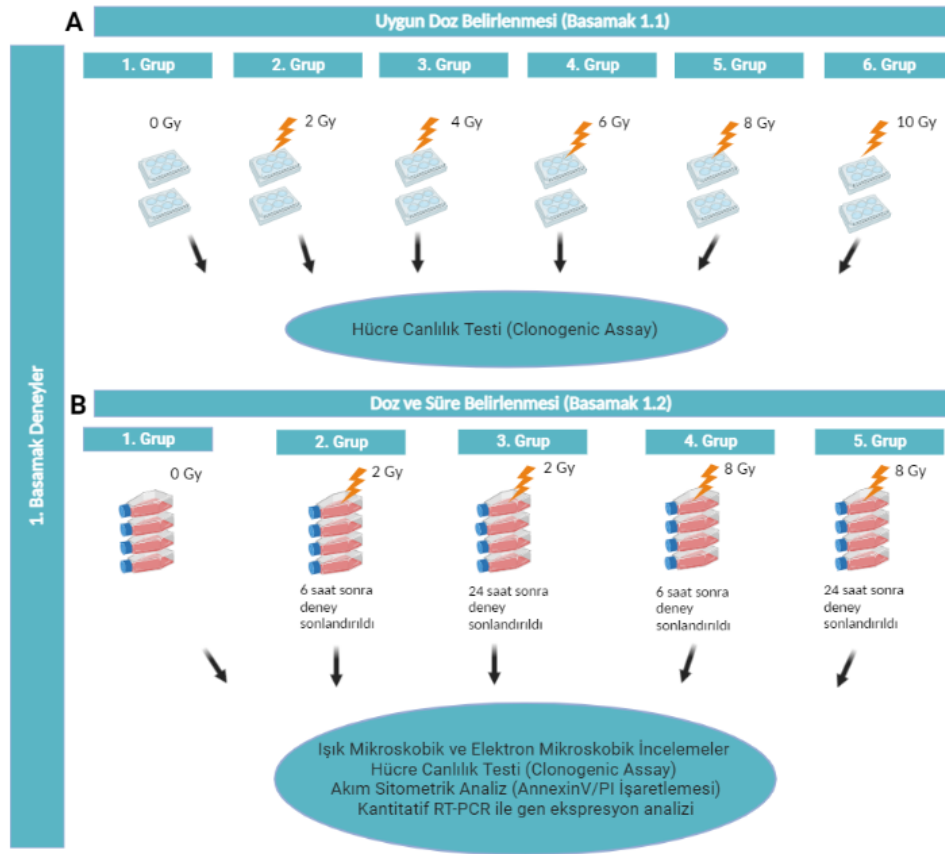
Çalışmamızın ilk basamağında, klinikte kraniyal RT gören hastalara uygulanan ve literatürdeki *in-vivo* ve *in-vitro* deneysel çalışmalarla da uyumlu bir doz aralığındaki iyonize radyasyonun, belirlediğimiz bazı hücresel olaylar ve bunlarla ilişkilendirilebilecek genlerin, doza bağlı ifade davranışlarının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

3.3.1.1. Basamak 1.1

İlk aşamada, artan (0, 2, 4, 6, 8, 10 Gray-Gy) iyonize edici radyasyon dozlarına, HT22 hücrelerinin Canlı kalan hücre kolonisi testi (CKHKT, Clonogical Survival Assay) seviyesinde tepkisinin belirlenmesi ve sonuçların literatürle uyumunun gözlenmesi amaçlanmıştır. Bu testin protokolü 3.4. kısmında açıklanmaktadır. Bu test hücre kültüründe, iyonize edici radyasyon maruziyeti sonucu hücrelerin canlı kalıp, koloni oluşturma kapasitesini nasıl etkilediğini anlamak için altın standart niteliğinde bir yöntem olarak kullanılmaktadır [42,130–132]. Çalışmanın esas deney grupları oluşturulmadan önce, literatür ile uyumlu olarak eşit katlarda artan iyonize radyasyonun HT22 hücreleri üzerinde yaptığı etki CKHKT ile ölçülerek hem iyonize edici radyasyon cihazı, hem de hücre kültürü uygulamalarımızın standartlığı sınanmıştır (n=12) (Şekil 3.5).

3.3.1.2. Basamak 1.2

Bu alt basamağın en başında, HT22 hücrelerinin iyonize edici radyasyon sonrasındaki canlı kalabilme kabiliyetinin CKHKT sonuçları ile konuyla ilgili mevcut literatür birlikte analiz edilerek iki adet radyasyon dozu belirlenmiştir (Tablo 2.1). Ayrıca, iki farklı dozdaki iyonize edici radyasyon HT22 hücrelerine uygulandıktan sonra ultrastrüktürel, hücresel ve moleküler analizler yapılması için *in-vitro* deneylerin sonlandırılacağı iki zaman noktası da literatürden faydalanarak seçilmiştir (Tablo 2.1). Buna göre hücrelere radyasyon verildikten 6 ve 24 saat sonra deneyler sonlandırılarak, hücrelerin elektron ve ışık mikroskopik olarak morfolojisi değerlendirilmiş, akım sitometri (AS) ile apoptoz ve kantitatif Real Time-PCR ile hedef genlerin ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir (n=4) (Şekil 3.5). İlgili yöntemlerin protokolleri 3.5-3.7 kısımlarında verilmiştir.



Created in BioRender.com bio

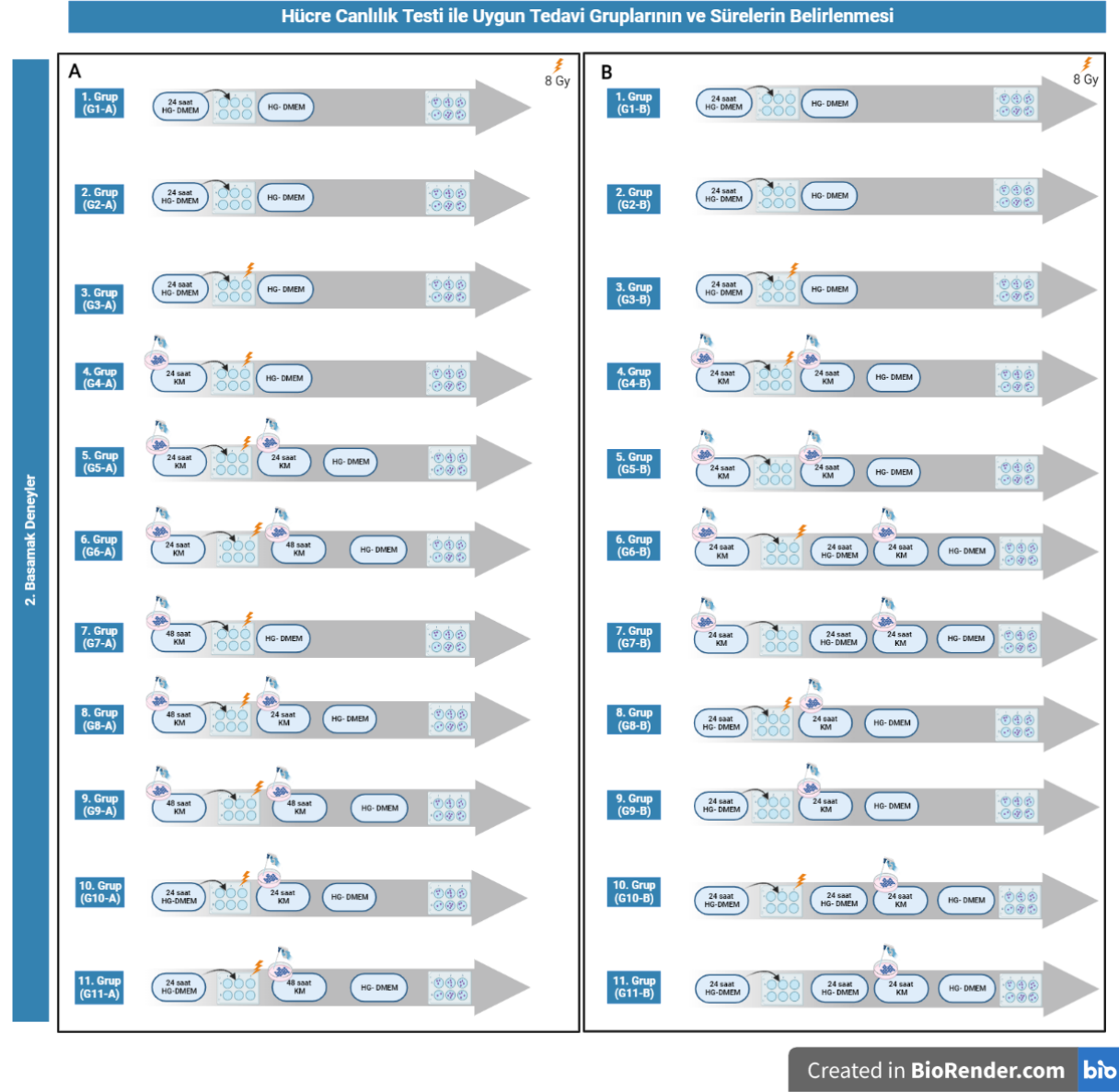
Şekil 3.5. Basamak 1'deki grupların şematik olarak gösterilmesi. (A) Basamak 1.1'deki deney gruplarının şematik gösterimi (B) Basamak 1.2'deki deney gruplarının şematik gösterilmesi.

3.3.2. Basamak 2

Çalışmanın bu safhasında, Basamak 1'den elde edilen bilgiler doğrultusunda, iyonize edici radyasyon dozu, klinikte kraniyal radyasyon için tek seferde uygulanan en yüksek doz olan 8 Gy olarak belirlenmiştir. Sonrasında ise makrofaj hücrelerinin, besiyerleri aracılığı ile iyonize edici radyasyonun oluşturduğu nöral hasarı onarma kapasitesi farklı yöntemlerle test edilmiştir.

3.3.2.1. Basamak 2.1

HT22 hücrelerine iyonize edici radyasyon verilmeden önce ve/veya verildikten sonra farklı zamanlarda RAW264.7 makrofaj hücresi KM'si verilmiştir (Şekil 3.6). Bu gruplara denk, iyonize edici radyasyonun verilmediği fakat diğer tüm işlemlerin aynı olduğu Sham grupları da oluşturulmuştur. İn-vitro deneyler sonunda tüm gruplarda CKHKT ile canlı koloni sayıları belirlenmiştir (n=12) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Koşullandırılmış medyum (KM) ile çeşitli basamaklarda ve çeşitli sürelerde muamele edilen HT22 hücre hatları ile oluşturulmuş canlı kalan hücre kolonisi testi ile sınanmış deney gruplarının gösterilmesi (A) 24 saat KM ve 48 saat KM ile muamele basamaklarının kombinasyonlarının gösterilmesi (B) 24 saat KM ile muamele süresinin farklı basamaklarda sham grupları ile uygulanmasının gösterilmesi.

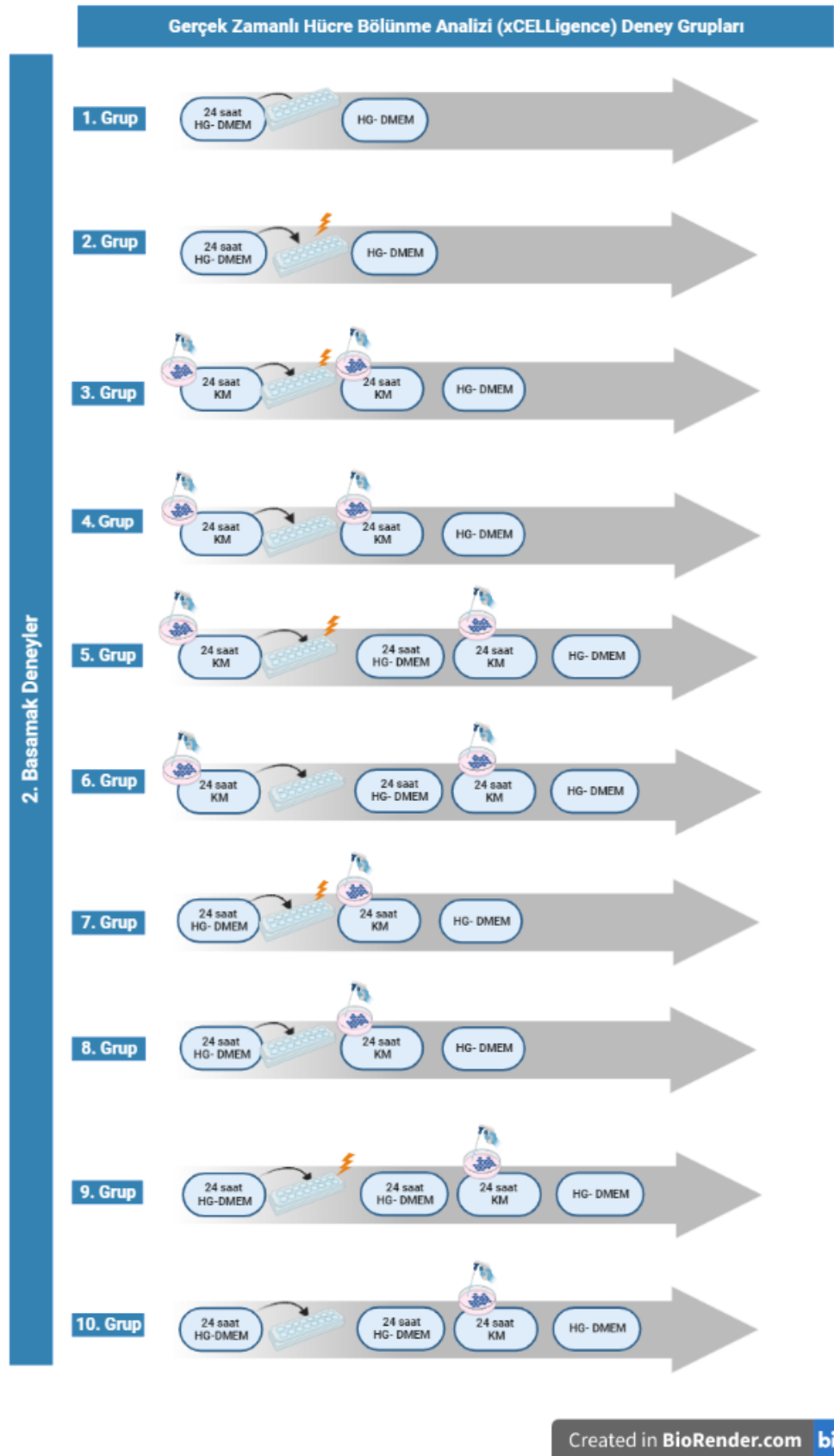
3.3.2.2. Basamak 2.2

Basamak 2.1’de elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildikten sonra en uygun kombinasyondaki ve süredeki 2 adet makro faj KM’ si içeren strateji (Şekil 3.6.B’nin 6. ve 10. grubu) daha ileri düzeyde analiz edilmek üzere gerçek zamanlı hücre bölünmesi analizine tabi tutulmuştur (n=4) (Şekil. 3.7). Bu işlem için MEİTAM hücre kültürü laboratuvarında bulunan xCELLigence marka RTCA DP model hücre analiz cihazı kullanılmıştır. Yöntemin ayrıntıları 3.8. kısımda verilmiştir. Basamak 1.1. ve 2.1.’de uygulanan CKHKT yönteminin standart uygulamasında,

kontrol grubu olarak tayin edilen grubun optimum özellikte koloni oluşturması için geçen hücre kültürü süresi (5-6 gün arası değişmektedir) ne kadar ise tüm deney grupları kendilerine özel deneysel protokollerden sonra bu süre kadar kültüre edilmiştir. En fazla 2-3 gün süren deneysel uygulamalar (KM veya tedavi verilmesi vb.) sonlandırılıp optimum koloni oluşumu gözlenene kadar geçen süre zarfında hücrelerin fizyolojik davranışları bilinmemektedir. Dolayısıyla, gerçek zamanlı hücre bölünme analizi, bahsi geçen aradaki süre boyunca, farklı gruplardaki HT22 hücrelerinin proliferasyon davranışlarını açığa kavuşturmuştur.

Bu alt basamak sonunda, değişik sürelerle ve kombinasyonlara sahip grupların CKHKT testi sonuçlarına göre, çalışmanın son kısmında uygulanacak makrofaj KM yaklaşımı için en etkili olan grup yani sadece radyasyon verilen gruba göre en fazla sayıdaki koloniyi oluşturabilen grup, tedavi grubu (Şekil 3.6.B'nin 6. grubu) olarak seçilmiştir.





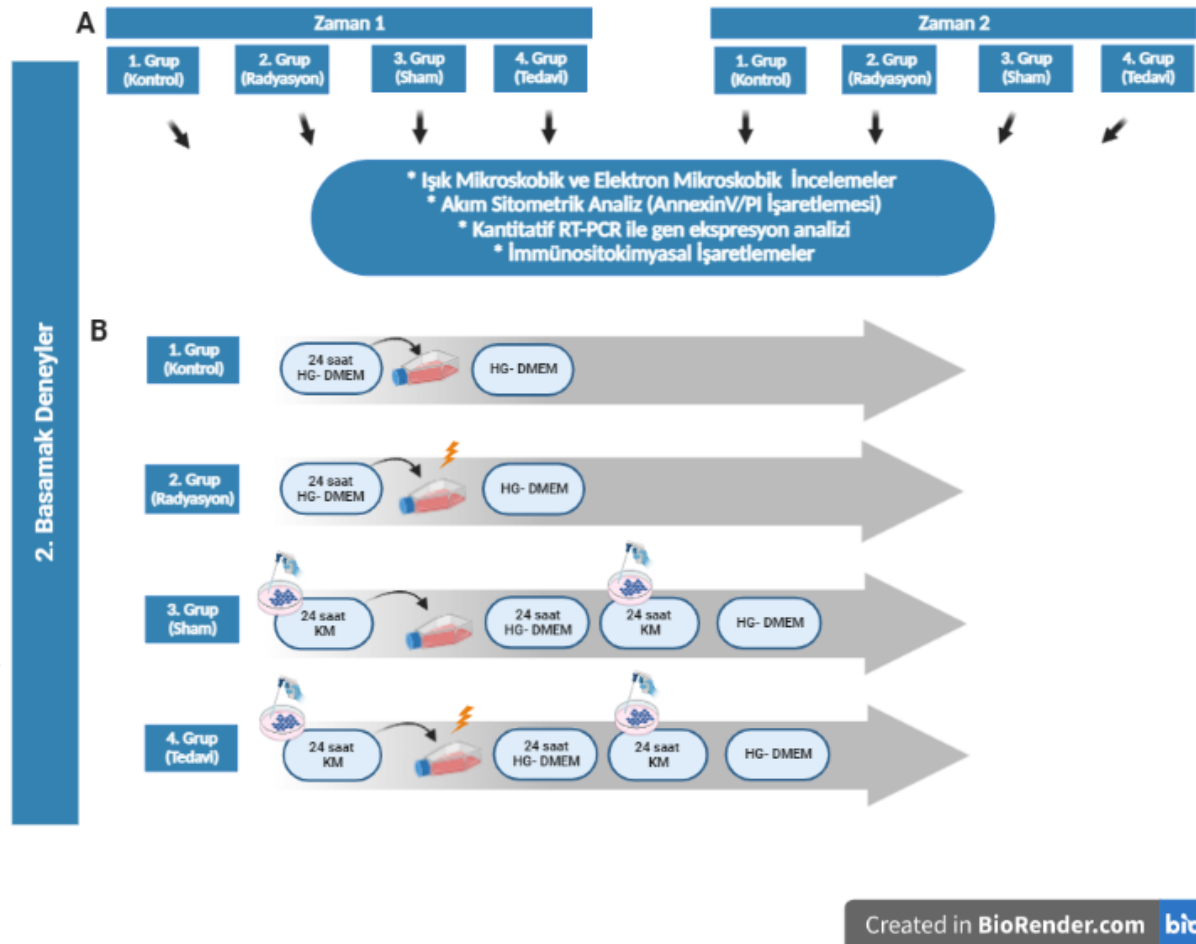
Şekil 3.7. Basamak 2.1 sonuçlarına göre belirlenmiş tedavi grupları üzerindeki gerçek zamanlı hücre bölünmesi analizi (xCELLigence) deneylerinin şematik olarak gösterilmesi.

3.3.2.3. Basamak 2.3

Bu alt basamakta ilk olarak, Basamak 2.2’de tüm çalışma gruplarının xCELLigence cihazının verdiği sonuçlar doğrultusunda, farklı zaman dilimlerindeki bölünme hızları analiz edilerek iki önemli zaman noktası (48. ve 72. saat) belirlenmiştir. Sonrasında ise her bir grup için n=4 olacak şekilde çalışmanın son safhasına geçilmiştir.

Bu kısımda özetle;

- Basamak 1 sonunda belirlenmiş olan tek doz iyonize edici radyasyon kullanılmıştır.
- İyonize edici radyasyon verilen ve verilmeyen gruplardaki HT22 hücrelerine Basamak 2.2’de belirlenen ve teke indirgenen, makrofaj KM yaklaşımı uygulanmıştır.
- Belirlenen son strateji uygulandıktan sonra, iki zaman noktasında kültür işlemleri sonlandırılmış, HT22 hücreleri ultrastrüktürel olarak, apoptotik karakterleri yönünden, gen ekspresyonu durumları ve immünositokimyasal olarak test edilmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilip yorumlanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Basamak 2.2 sonuçlarına göre belirlenmiş tedavi grupları üzerindeki deneylerin şematik olarak gösterilmesi. (A) Zaman 1 (48. saat) ve Zaman 2 (72. saat) olarak belirlenmiş zaman noktalarındaki deney gruplarının gösterilmesi ve gruplar üzerinde uygulanan yöntemler (B) Zaman 1 ve 2 için oluşturulan grupların şematik olarak açıklanması.

3.4. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi (Clonogenic Survival Assay)

İn-vitro radyasyon duyarlılığını değerlendirmede kullanılan bir test olan CKHKT, aynı zamanda, radyasyon sonucu sağkalımı değiştirebilen ajanların etkinliğini test etmek için de kullanılan, altın standart değerinde bir testtir [130,132,133]. Radyasyon maruziyeti sonucu radyasyonun etkilerini hayatta kalan hücre düzeyinde göstermek ve uygun dozu belirlemek amacıyla canlı kalan hücre kolonisi testi gerçekleştirilmiştir.

Bunun için,

- T25 flasklara ekilen hücreler %70 konfluent duruma ulaştıktan sonra, iyonize edici radyasyon işlemi uygulanmıştır.
- Kuyucuk başına sayıları belirlenmiş olan hücreler (500 hücre/kuyucuk), 6 kuyucuklu platelere ekilip hücreler 5-6 gün boyunca inkübe edilmiş ve hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri izlenmiştir.

- Koloni oluşumları mikroskop altında gözlemlendikten sonra (1 kolonide en az 50-60 hücre olana kadar) media uzaklaştırılıp DPBS ile yıkanmıştır.
- Daha sonrasında hücreler %70'lik etil alkolle fikse edilip %0,05'lik kristal violet ile (30 dk) boyanmıştır.

Bu sürenin sonunda kolonileri içeren kuyucuklar 3 kere DPBS ile yıkanmış ve plateler ters çevrilerek kuruması için bir gün süreyle beklenmiştir. Plateler fotoğraflandıktan sonra, koloni sayım işlemi ImageJ/Fiji (National Institutes of Health- NIH, ABD) ile “çoklu nokta (multi point)” özelliği sayesinde gerçekleştirilmiştir. Sayılan koloniler gruplar arasında karşılaştırılmıştır [130,134].

3.5. Işık ve Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik incelemeler için oluşturulan gruplarda deney sonunda,

- Flasklardaki medyum uzaklaştırılıp hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra, üzerine tripsin eklenen hücreler 3-4 dk 37°C'deki inkübatörde bekletilmiştir.
- Tutunduğu yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine katkılı medyum eklenmiş ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır.
- 125g'de 5 dk santrifüj işlemi sonrasında, pellet hacminin 5 katı olacak şekilde %2,5'luk glutaraldehit solüsyonu (GA) ile hücreler resüspanse edilmiştir.
- Hücre süspansiyonu eppendorf tüplere aktarılıp 10 dk oda ısısında hücrelerin fikse olması için bekletilmiştir.
- Fikse edilen hücreler, 31514 g'de (maksimum g) 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1 ml %2,5'luk GA solüsyonu eklenmiştir.
- 20 dk sonra pellet bütün bir disk şeklinde tüpten çıkarılmış ve 1 mm³ olacak şekilde parçalara bölünmüştür.
- Daha sonrasında DPBS ile yıkanan pellet parçaları aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlanmıştır.

Bunun için sırayla;

- %1'lik osmium tetraoksit içinde 60 dk (ikinci tespit için)
- PBS ile yıkama 3 X 5 dk
- %50'lik etil alkol içinde 15 dk
- %60'lık etil alkol içinde 15 dk
- %70'lik etil alkol içinde 15 dk
- %80'lik etil alkol içinde 15 dk
- %90'lık etil alkol içinde 15 dk

- 1. %96'lık etil alkol içinde 15 dk
- 2. %96'lık etil alkol içinde 15 dk
- 3. %96'lık etil alkol içinde 15 dk
- 4. %96'lık etil alkol içinde 15 dk
- Propilen oksit içinde 15 dk
- Propilen oksit içinde 15 dk
- Propilen oksit : epoksi rezin içinde (3:1) 60 dk
- Propilen oksit : epoksi içinde rezin (1:1) 60 dk
- Propilen oksit : epoksi içinde rezin (1:3) 60 dk
- Epoksi rezin içinde 16-24 saat hücre pellet parçaları bekletilmiştir.

Yukarıdaki işlemler yapıldıktan sonra, ertesi gün, hücreler epoksi rezine gömülüp 60°C'lik etüvde 18 saat boyunca epoksi rezinin polimerize olması için beklenmiştir. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile ilk olarak 2 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak %1'lik toluidin mavisiyle (Electron Microscopy Sciences, Katalog No: 22050) boyanmıştır. Boyanan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobuna (Olympus BX50, Olympus Anonim Şirketi GmbH, Almanya) eklenmiş kamera (Olympus LC30, (Olympus Anonim Şirketi, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflanmıştır. Daha sonrasında, 70 nm kalınlığında ince kesitler 300 gözenekli bakır gridlere alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır.

Kontrastlama işlemi için;

- Kesitler uranil asetat 5 dk bekletilmiştir
- Distile su ile yıkanmıştır (3 X 1 dk)
- Kurşun sitrat 5 dk bekletilmiştir
- Distile su ile yıkanmıştır (3 X 1 dk)
- Kurutma kağıdı ile kurutulmuştur

3.6. Akım Sitometrik Analiz

Radyasyon maruziyeti sonucu hücrelerde oluşabilecek erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrozun kantitatif olarak gösterilmesi için bu teknik uygulanmıştır.

3.6.1. Anneksin V/PI ile Erken, Geç Apoptozisin ve Nekrozisin İncelenmesi

Ticari olarak temin edilen FITC Annexin V/PI apoptoz kiti (BioLegend; Cat No: 640932) hücreler üzerinde uygulanmıştır.

Kitin talimatlarına göre kısaca;

- 0.25-1.0x10⁷ arasında değişen hücre süspansiyonunun 100 µl'si yeni bir tüpe alınarak üzerine 5µl FITC Anneksin V ilave edilmiş ve karıştırılmıştır.
- Daha sonra 10 µl Propidyum Iyodür (PI) solüsyonu ilave edilmiştir.
- Yavaşça karıştırılan süspansiyon 15 dk oda sıcaklığında (25°C) inkübe edilmiştir.
- Son olarak 400µl Anneksin V tampon eklenerek analiz için akım sitometri cihazında okutulmuştur [135,136].

Bu işlemlerin sonucunda,

Annexin V (-) ve PI (-) boyanan hücreler canlı ve sağlıklı hücreler olarak,

Annexin V (+) ve PI (-) boyanan hücreler erken apoptotik hücreler olarak,

Annexin V (+) ve PI (+) boyanan geç apoptotik hücreler olarak,

Annexin V (-) ve PI (+) boyananlar ise nekrotik hücreler olarak değerlendirilmiştir.

3.7. Gen Ekspresyon Analizlerinin Yapılması

3.7.1. Total RNA İzolasyonu

Altı kuyucuklu platelerde yapılmış olan deneyler sonucunda her bir kuyucukta ~1x10⁶ hücre olacak şekilde, hücrelerden total RNA (tRNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, ticari olarak elde edilen kit yardımıyla (ROCHE, High Pure RNA Isolation Kit, 50 reactions, REF: 11828665001) üretici firmanın talimatlarına uyularak tRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Buna göre;

- Platelerdeki medyum uzaklaştırılıp hücreler DPBS ile yıkanmıştır.
- Üzerine tripsin eklenen hücreler 3-4 dk 37°C'deki inkübatörde, hücrelerin yüzeyden tamamen kalkması için bekletilmiştir.
- Tutunduğu yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine katkılı medyum eklenmiş ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır.
- Yavaş bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra HT22 hücreleri 300 g'de 2-3 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılarak aşağıda kalan pellete soğuk DPBS'den (+4°C) 5 ml ilave edilip yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak hücrelerden fenol redin uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işleminden sonra, tüm süspansiyon 300 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- Santifüj işleminden sonra süpernatant atılarak örnekler buz üzerine alınmıştır.

- Aşağıda kalan pellete, örnek başına 200 µl, filtrelenmiş soğuk DPBS'den (+4°C) eklenip pipetaj yapılmış, daha sonra yine örnek başına 400 µl olacak şekilde kitin içerisinde bulunan lizis tamponundan (lysis buffer) eklenip örnekler karıştırılmıştır.
- Toplamda örnek başına 600 µl olan karışım, 20 saniye vorteks cihazı ile karıştırılıp kitin içerisinde bulunan kolonlara aktarılmıştır.
- Tüpler 8000 g'de 23 saniye santrifüj edilmiştir.
- Örnek atıklarının toplandığı toplama tüpü (collection tube) boşaltılıp kolonlara örnek başına 10 µl DNase, 90 µl DNase inkübasyon tamponundan (DNase incubation buffer) eklenip 15 dk inkübasyon için beklenmiştir.
- Inkübasyondan sonra, kolonların üzerine, örnek başına 500 µl olacak şekilde, kitin içerisinden çıkan 1 numaralı yıkama tamponu eklenmiştir (Wash Buffer I).
- Tüpler 8000 g'de 23 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü boşaltılıp kolonlara, örnek başına 500 µl olacak şekilde, kitin içerisinden çıkan 2 numaralı yıkama tamponu eklenmiştir (Wash Buffer II).
- Tüpler 8000 g'de 23 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü boşaltılıp kolonlara, örnek başına 200 µl olacak şekilde, 2 numaralı yıkama tamponu eklenmiştir (Wash Buffer II).
- Tüpler en yüksek g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü boşaltılıp kolonlar, kitin içerisinden çıkan, 1,5 ml'lik kilitli DNase/RNase free steril eppendorf tüplere aktarılmıştır.
- Kolonların üzerine, örnek başına 50 µl kitin içerisinden çıkan, elüsyon tamponu (elution buffer) eklenip, 1-2 dk oda sıcaklığında (20-24°C) inkübasyon için beklenmiştir.
- Tüpler 8000g'de 1 dk santrifüj edilip tRNA izolasyon işlemi tamamlanmıştır.
- Daha sonra, 1,5ml'lik eppendorf tüpler içinde bulunan tRNA'lar, sıvı azota (sıvı nitrojen) atılarak hızlıca dondurulmuş ve Anatomi A.D.'deki -80°C derin dondurucuya, örneklerin kullanılacağı güne kadar saklamak için kaldırılmıştır.

Total RNA örnekleri, Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MEİTAM) bulunan QDrop cihazında konsantrasyon ve nükleik asit saflık analizi için ölçülüp QDrop okutmaları sonucu sadece 280/260 ve 260/230 absorbands değerleri $1.8 \leq X$ üzerinde olan örnekler cDNA'ya çevirmek için kullanılmıştır.

3.7.2. cDNA Sentezi

Gen ekspresyon analizlerinde kullanılacak cDNA'ların, ilk olarak bir önceki basamakta hücrelerden izole edilmiş olan total RNA'lardan dönüştürülmesi gerekmektedir. Her bir cDNA sentezine dönüştürme işleminde 500 ng miktarında tRNA kullanılmıştır. Kitin talimatlarına göre

bir cDNA master mix hazırlanmış ve MiniAmp Plus Thermal Cycler cihazında aşağıdaki PCR programı kullanılarak tRNA'lardan cDNA'ya çevrimi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. tRNA'dan cDNA'ya çevirim için uygulanan PCR reaksiyonu

Sıcaklık	Süre
25°C	10 dk
37°C	120 dk
85°C	5 dk

Her bir biyolojik örnek için mutlaka kitin enzimi olan Multiscribe enzimi içermeyen, fakat total RNA içeren bir tüp de dahil edilmiştir. Bu örnekler ilerleyen kantitatif-RT-PCR analizlerinde negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Eğer RNA izolasyonu sırasında izolatin içerisine az miktarda bile DNA karışmış ise, bu örnek içerisindeki RNA ya ek olarak kontamine olmuş DNA da RT-PCR primerleri ile çoğalabilir. Sonuç olarak da elimizde ilgili genin mRNA ekspresyonu ile birlikte gDNA'ya ait bölgede çoğalabilir ve bizi yanıltabilir. Bu gerekçelerle söz konusu negatif kontrol tüm örnekler için oluşturulup her bir genin ekspresyonu için test edilmiştir.

3.7.3. Kantitatif RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Sentez edilen cDNA'lardan aşağıdaki tabloda verilmiş olan genlerin (Tablo 3.2), ekspresyon düzeylerinin rölatif kantitasyonu her bir gen için ayrı ayrı belirlenen özgül primer dizileri kullanılarak Mersin Üniversitesi Hastanesi Biyokimya A.D.'de bulunan Real Time PCR (Roche Light Cycler 480 Instrument, RRID:SCR_020502) ile gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon düzeylerinin kantitasyonu ise "Comparative CT ($\Delta\Delta C$)" analizi ile yapılmıştır. Yöntem; hedef gen ve endojen kontrol ile pozitif RNA örneğine (TaqMan Human Control Total RNA-4307281' den sentezlenen cDNA) göre ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları belirleme şeklinde çalışmaktadır. Reaksiyon sonrası elde edilen $\Delta\Delta C$ değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C}$ hesaplanarak ve endojen kontrol ile referans RNA'ya karşı araştırılan genin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

3.7.4. Kantitatif RT-PCR için Primer Tasarısı

Çalışmamızda kullanılan *Hprt*, *Nrf2*, *Grn* ve *Bdnf* genlerinin RT-PCR primerleri literatürden [137] alınmış, *Dusp22* ve *C9orf72* genlerinin primerleri ise tarafımızca tasarlanmıştır (Tablo 3.2). Bunun için, Pubmed "Gene" den tasarlanması planlanan primerlerin gen isimleri bu araca yazılarak sekansları belirlenmiştir (Tablo 3.2). Birden fazla varyant mRNA'sı olanlar için ortak

sekans saptanmıştır. Ensembl indeksten exon-exon sınırları tespit edilmiş ve Integrated DNA Technologies (IDT) PrimerQuest Tool aracılığıyla uygun primerler seçilmiştir. Ayrıca IDT OligoAnalyzer ile tasarlanan primerlerin self-dimer, heterodimer özellikleri ve hairpin yapıları, Delta G hesaplamaları göz önünde bulundurularak kontrol edilmiştir. Son olarak, non-spesifik bağlanmaların kontrolü için “Primer-BLAST – (NCBI)” kullanılmış ve en uygun olan primerler seçilerek ekspresyon analizine geçilmiştir.

Tablo 3.2 Deneylerde kullanılan RT-PCR primer dizileri, hedef genler ve amplikon (PCR ürünü) büyüklükleri

Hedef Gen (fare genomu)	RT-PCR Primer Dizisi	Amplikon Büyüklüğü (bd)
	Forward (5'-3') Reverse (3'-5')	
<i>Hprt</i>	CAGCGTCGTGATTAGCGATGAT	134
	CCAGTTGGTAAAGTCCAGCAG	
<i>Nrf2</i>	AAGAATAAAGTCGCCGCCCA	170
	AGATACAAGGTGCTGAGCCG	
<i>Grn</i>	GTGACCTGGTTCACACACGA	91
	GACACTGCCCTGTTGGTCTT	
<i>Bdnf</i>	AGCTGCCTTGATGTTTACTTTGA	148
	GTCCGTGGACGTTTACTTCTTTCA	
<i>Dusp22</i>	GACACACCATCTCAAAACCTGAC	132
	GATCACCAATGTCACACTCCTG	
<i>C9orf72</i>	CTAGTGAAAGCCTTCCTGGATCA	137
	TGCGTATCATCCTCGATGTACTTG	

3.8. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinin Yapılması

Oluşturulan gruplarda fare hipokampal hücrelerinin proliferasyonuna radyasyon uygulama işlemi sonucunda hasar gören hücrelerin makrofaj medyumunun etkisini anlamak amacıyla MEİTAM'da bulunan hücre kültürü laboratuvarındaki, zemininde yerleşmiş olarak bulunan mikroeletrotlar ile elektriksel empedansı ölçme prensibiyle çalışan Roche xCELLigence RTCA DP cihazı ile 120 saat boyunca hücre canlılık eğrileri değerlendirilmiş ve kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

Buna göre;

- Cihaza özel 16 kuyucuklu e-plate kuyularına 100 µl medyum ilave edilmiştir. Daha sonra, e-plateler cihaza yerleştirilmiş ve hücre içermeyen medyum cihazda okutulmuştur.
- Bu “boş okuma” işleminden sonra, yüzey alanı yaklaşık 1,04 cm² olan kuyucuklara sahip e-platelere, laminar kabin içerisinde, deneylerden önce, her bir kuyucukta 500 hücre olacak şekilde CEDEX XS hücre sayım cihazı ile sayılan HT22 hücreleri (iyonize edici radyasyona maruz bırakılmamış ve bırakılmış) ekilmiştir.
- Hücrelerin tutunması için 24 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir.
- Hücreler tutunduktan sonra Şekil 3.7’de özetlenmiş olan deney grupları, grup başına n=4 olacak şekilde oluşturulmuş ve bu gruplara göre tüm deneyler gerçekleştirilmiştir.
- RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı medyumunu (koşullandırılmış medyum) uygulama işlemlerinden toplam 120 saat sonra deneyler sonlandırılmıştır.
- “RTCA Software (version 1.2.1)” programına aktarılmış olan hücre indeksi verilerinin istatistikleri yapılarak yorumlanmıştır.

3.9. İmmünohistokimyasal İşlemler

3.9.1. Hücrelerin İşaretlenmesi

Deney grupları üzerinde yapılmış olan immün işaretlemeler için hücreler 96 kuyucuklu petrilere ve konfokal petrilere ekilmiştir. Deneyler sonucunda hücrelere immünohistokimyasal (ISK) işaretlemeler için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- Hücreler üzerinden medyum uzaklaştırılıp hücreler bir defa PBS ile yıkanmıştır.
- Oda sıcaklığında %4’lük paraformaldehit solüsyonu ile 10 dk fikse edilmiştir.
- Hücreler DPBS ile yıkanmıştır (3X5 dk).
- %0,25’lik Triton X-100 (Merck, Katalog No:108603.1000) içeren PBS tamponu içerisinde hücre geçirgenliğini arttırmak amacıyla 15 dk inkübe edilmiştir.
- Hücreler DPBS ile yıkanmıştır (3X5 dk).
- %2,5’luk sığır serumu, %1,5 normal keçi serumu ve %0,05 Triton X-100 içeren PBS tamponu içerisinde 60 dk bloklama yapılmıştır.
- %2,5’luk sığır serumu, %1,5 normal keçi serumu ve %0,05 Triton X-100 içeren PBS tamponu içerisinde primer dilüsyonları ayarlanmıştır.
 - Ki67: 1:250 (abcam, katalog no: ab15580)

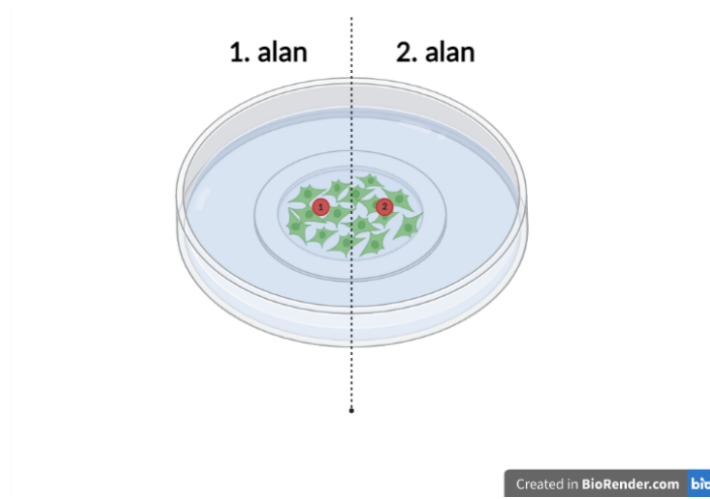
- Primer inkübasyonu +4°C’de bir gece yapılmıştır.
- Ertesi gün, hücreler DPBS ile yıkanmıştır (3X5 dk).
- Sekonder konsantrasyonları ayarlanmıştır.
 - Anti-Rabbit (1:750) (Jackson ImmunoResearch Labs Katolog NO: 230 111-545-144, Lot# 149538; Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L))
- Sekonder inkübasyonu 90 dk, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- Hücreler DPBS ile yıkanmıştır (3X5 dk).
- %0.01’lik Hoechst 33342 (Molecular Probes, H1399) içeren PBS ile 10 dk inkübe edilerek hücre çekirdekleri işaretlenmiştir.
- Hücreler DPBS ile yıkanmıştır (3X5 dk).

Hedeflenen hücrelerin analizi, her grup için ayrı ayrı görüntülenen fotoğraflar üzerinde, ücretsiz Image J/Fiji (National Institutes of Health- NIH, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

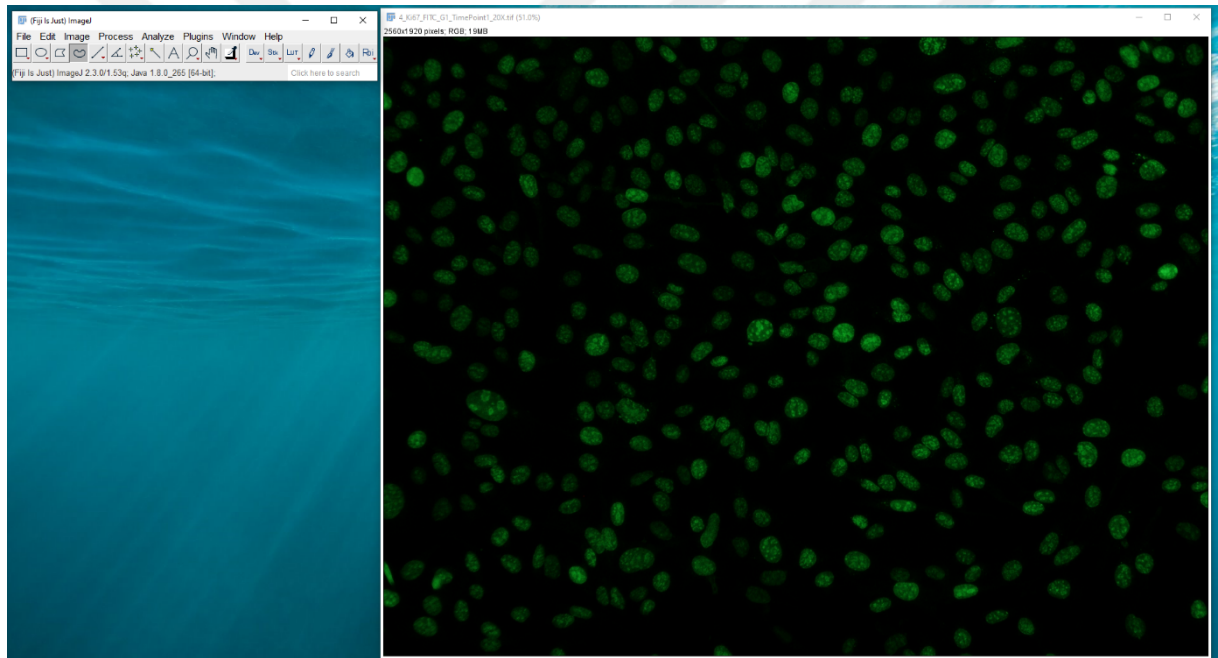
3.9.2. Flouresan Mikroskop ile Görüntüleme ve Görüntülerin Analizi

İmmünfloresan olarak işaretlenmiş cam tabanlı konfokal platelerdeki hücreler (Celvis, Katolog No: D35200N) , Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda bulunan Nikon Ti inverted floresan mikroskop altında 20X ve 40X objektif altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

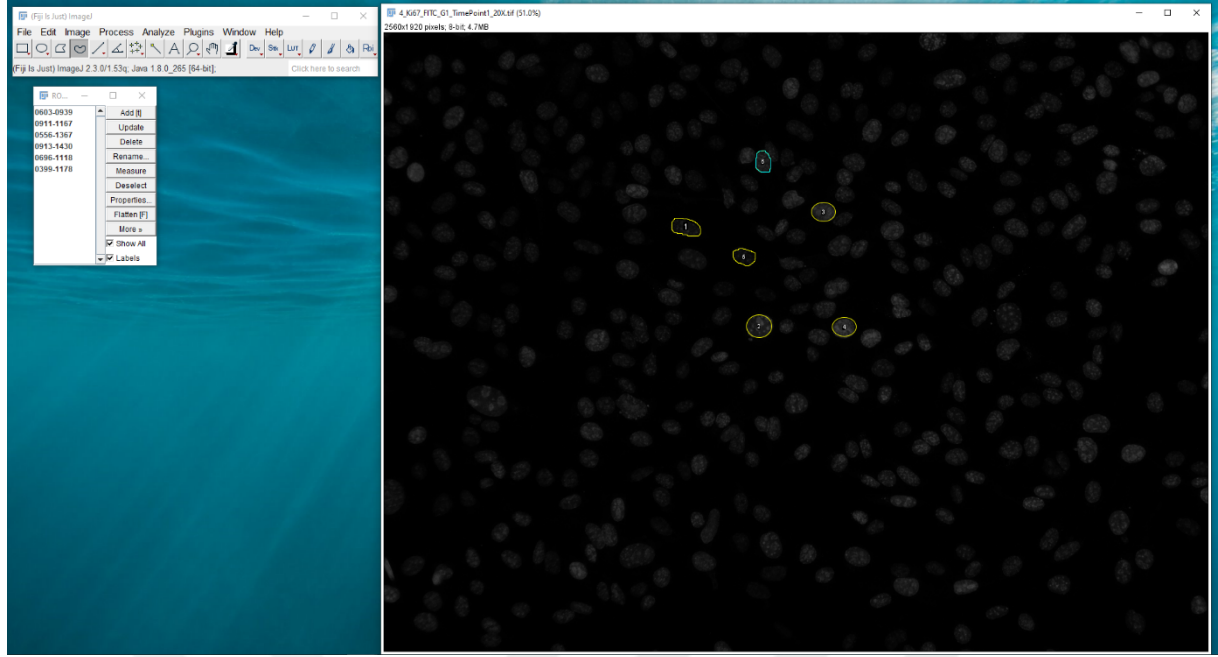
Her bir plate için 2 farklı alan ve her bir alandan 2 farklı bölge (Şekil 3.9) seçilerek grup başına toplam 10 fotoğraf çekilmiştir (n=5). Flouresan mikroskopla çekilen fotoğraflar, ücretsiz bir program olan Image J/Fiji (National Institutes of Health- NIH, ABD) üzerinde analiz edilmiştir. Analizler, resimler 8-bit gray-scale TIF formatına dönüştürüldükten sonra gerçekleştirilmiştir (Şekil. 3.10) [138]. Hücrelerdeki Ki67 boyanma yoğunluğunu belirleyebilmek amacıyla yazılımın “oval şekil” ve/veya “hands free ” aracı kullanılarak, nöron nükleuslarının dış sınırları çizilmiştir (Şekil 3.11). Sınırları çizilen nöronların içerisindeki boyanma yoğunluğu ise yazılımdaki “analyze” menüsündeki “measure” seçeneği ile “piksel yoğunluğu” cinsinden ölçülerek kaydedilmiştir. Belirlenen yoğunluk yüzdesi üzerinden hesaplamalar istatistiksel analizler ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.9. Cam tabanlı konfokal platelerinde resim çekilen alanların gösterilmesi



Şekil 3.10. Fotoğrafların Image J/Fiji yazılımı ile 8 bit'lik gri skalaya çevrilmesi. Objektif büyüklüğü: 20X.



Şekil 3.11. Gri skalaya çevrilen fotoğraflar üzerinde hücrelerin işaretlenmesi. Objektif büyüklüğü: 20X.

3.10. Bulguların İstatistiksel Analizi

Çalışmamızda elde edilen tüm verilerin tanımlayıcı istatistikleri, her bir bağımsız deney için teknik kopyalar ile çalışma grubu başına dört ila 24 arasında değişen ($n=4-24$) bağımsız deney olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir yöntemde kullanılan bağımsız deney sayısı ilgili deneyin yönteminin açıklandığı kısım ve ilgili şekil altında sunulmuştur. Normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile test edilmiştir. Shapiro-Wilk testi sonucuna göre ihlal gözlenmesi durumunda (normal dağılım yok) ($P<0,05$) non-parametrik (Kruskal-Wallis), gözlenmemesi (normal dağılım var, $P>0,05$) durumunda ise parametrik (One-Way ANOVA) test seçilerek veri analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde, anlamlılık eşik değeri olarak 0,05 ($P<0,05$) belirlenmiştir. Analizler için IBM SPSS Statistics yazılımının ücretsiz deneme sürümü (26) kullanılmıştır. Tanımlayıcı veriler, eğer non-parametrik bir analiz gerçekleştirildiyse box-plot grafiği (minimum-median-maksimum verileri işaret eden), parametrik seçildiyse ortalama $\pm$ standart sapmayı temsil eden bar grafiği biçiminde sunulmuştur. İstatistiksel analizi tamamlanan verilerin grafikler haline dönüştürülmesi ve düzenlenmesi için Microsoft Office (sürüm 15.32) yazılımı kullanılmıştır. Elde edilen bilgiler her deney sonrasında analiz edildiği gibi çalışmanın tüm laboratuvar deneyleri bittikten sonra tekrar kontrol edilmiştir. İstatistiki bilgiler sonucunda bulgular yazılarak, bilgiler yorumlanmıştır.

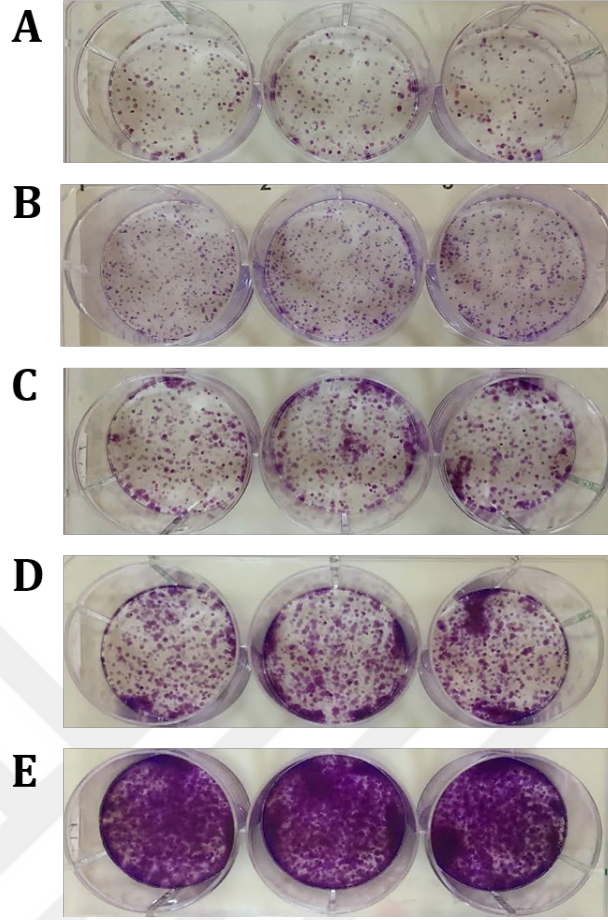
4. BULGULAR

4.1. Basamak 1.1 Bulguları

Çalışmamızın bu basamağında HT22 hücreleri kullanılarak oluşturulan kranial RT modelinin tutarlılığı CKHKT ile gösterilmiştir. İlk olarak, kullandığımız HT22 hücre hattının CKHKT uygulaması ile normal kültür koşulları altındaki uyumluluğu bir ön çalışma ile değerlendirilmiştir. Sonrasında ise HT22 hücrelerinin iyonize radyasyona karşı duyarlılıkları, 0-10 Gy arasında artan dozlarda iyonize radyasyona maruz bıraktığımız hücre gruplarının oluşturdukları canlı koloni sayıları kullanılarak hesaplanmıştır.

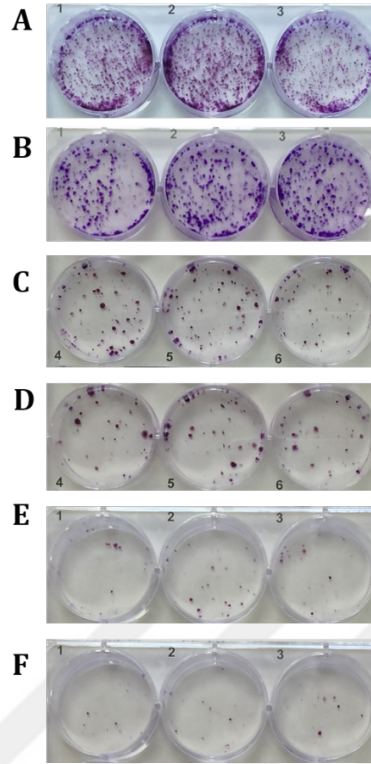
4.1.1. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi (Clonogical Survival Assay) Bulguları

İlk olarak HT22 hücre hattının canlı koloni oluşturma karakteri tespit edilmiştir. Bunun için 5 farklı 6 kuyucuklu petriye, her birine sırasıyla 500, 1000, 2000, 4000 ve 10000 sayıda (n=3) HT22 hücresi ekilerek, standart koşullarda 5-6 gün kültür işlemi sonunda %0,5'lik kristal violet ile boyanmış ve koloni oluşumu morfolojik olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bu ön çalışma sonucunda elde edilen morfolojik görüntüler incelendiğinde, her biri yaklaşık 50 adet hücre içeren gözle rahatlıkla ayırt edilebilir ve sayılabilir olan kolonilerin optimum düzeyde olduğu grup, kuyucuk başına 500 hücre ekilen grup olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen basamaklarında gerçekleştirilen tüm CKHKT deneylerinde kuyucuk başına 500 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır (Şekil 4.1A).

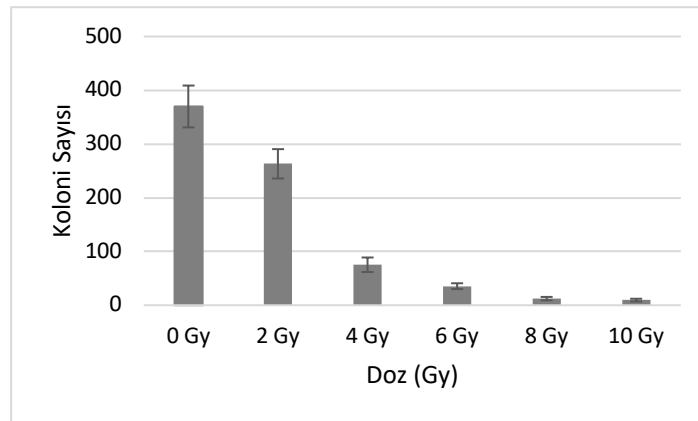


Şekil 4.1. Kuyucuk başına koloni sayısı belirlemek için yapılan ön çalışma. (A) Kuyucuk başına 500 hücre ekim sonuçları, (B) Kuyucuk başına 1000 hücre ekim sonuçları, (C) Kuyucuk başına 2000 hücre ekim sonuçları, (D) Kuyucuk başına 4000 hücre ekim sonuçları, (E) Kuyucuk başına 10000 hücre ekim sonuçları. %0,5'lik kristal violet.

Her birine 500 adet HT22 hücresi ekilen kuyulara (doz başına 12 adet, n=12), Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi A.D.'de bulunan iyonize edici radyasyon cihazında sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy dozlarında iyonize radyasyon uygulanmıştır. Uygulamadan sonra 6 gün boyunca standart koşullarda kültüre edilen gruplar CKHKT uygulamasına alınmıştır (Şekil 4.2). Farklı doz gruplarındaki HT22 hücrelerinin oluşturduğu koloni sayıları hesaplanarak, ortalama $\pm$ standart sapma veri biçiminde bar grafiğinde sunulmuştur (Şekil 4.3). Bu deneyin sonunda, radyasyon dozu arttıkça, artan her doz için ayrı ayrı kontrole göre koloni sayısının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Tablo 4.1).



Şekil 4.2. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen kolonileri. (A) 0 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (B) 2 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (C) 4 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (D) 6 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (E) 8 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler, (F) 10 Gy grubundaki kuyucuklarda gözlenen koloniler. %0,5'lik kristal violet.



Şekil 4. 3. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin canlı kalan hücre kolonisi testi (CKHKT) sonucunda gözlenen canlı koloni sayıları grafiği. (n=12).

Tablo 4.1. 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT ile ölçülen canlı koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n=12)

GRUPLAR	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
ORTALAMA	369,83± 38,94	263,17±27,30	75,33±13,50	35,50±5,40	12,33±3,14	9,50±2,58

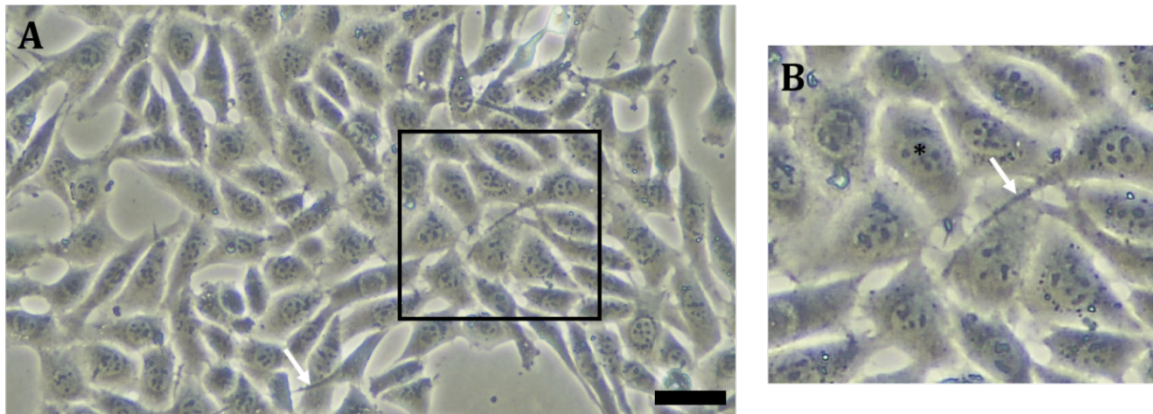
4.2. Basamak 1.2 Bulguları

Basamak 1.1 kapsamında gerçekleştirilmiş olan CKHKT bulguları sonucunda ve literatürden elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Tablo 2.1) radyasyon dozu 2 ve 8 Gy olarak belirlenmiştir. Bu basamakta, seçilen bu 2 farklı dozun zamana bağlı etkileri (radyasyondan 6 saat ve 24 saat sonraki etkiler) değerlendirilmiştir.

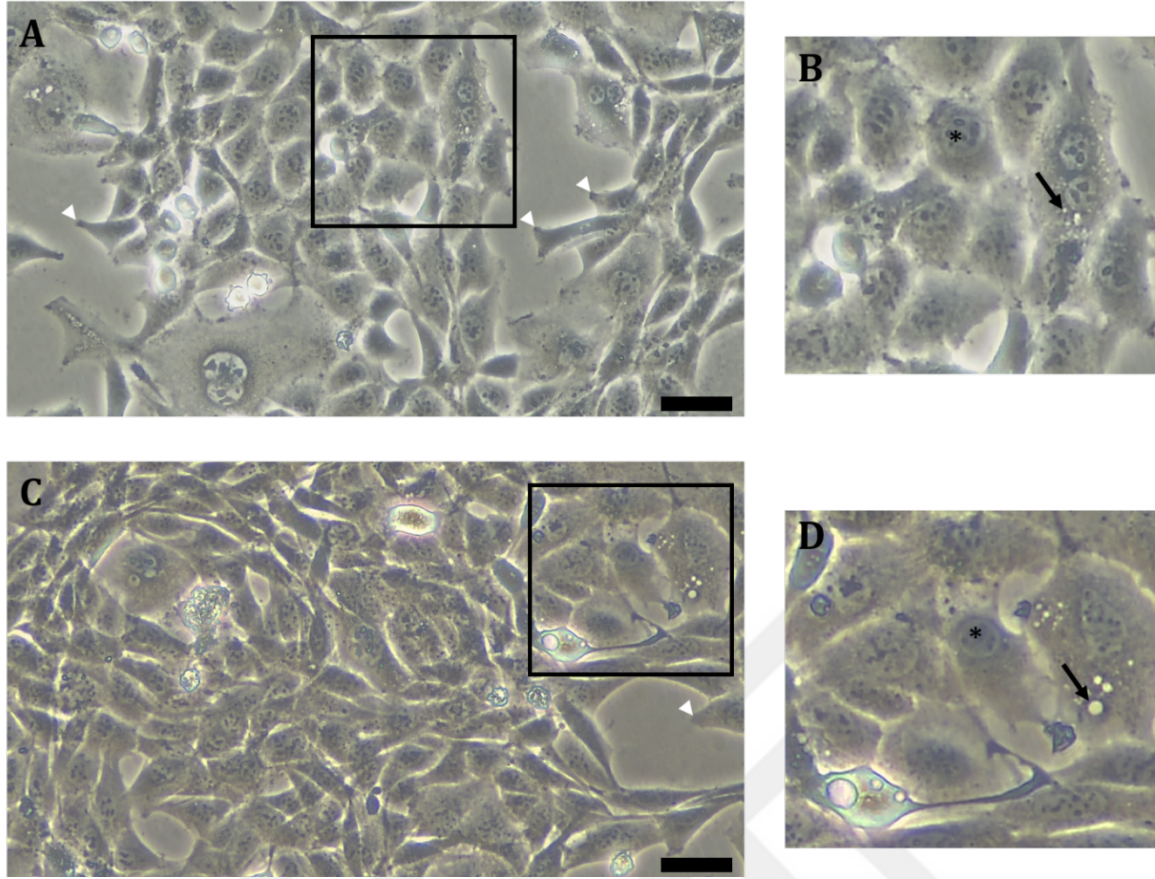
4.2.1. Morfolojik Bulgular

4.2.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular

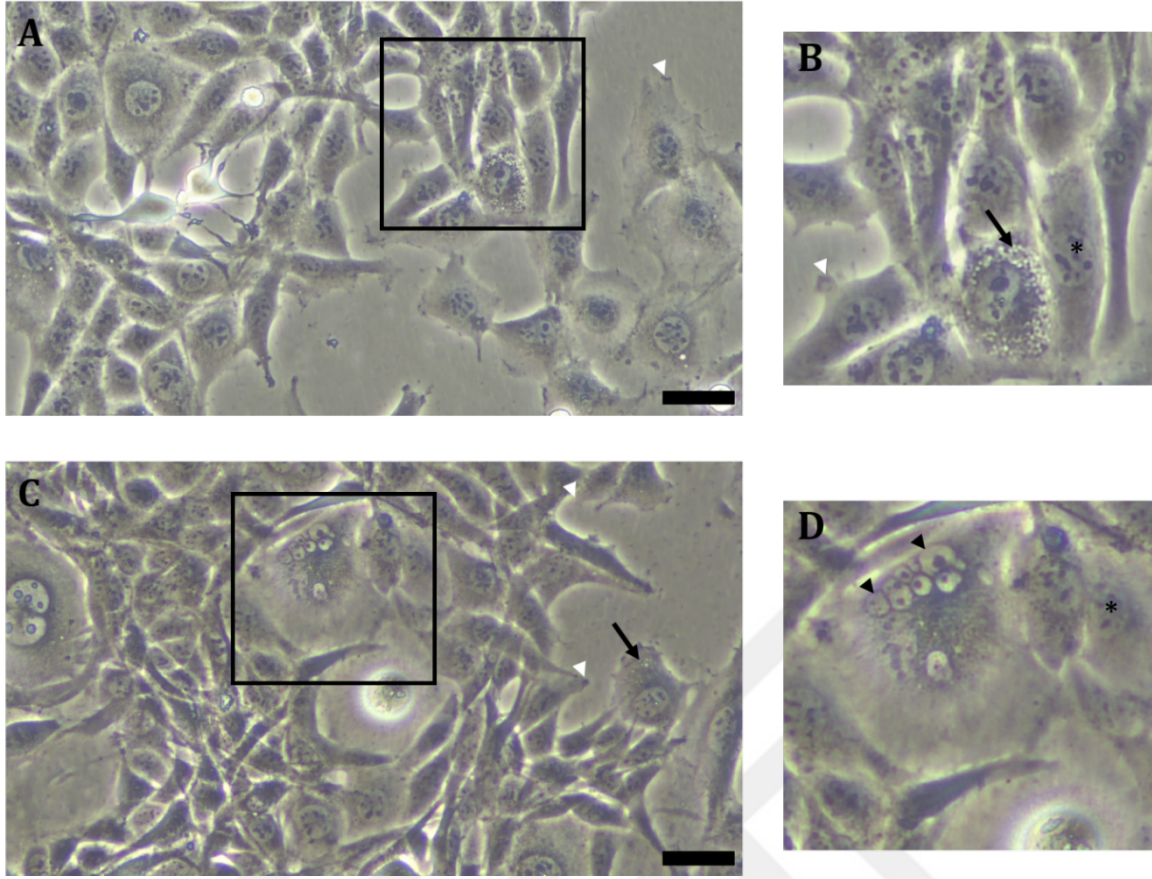
HT22 hücrelerinin hücre kültürü ortamındaki ışık mikroskopik görüntülerinde, kontrol grubunun ökromatik nükleusa ve nörit benzeri uzantılara sahip olan, epiteloid karakterde hücreler olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). 2 ve 8 Gy radyasyon uygulanan gruplarda ise ilk gözlem, hücrelerin büyük bir çoğunluğunun nörit benzeri uzantılarını kaybedip kısalmış ve küntleşmiş uzantılara sahip olduğudur. Dahası 8 Gy radyasyon uygulanan grupta daha belirgin olmakla birlikte, radyasyon uygulanan gruplarda, sitoplazmanın daha dens görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6). 2 Gy radyasyon uygulaması yapılan gruplarda, bazı hücrelerde vezikül artışı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu veziküllerin zamana bağlı olarak da arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5C, D). 8 Gy radyasyon uygulaması yapılan gruplarda ise hücrelerdeki veziküllerin yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). Ayrıca bu grupta, zaman ilerledikçe dev polimorfonükleer hücrelerin (multipolar nükleusa sahip hücreler) varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6C, Şekil 4.6D).



Şekil 4.4. Kontrol grubunun genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. (A) Objektif büyütmesi 10X; ölçek:10 μ m (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi. Normal morfolojideki nükleus (asterisk), nörit benzeri uzantılar (beyaz oklar).

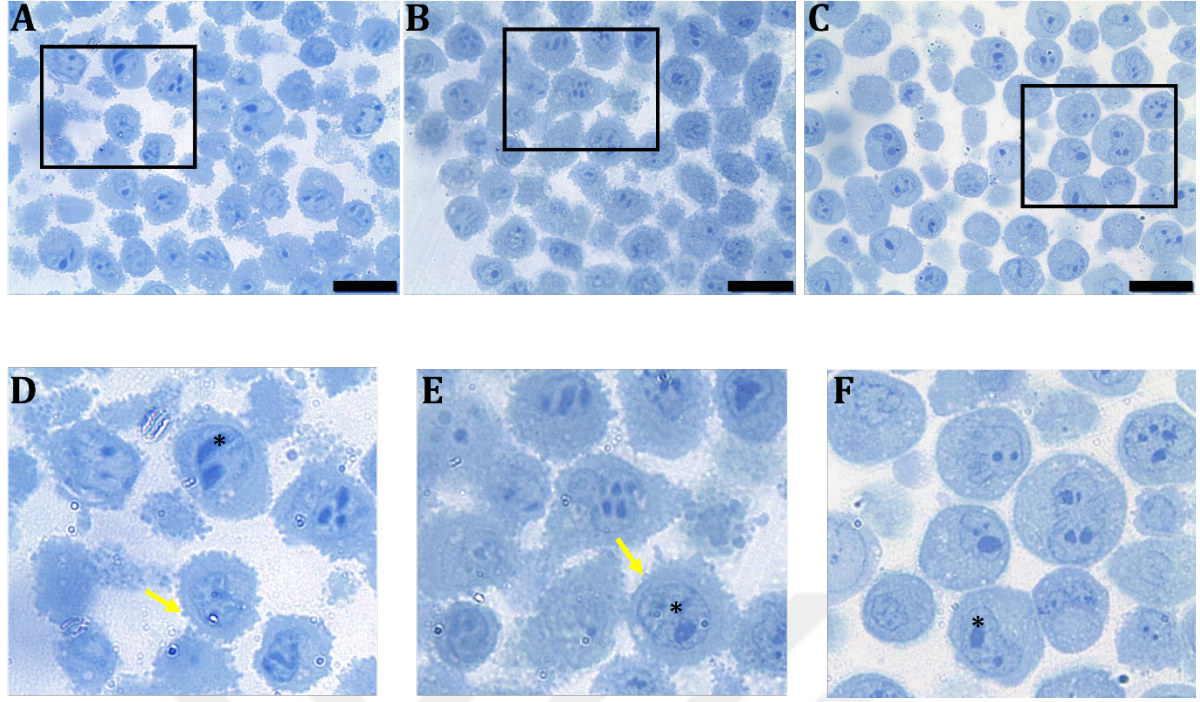


Şekil 4.5. 2 Gy iyonize edici radyasyona maruz bırakılan grubun zamana göre değişen (6 sa ve 24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (A, B) 2 Gy radyasyon uygulanan grubun 6 saat sonrasındaki (2 Gy_6sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (C, D) 2 Gy radyasyon uygulanan grubun 24 saat sonrasındaki (2 Gy_24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (D) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (A, C). Objektif büyütmesi: 10X; ölçek: 10 μ m. Nükleus (asteriskler), vezikül (siyah oklar), küntleşmiş hücre uzantıları (beyaz ok başları).

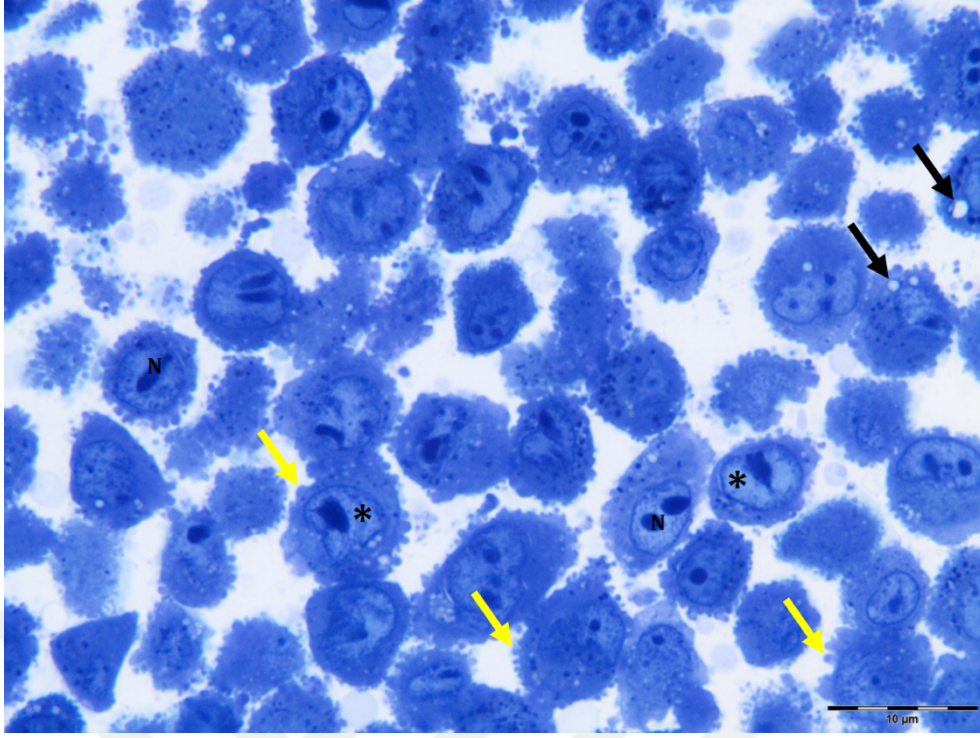


Şekil 4.6. 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz bırakılan grubun zamana göre değişen (6 sa ve 24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (A, B) 8 Gy radyasyon uygulanan grubun 6 saat sonrasındaki (8 Gy_6sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (B) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (C, D) 8 Gy radyasyon uygulanan grubun 24 saat sonrasındaki (8 Gy_24 sa) genel ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü (D) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi (A, C) Objektif büyütmesi: 10X; ölçek: 10 μ m. Nükleus (asteriskler), vezikül (siyah oklar), multipolar nükleus (siyah ok başları), küntleşmiş hücre uzantıları (beyaz ok başları).

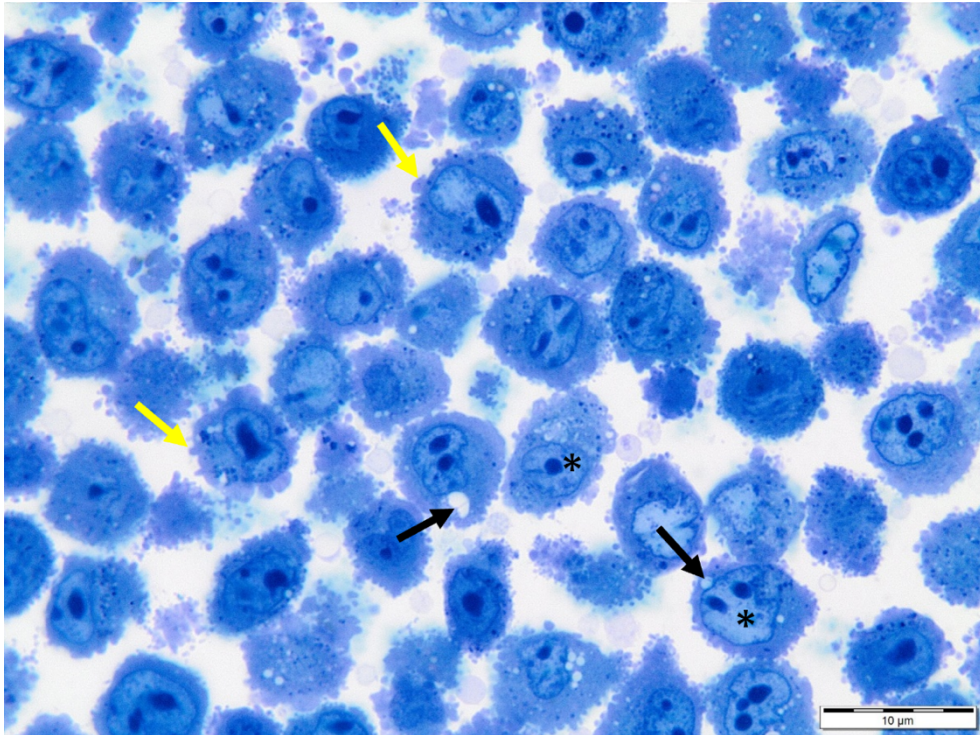
HT22 hücrelerinin 2 μ m'lik yarı ince kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmış ışık mikroskopik görüntülerinde, kontrol grubundaki hücrelerin ökromatik nükleusa, belirgin ve çok sayıda nükleolusa ve lamellipodialara sahip olan hücreler olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin bazılarında sayısı çok az olmakla birlikte yer yer veziküllere de rastlanmıştır (Şekil 4.7. A, D, Şekil 4.8). 2 Gy radyasyondan 6 saat sonraki görüntülerde, hücrelerin lamellipodiyalarını kaybetmediği, ancak veziküllere sahip olan hücrelerde artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7. B, E Şekil 4.9). 8 Gy radyasyon uygulanan gruplarda ise radyasyondan 6 saat sonraki ışık mikroskopik görüntülerde, hücrelerin lamellipodia yapılarını çoğunlukla kaybettiği ve veziküle sahip hücre sayılarında artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.7. C, F, Şekil 4.10). 24 saat sonraki ışık mikroskopik görüntülerde de 6 saat sonundaki görüntülere benzer morfolojiler tespit edilmekle birlikte, izolasyon membranlarının ve mikronükleusların varlığı da gözlenmiştir (Şekil 4.11).



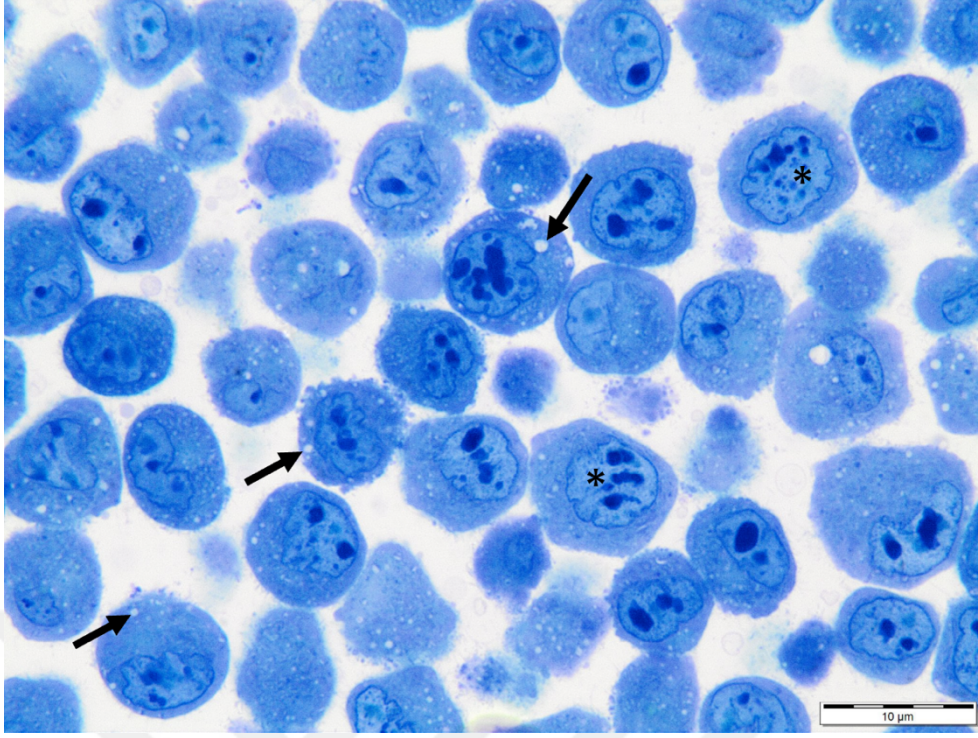
Şekil 4.7 HT22 hücre hattının kontrol ve farklı dozlardaki iyonize edici radyasyon maruziyeti sonrası morfolojilerinin ışık mikroskopik görüntüleri. (A, D) Kontrol, (B, E) 2 Gy (C, F) 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulanmasından sonra, 6. saatteki morfolojik görüntüleri, (D) A'da siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi, (E) B'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi, (F) C'de siyah kare ile çizilen alanının daha yakından gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 μ m.



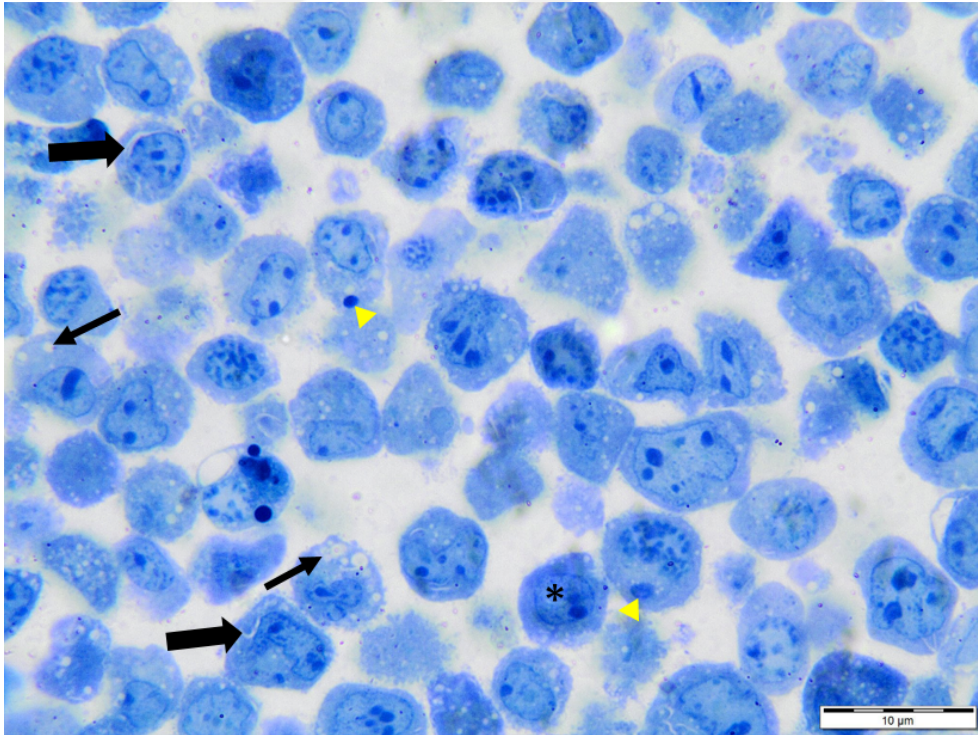
Şekil 4. 8. HT22 hücre hattının kontrol grubu ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), nükleoluslar (N), lamellipodia (sarı oklar), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm.



Şekil 4. 9. HT22 hücre hattının 2 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 6. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm.

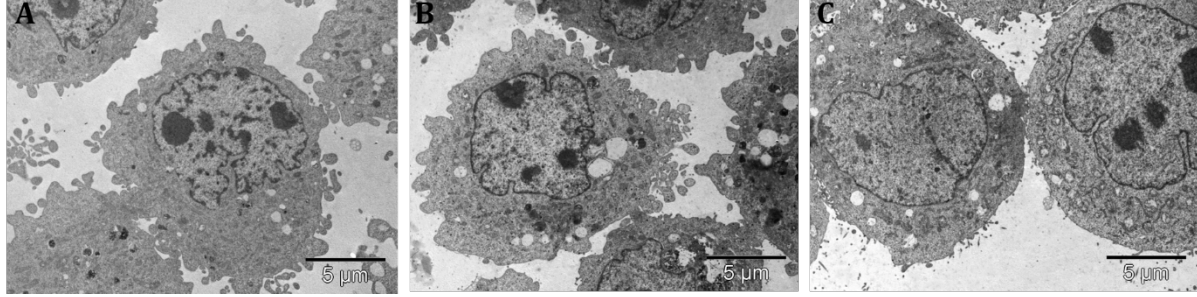


Şekil 4. 10. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 6. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm.



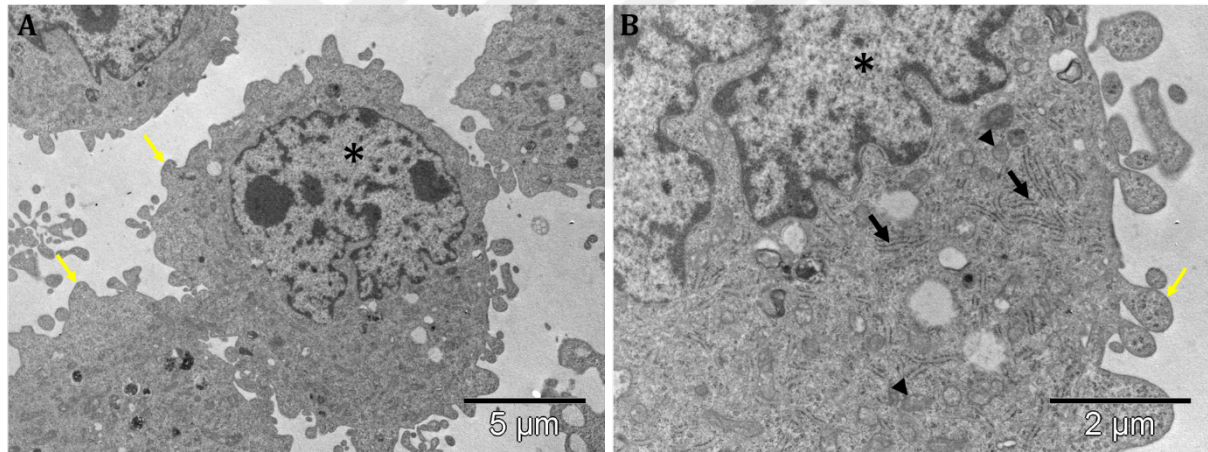
Şekil 4. 11. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubun, radyasyondan sonraki 24. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın oklar), mikronükleus (sarı ok başları). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm.

4.2.1.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

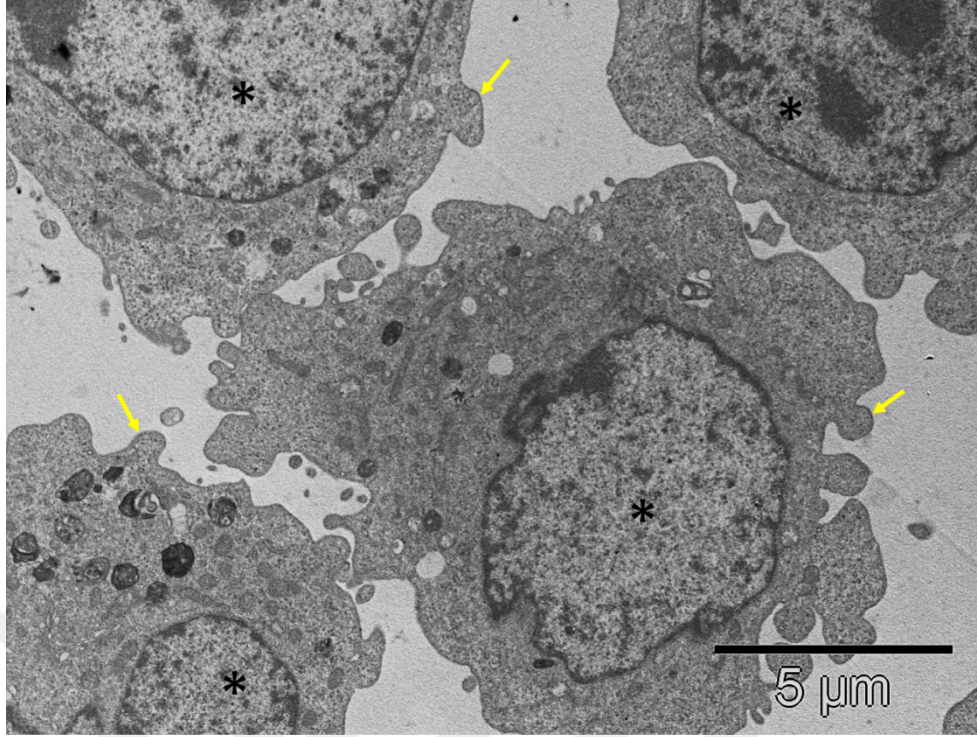


Şekil 4. 12. HT22 hücrelerine uygulanan iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) Kontrol grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi (B) 2 Gy grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi (C) 8 Gy grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme 5000X, ölçek: 5 µm.

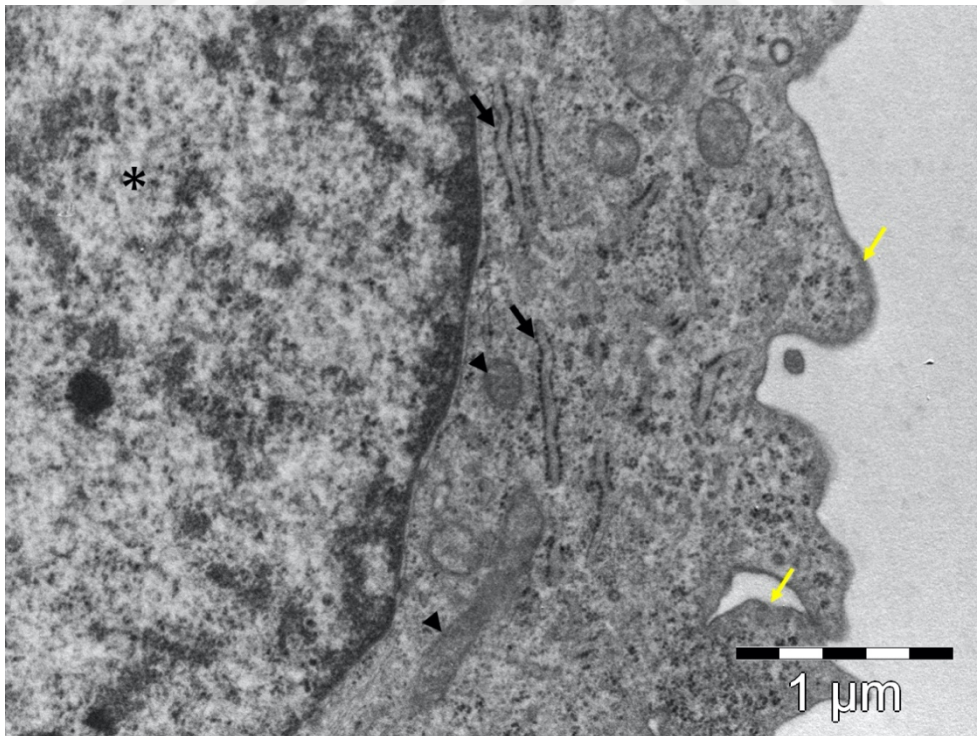
HT22 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntülerinde, kontrol grubunun ökromatik nükleusa sahip, hücre membranının, sitoplazmik organelerin normal ultrastrüktürel yapıda hücreler olduğu ve lamellipodia yapılarının varlığı görülmüştür (Şekil 4.12A, Şekil 13-16).



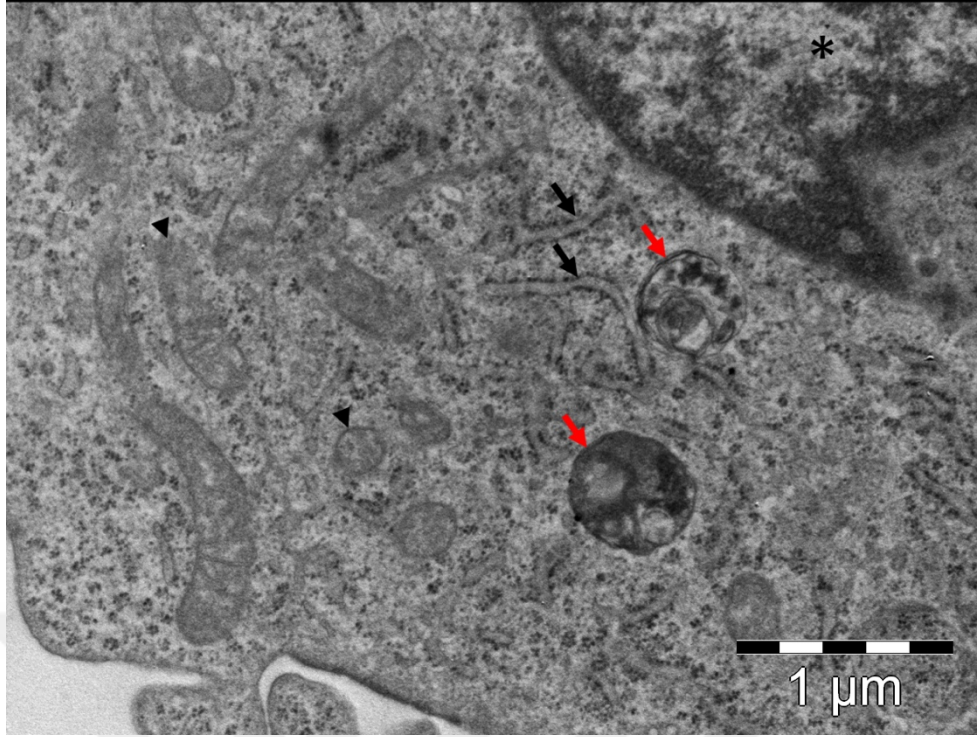
Şekil 4.13. HT22 hücrelerinin elektron mikroskopik olarak görüntüsü. (A) Kontrol grubundaki hücrelerin 6 saat sonundaki genel morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek 5 µm. (B) kontrol grubunun 6 saat sonundaki normal yapıdaki granüllü endoplazmik retikulumların (siyah oklar) ve mitokondriyonların (siyah ok başları) morfolojisi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler) ve lamellipodia (sarı oklar).



Şekil 4.14. HT22 hücre hattının kontrol grubu hücreleri. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 6000X, ölçek: 5 µm.

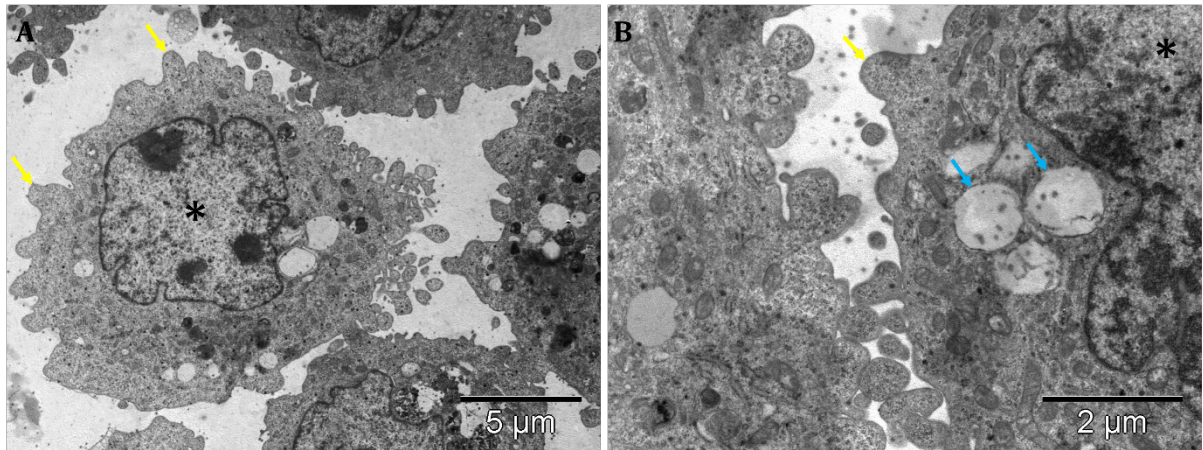


Şekil 4.15. HT22 hücre hattının kontrol grubu hücreleri. Normal yapıdaki nükleus (asterisk), lamellipodia (sarı oklar), granüllü endoplazmik retikulumların (siyah oklar), mitokondrionlar (siyah ok başları). Büyütme: 25000X, ölçek: 1 µm.

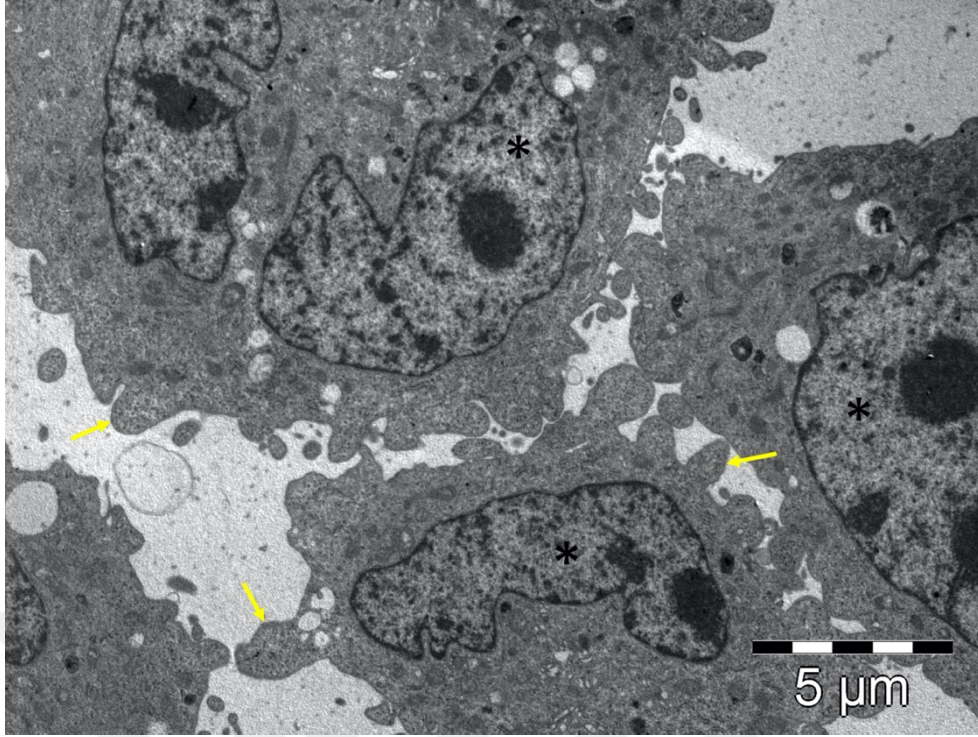


Şekil 4.16. HT22 hücre hattının kontrol grubu elektron mikroskopik görüntüsü. Nükleus (asterisk), granüllü endoplazmik retikulumlar (siyah oklar), mitokondriyonlar (siyah ok başları), lizozomlar (kırmızı oklar). Büyütme: 25000X; ölçek :1 µm.

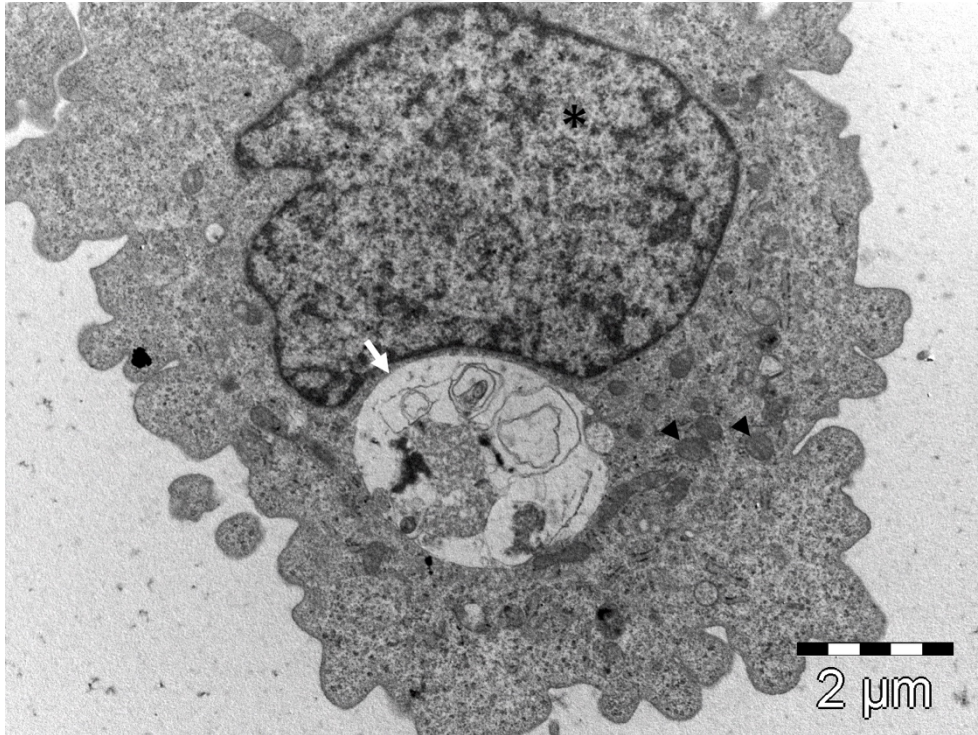
2 Gy radyasyon uygulanan grupta, radyasyondan 6 saat sonrasında kontrole göre veziküllerde ve lizozomlarda artışa, yer yer farklı büyüklüklerde otofagozomlara ve hücrenin ölümüne gittiğini gösteren izolasyon membranlarına rastlanmaktadır. Bunların yanında lamellipodia yapılarının varlığının devam etmekte olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12B, Şekil 17-21).



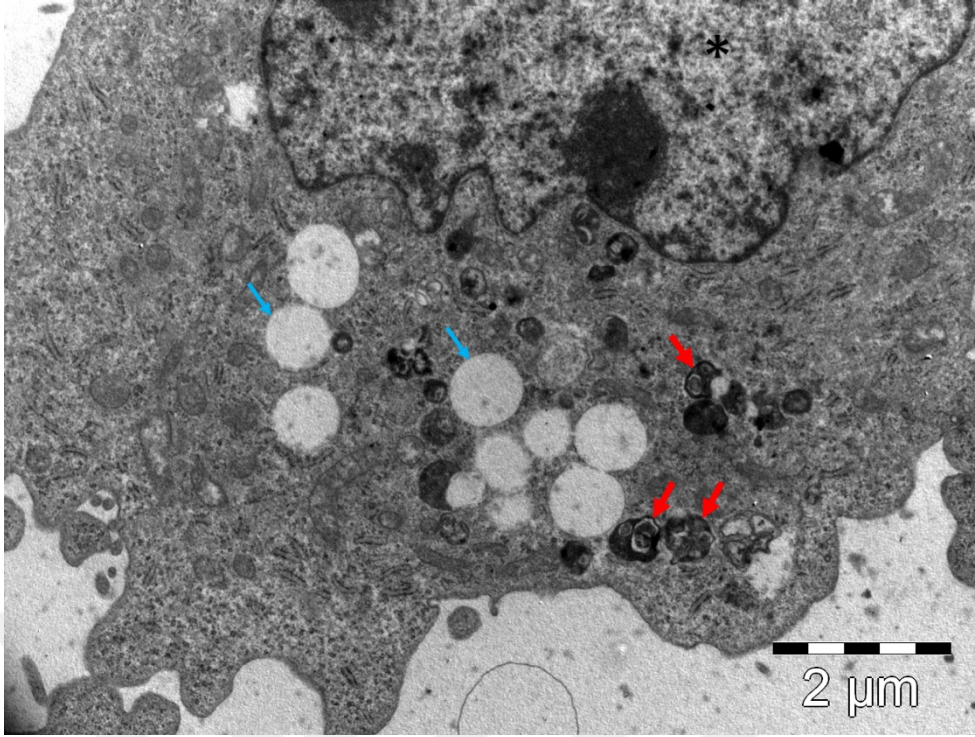
Şekil 4.17. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 2 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki genel morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek :5 µm. (B) 2 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki lamellipodia (sarı oklar) ve artış gösteren veziküllerin (mavi oklar) morfolojisi. Büyütme: 15000X, ölçek :2 µm. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar).



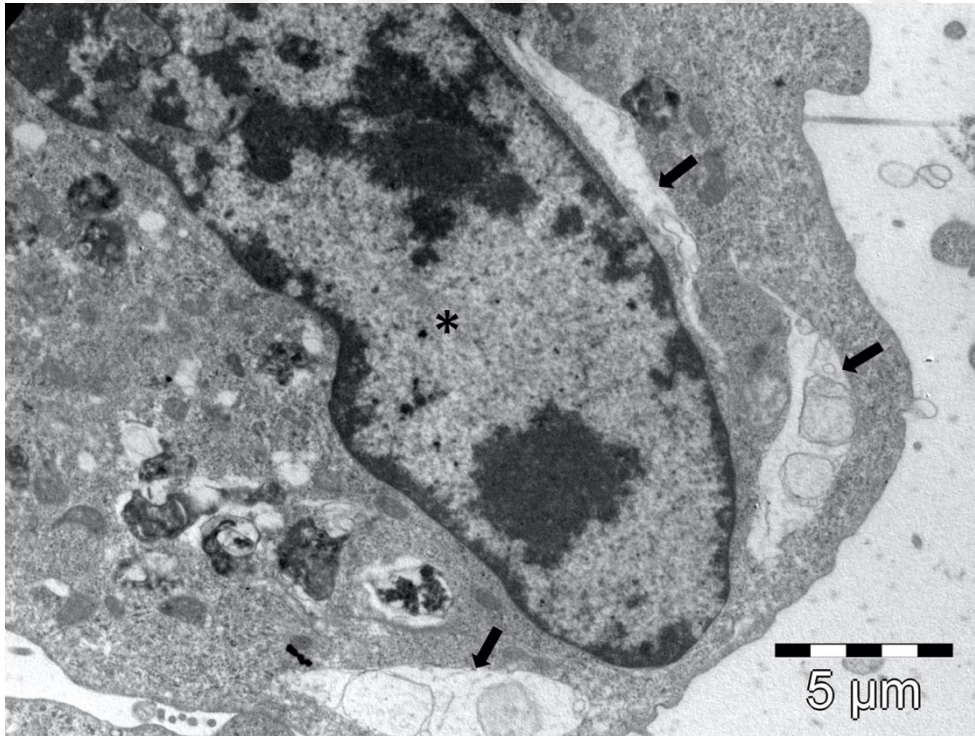
Şekil 4.18. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



Şekil 4.19. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), otofagozom (beyaz ok), normal yapıdaki mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm.

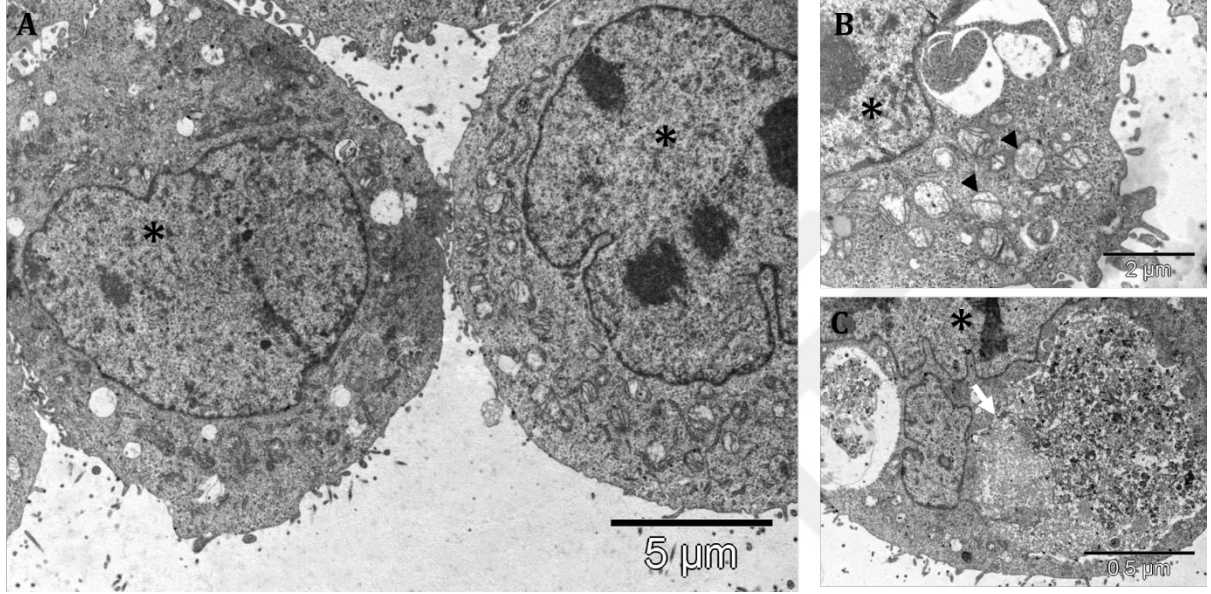


Şekil 4.20. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), sayısı artmış veziküller (mavi oklar) ve sayısı artmış lizozomlar (kırmızı oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm.

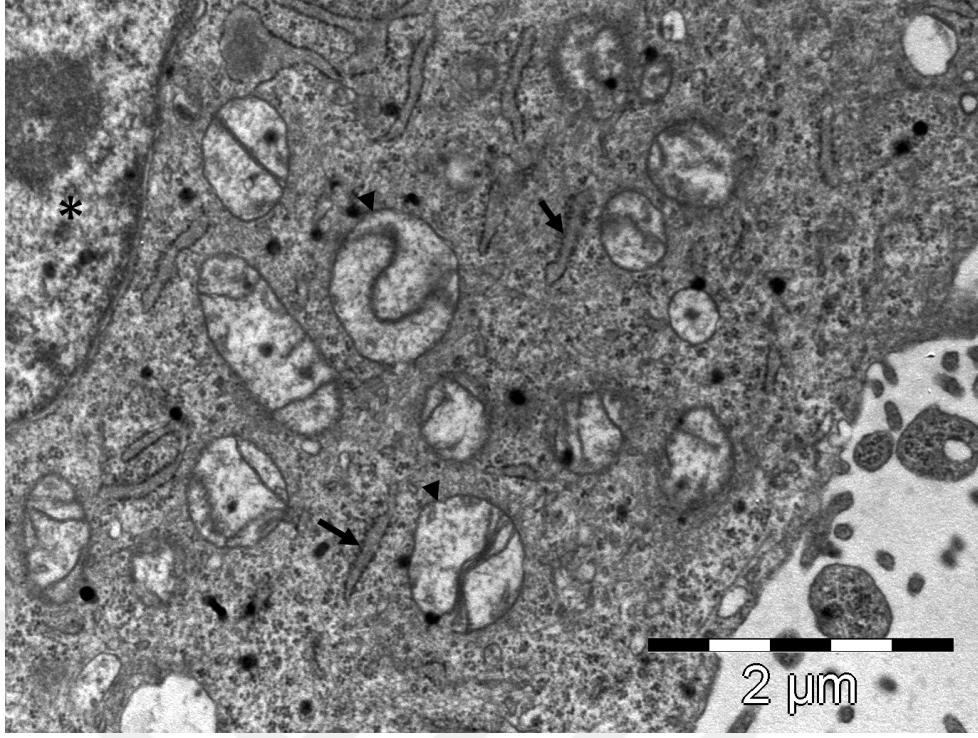


Şekil 4.21. HT22 hücrelerine uygulanan 2 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 5 µm.

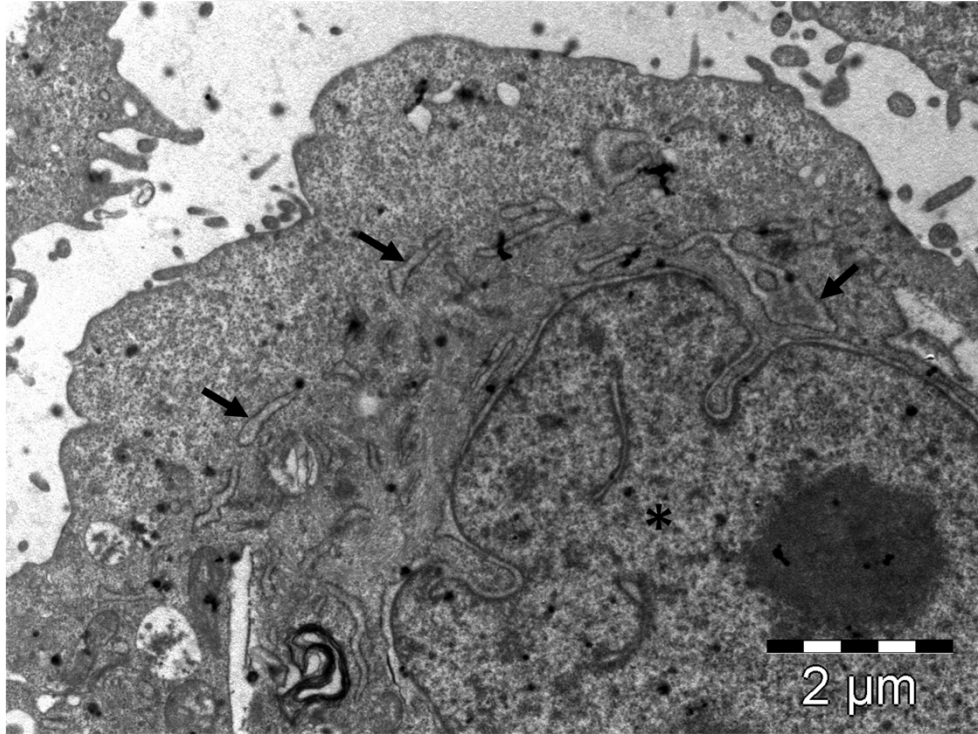
8 Gy radyasyon uygulanan grupta ise 2 Gy'e göre veziküllerde ve farklı büyüklüklerdeki otofagozomlarda artışa, mitokondriyal matrikste şişme ve dejenerasyona, genişlemiş perinükleer ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternalarına ve çok sayıda izolasyon membranlarına rastlanmaktadır (Şekil 4.12C, Şekil 4. 22-31). Ayrıca bu grupta, lamellipodiaların sayısının belirgin bir şekilde azaldığı, sadece filopodiaların varlığını koruduğu gözlenmektedir (Şekil 4.12C, Şekil 4. 22-31). Bu bulgulara ilave olarak, 8 Gy radyasyon uygulanan grupta zaman ilerledikçe (radyasyondan 24 saat sonra) mikronükleuslarda artış gözlenmiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.30).



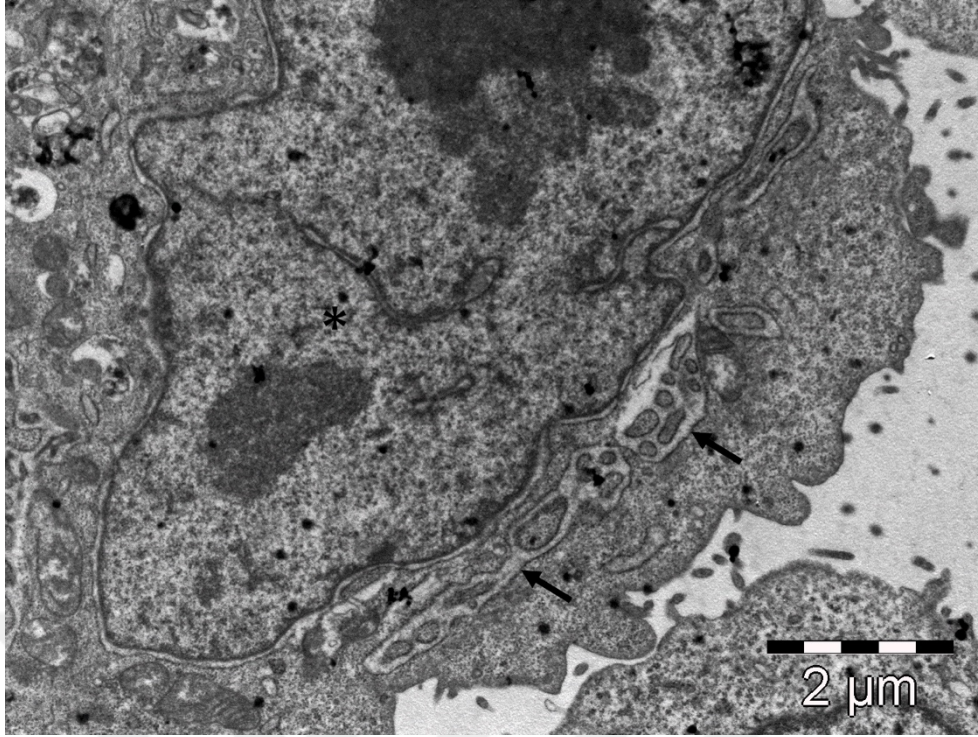
Şekil 4.22. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 8 Gy radyasyon grubunun 6 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm. (B) Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm. (C) Büyütme: 7500X, ölçek: 0,5 µm. Nükleus (asteriskler), otofagozom (beyaz ok), dejenere mitokondriyonlar (siyah ok başları).



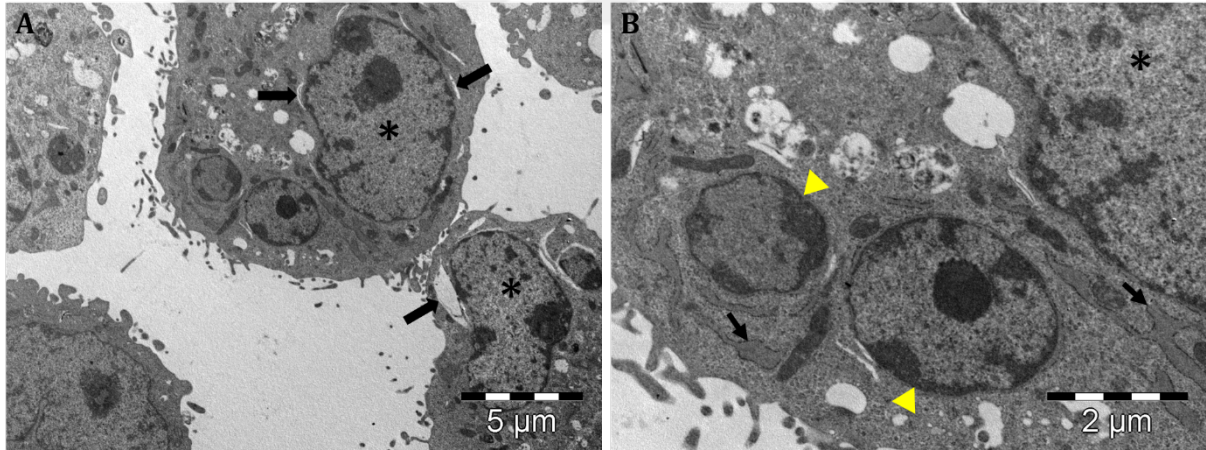
Şekil 4.23. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), dejenere mitokondriyonlar (siyah ok başları), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:20000X, ölçek: 2 µm.



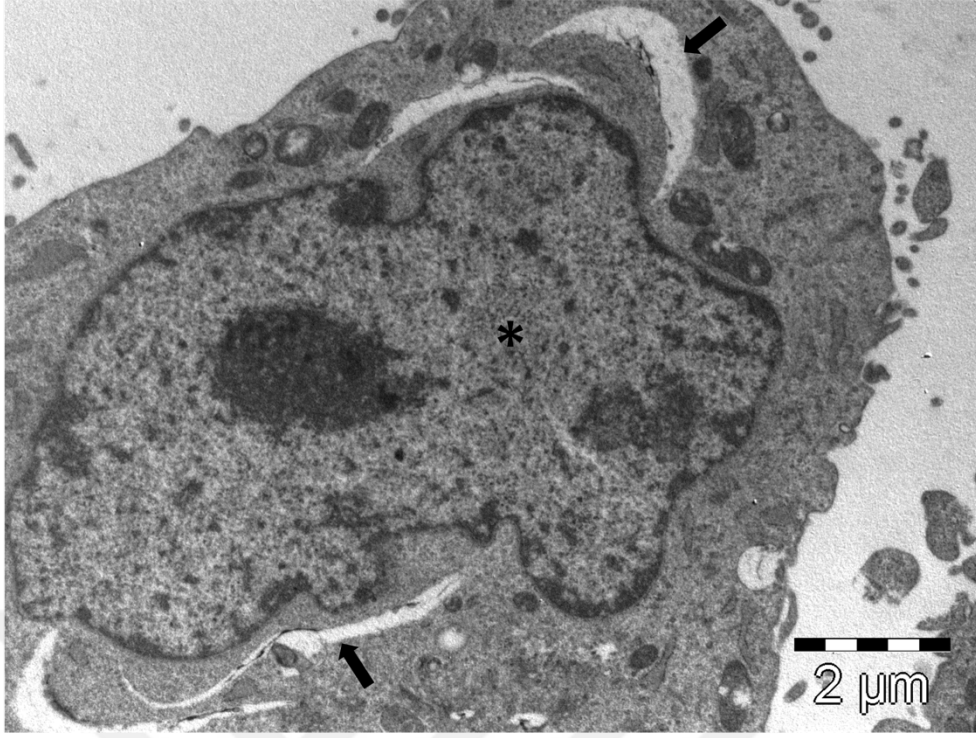
Şekil 4.24. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:12000X, ölçek: 2 µm.



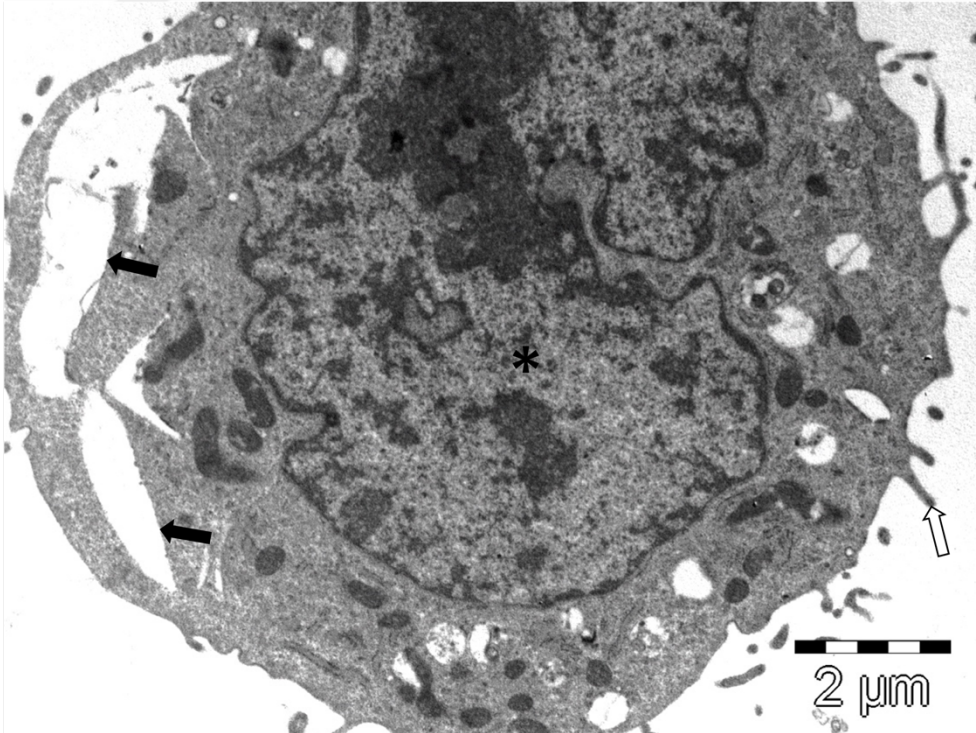
Şekil 4.25. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 6 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar). Büyütme:12000X, ölçek: 2 µm.



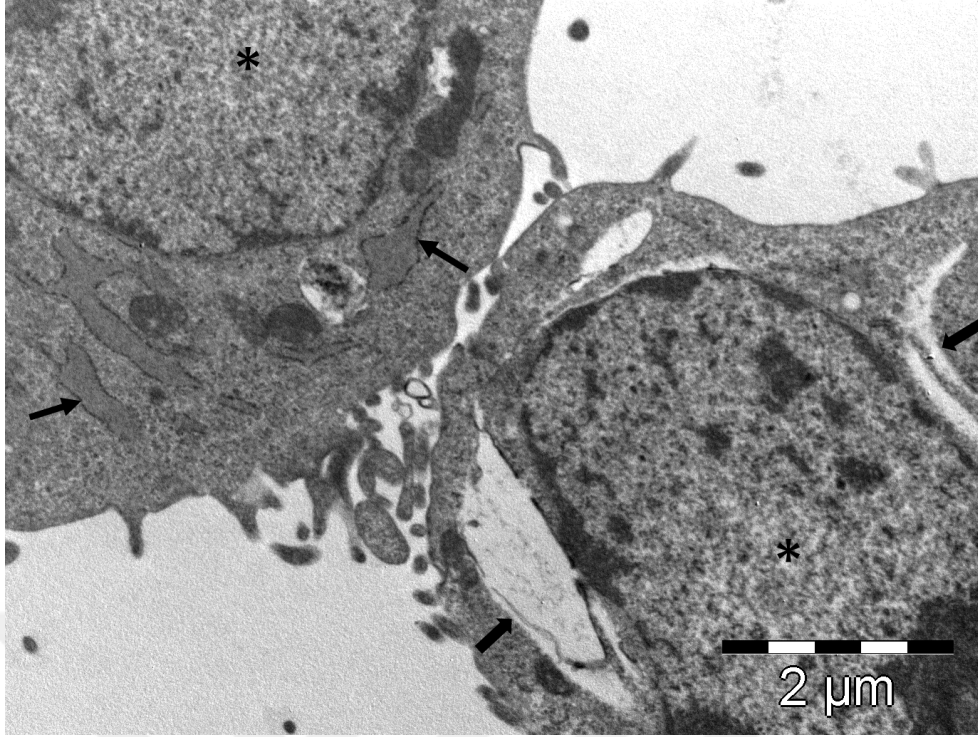
Şekil 4.26. HT22 hücrelerine uygulanan iyonize edici radyasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. (A) 8 Gy radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojisi. Büyütme:5000X, ölçek: 5 µm. (B) Büyütme:15000X, ölçek: 2 µm. Nükleus (asteriskler), izolasyon membranı (kalın siyah oklar), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), mikronükleuslar (sarı ok başları).



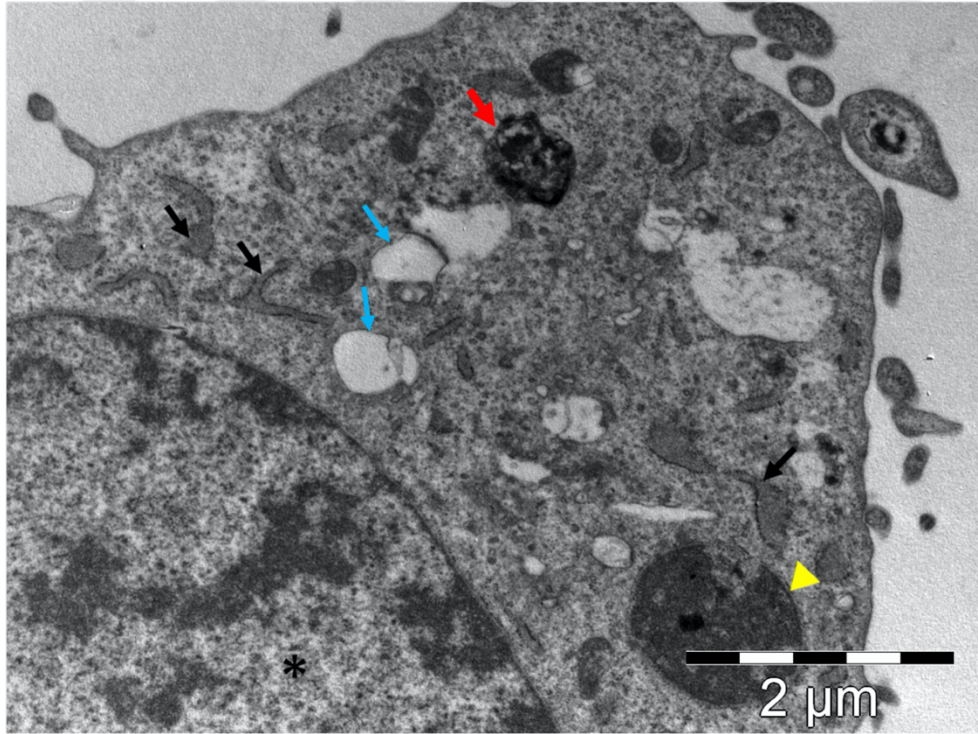
Şekil 4.27. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (kalın siyah oklar), Büyütme:10000X, ölçek: 2 μ m.



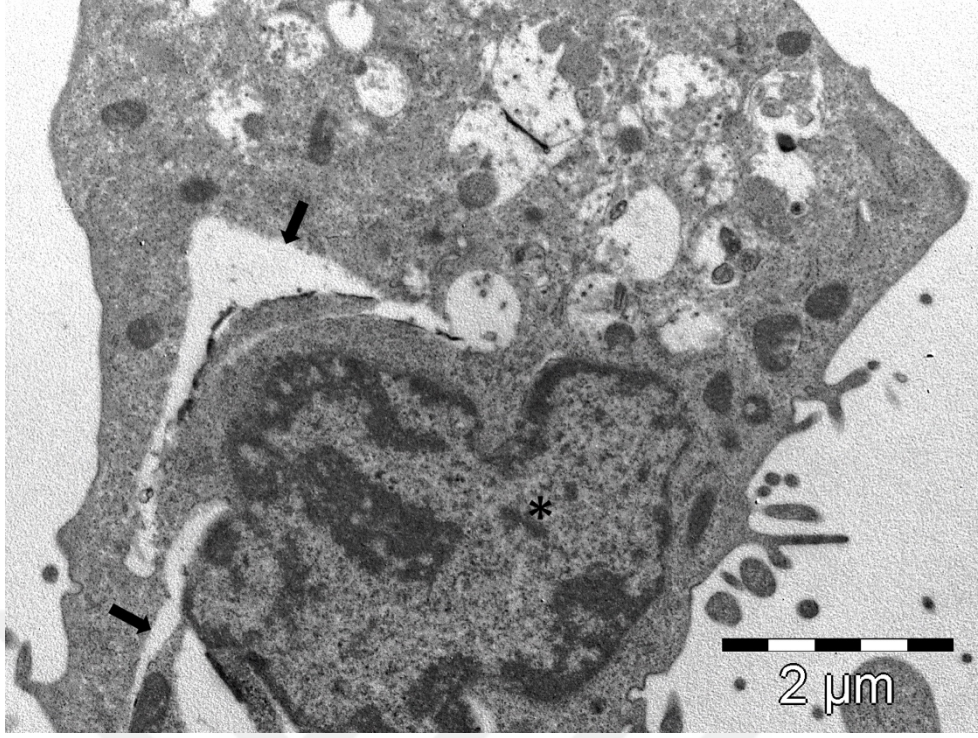
Şekil 4.28. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (kalın siyah oklar), filopodia (kalın beyaz ok). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 μ m.



Şekil 4.29. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme:15000X, ölçek: 2 μm.



Şekil 4.30. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), genişlemiş GER sisternaları (siyah oklar), mikronükleus (sarı ok başı), lizozom (kırmızı ok), veziküller (mavi ok). Büyütme:15000X, ölçek: 2 μm.

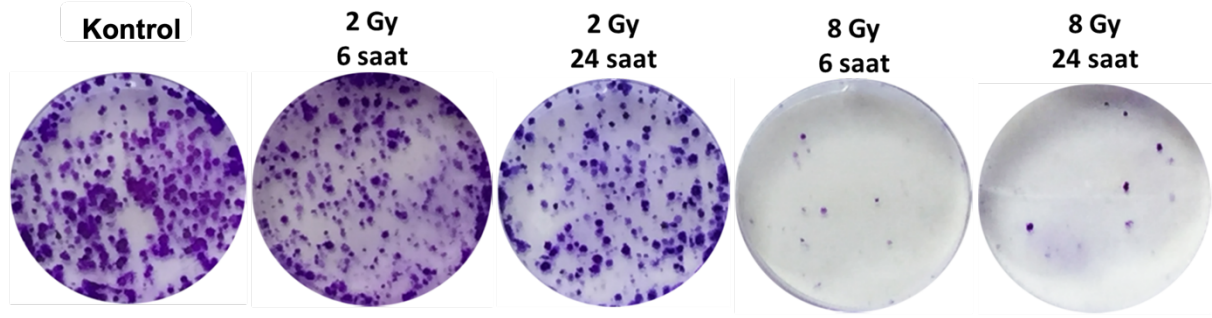


Şekil 4.31. HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy iyonize edici radyasyonun 24 saat sonundaki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asterisk), izolasyon membranları (siyah kalın oklar). Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm.

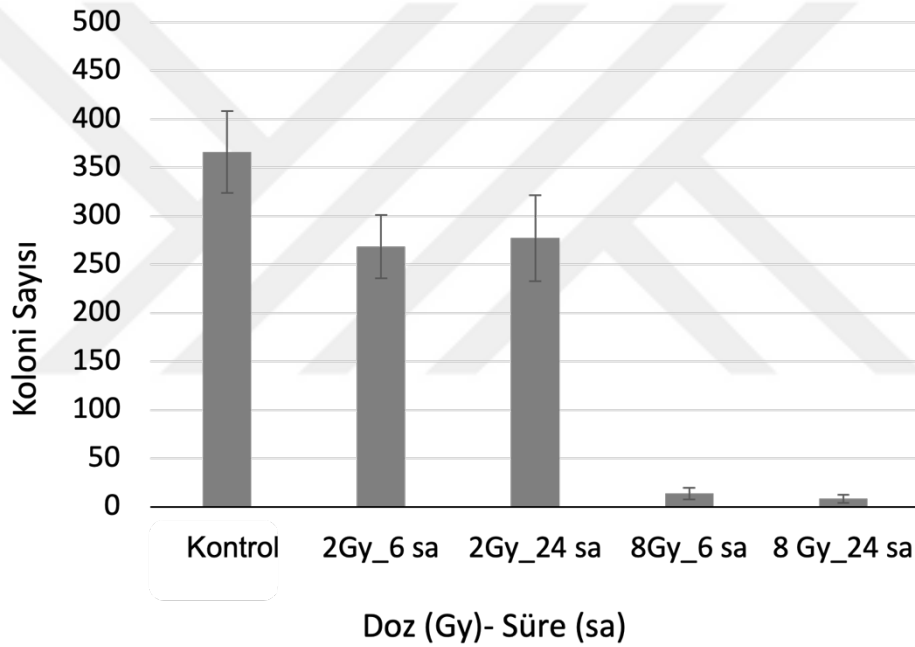
4.2.2. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi Bulguları

HT22 hücrelerine 2 ve 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulandıktan sonra, zamana bağlı hayatta kalan hücre sayılarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen ve basamak 1.2 kapsamında yapılan CKHKT sonuçlarına göre, koloni sayıları radyasyon uygulanan gruplarda kontrole göre azalmıştır ($P < 0,001$) (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Tablo 4.2). 2 Gy radyasyon uygulanan gruplar (6 ve 24 saat) kendi içinde karşılaştırıldığında, 2 Gy_24 saat grubunda koloni sayısında bir artış gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Tablo 4.2). 8 Gy radyasyon uygulanan gruplar (6 ve 24 saat) kendi içinde karşılaştırıldığında, 8 Gy_24 saat grubunda koloni sayısında bir azalma gözlenmiş ancak istatistiksel olarak bu azalma anlamlı değildir (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Tablo 4.2).

İyonize Edici Radyasyon Dozları



Şekil 4.32. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve zamana bağlı değişen koloni görüntüleri. %0,5'lik kristal violet.



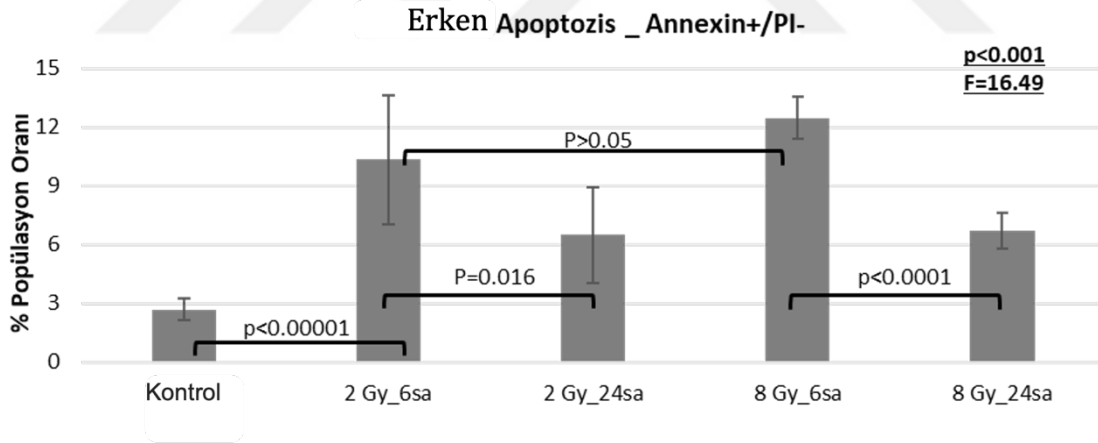
Şekil 4. 33. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen ve zamana bağlı değişen koloni sayısı grafiği (n=24).

Tablo 4.2. Kontrol, 2 ve 8 Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin canlı kalan hücre kolonisi testi ile ölçülen ve zamana bağlı değişen canlı koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n= 24)

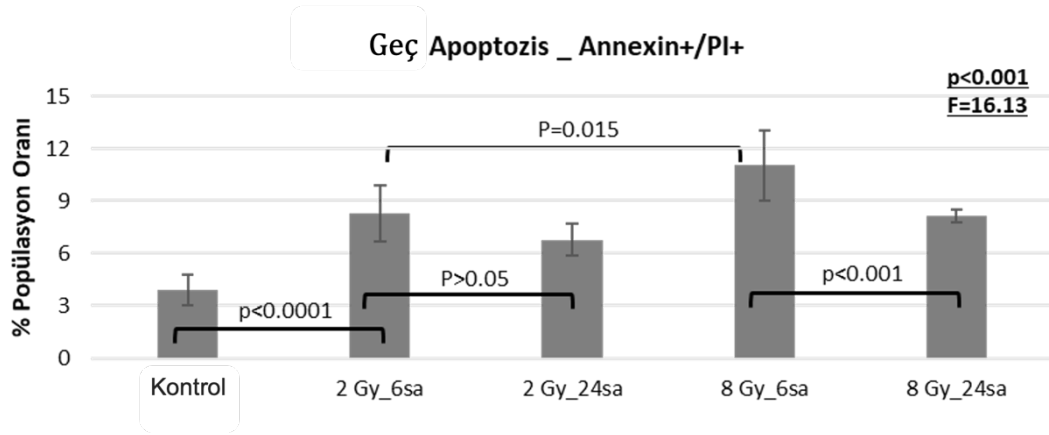
GRUPLAR	Kontrol	2 Gy_6 saat	2 Gy_24 saat	8 Gy_6 saat	8 Gy_24 saat
ORTALAMA ($\pm$ SS)	366,17 $\pm$ 42,15	268,33 $\pm$ 32,77	277,17 $\pm$ 44,20	13,60 $\pm$ 5,90	7,13 $\pm$ 4,71

4.2.3. Akım Sitometrik Bulgular

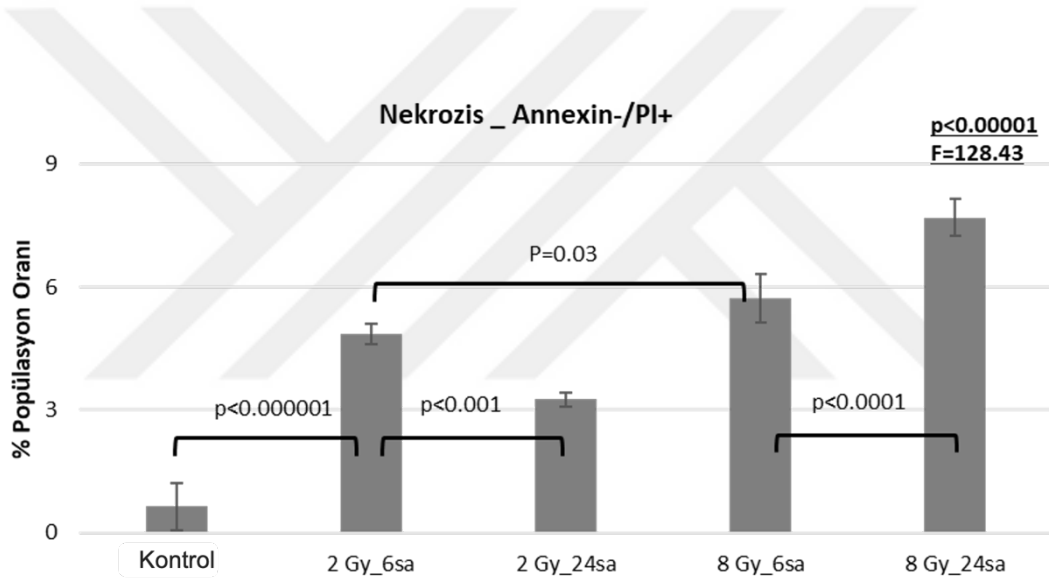
HT22 hücrelerine 2 ve 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulama işleminden sonra, zamana bağlı hayatta kalan hücrelerin tüm popülasyona oranla ne kadarının erken apoptotik hücreler, ne kadarının geç apoptotik hücreler ve ne kadarının nekrotik (ölü) hücre olduğunu ve bunun belirlenmiş olan 2 farklı zaman noktasında nasıl değiştiğini anlamak için gerçekleştirilen akım sitometrik analizler sonucunda, kontrole göre, 2 Gy ve 8 Gy radyasyon uygulamasından 6 saat sonra hem erken hem de geç apoptozda ve nekrozda bir artış gözlenmiş, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$) (Şekil 4.34-37). 2 Gy radyasyon uygulanan grupların zamana bağlı alt grupları kendi içinde karşılaştırıldığında, hücrelerdeki nekroz oranı, 24 saat sonunda 6 saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0,001$) (Şekil 4.36, Şekil 4.37). Erken apoptoz ve geç apoptozdaki azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.37). 8 Gy radyasyon uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise hücrelerdeki erken ve geç apoptozda, 6 saate göre 24 saat sonunda bir azalma ($P<0,001$) (Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.37); nekrozda ise artış gözlenmiştir ($P<0,001$) (Şekil 4.36, Şekil 4.37) ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.



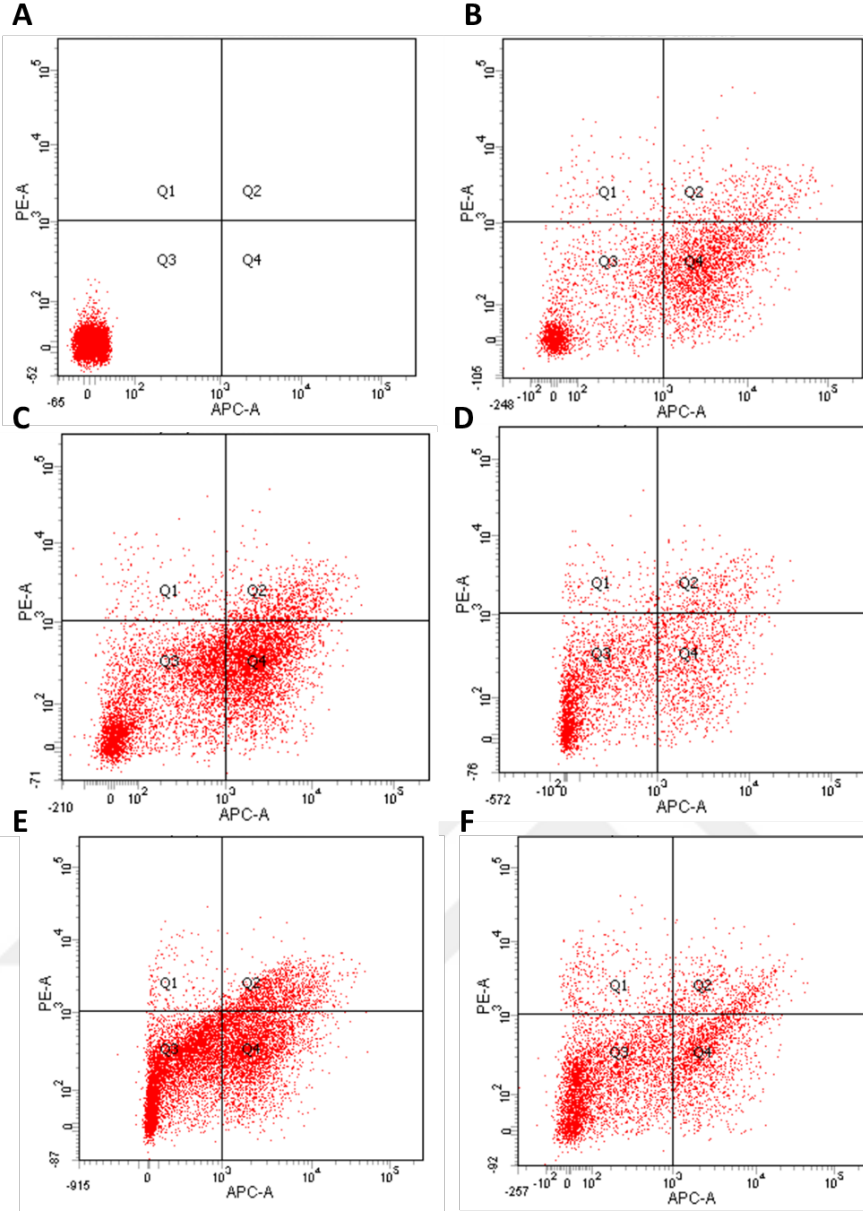
Şekil 4.34. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve erken apoptoza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4).



Şekil 4.35. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve geç apoptoza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4).



Şekil 4.36. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve nekroza uğrayan HT22 hücrelerinin tüm popülasyona oranının gösterilmesi (n=4).



Şekil 4.37. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan grupların erken, geç apoptoz ve nekroza uğrayan HT22 hücrelerinin popülasyon oranlarının gösterilmesi. İşaretlenmemiş hücreler (A), Kontrol (B), 2 Gy_6 sa (C), 2 Gy_24 sa (D), 8 Gy_6 sa (E), 8 Gy_24 sa (F). (n=4).

4.2.4. tRNA İzolasyon ve Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

4.2.4.1. tRNA Miktar ve Saflık Bulguları

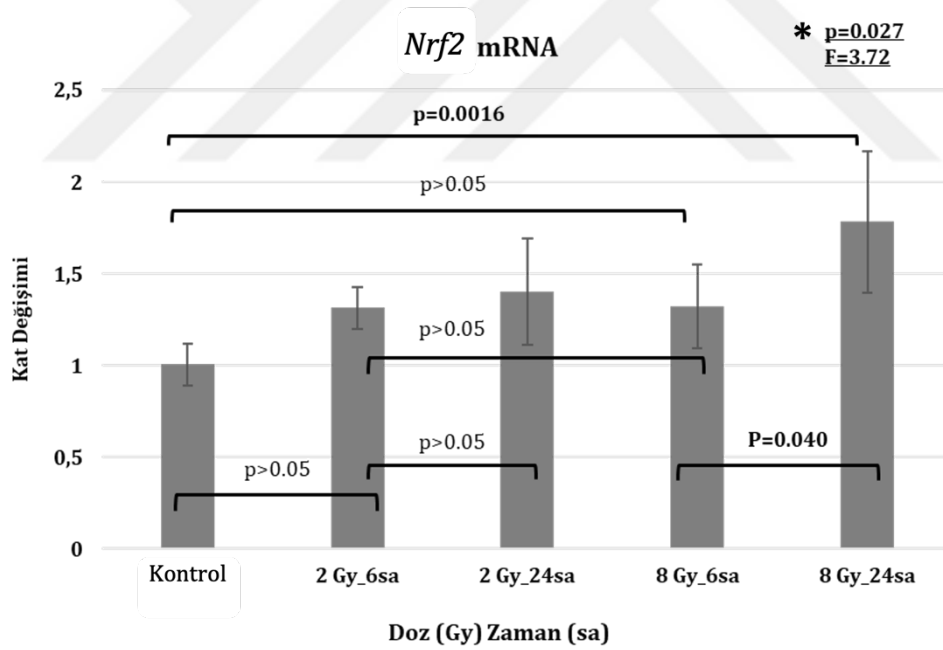
Kontrol, 2 Gy (6 saat ve 24 saat) ve 8 Gy (6 saat ve 24 saat) radyasyon işlemi uygulamasından sonra, hedef genlerin ekspresyon analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla elde edilen tRNA'ların öncelikle miktar ve saflık tayini yapılmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kontrol, 2 Gy (6 saat ve 24 saat sonunda) ve 8 Gy (6 saat ve 24 saat sonunda) radyasyon uygulamasından sonra gruplardan elde edilen tRNA miktar ve saflık tayini (ortalama $\pm$ SS) (n=4)

Gruplar	tRNA (ng/ μ l)	A260/280	A260/230
Kontrol	542,875 $\pm$ 199,90	2,08 $\pm$ 0,004	1,84 $\pm$ 0,43
2Gy_6 saat (RAD1)	851,35 $\pm$ 105,21	2,10 $\pm$ 0,007	2,1 $\pm$ 0,12
2Gy_24 saat (RAD2)	1092,275 $\pm$ 81,91	2,10 $\pm$ 0,004	2,10 $\pm$ 0,40
8Gy_6saat (RAD3)	845 $\pm$ 287,40	2,09 $\pm$ 0,008	2,06 $\pm$ 0,11
8Gy_24 saat (RAD4)	986,9 $\pm$ 123,87	2,10 $\pm$ 0,013	2,07 $\pm$ 0,10

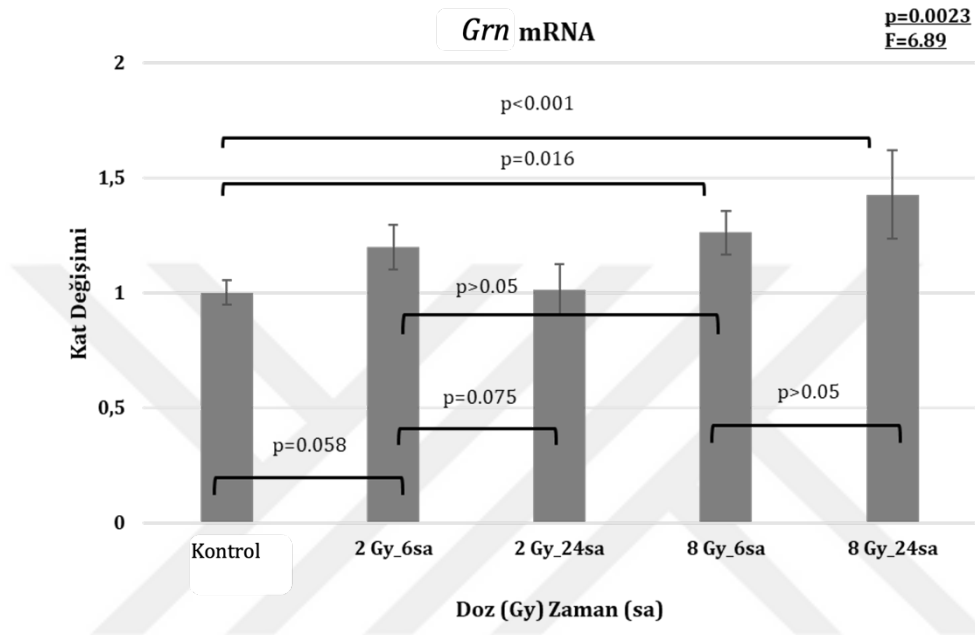
4.2.4.2. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

Nrf2 mRNA ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla, sadece 8 Gy radyasyondan 24 saat sonraki artışın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($P<0,001$) (Şekil 4.38). 2 ve 8 Gy radyasyon grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 6 saat sonundaki ekspresyon düzeylerine göre 24 saat sonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. (Şekil 4.38).

**Şekil 4. 38.** Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin *Nrf2* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).³

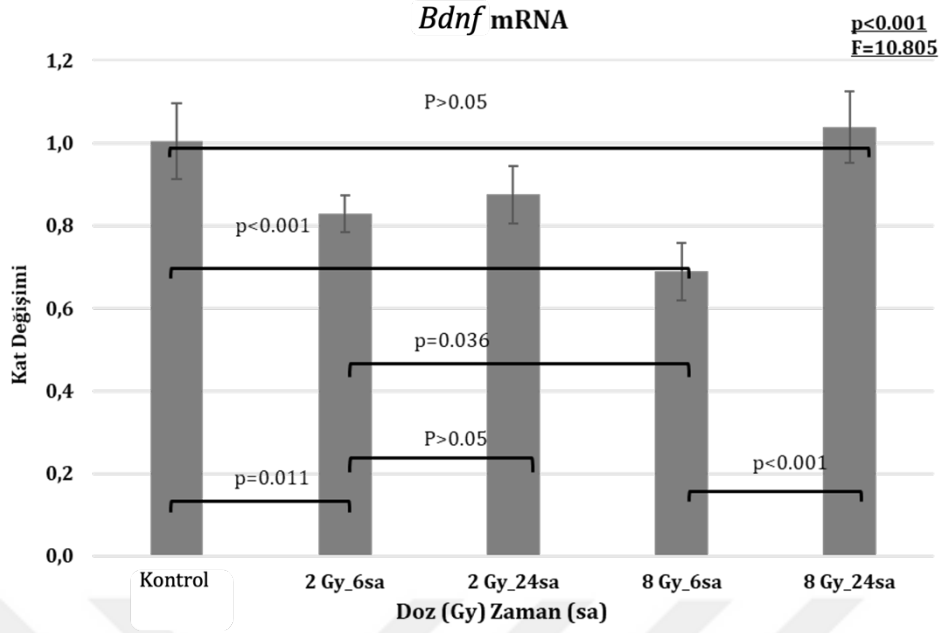
³ **Nrf2, Grn, Bdnf ve Dusp22 mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında kullanılan grafiklerin sağ üst köşesindeki p ve F değerleri, Oneway ANOVA testi anlamlılık ve fonksiyon değerlerini vermektedir. Barlar arasındaki çubuklar ve p değerleri, ilgili gruplar arasındaki LSD post-hoc testi anlamlılık değerlerini göstermektedir (Şekil 4.38-41).*

Grn mRNA ekspresyon düzeylerindeki artışın, kontrol grubuna kıyasla, sadece 8 Gy radyasyondan 24 saat sonraki grupta anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($P<0,001$) (Şekil 4.39). 2 Gy radyasyon alan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 6 saat sonundaki ekspresyon düzeylerine göre 24 saat sonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Benzer şekilde, 8 Gy radyasyon alan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 6 saat sonundaki ekspresyon düzeylerine göre 24 saat sonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.39).



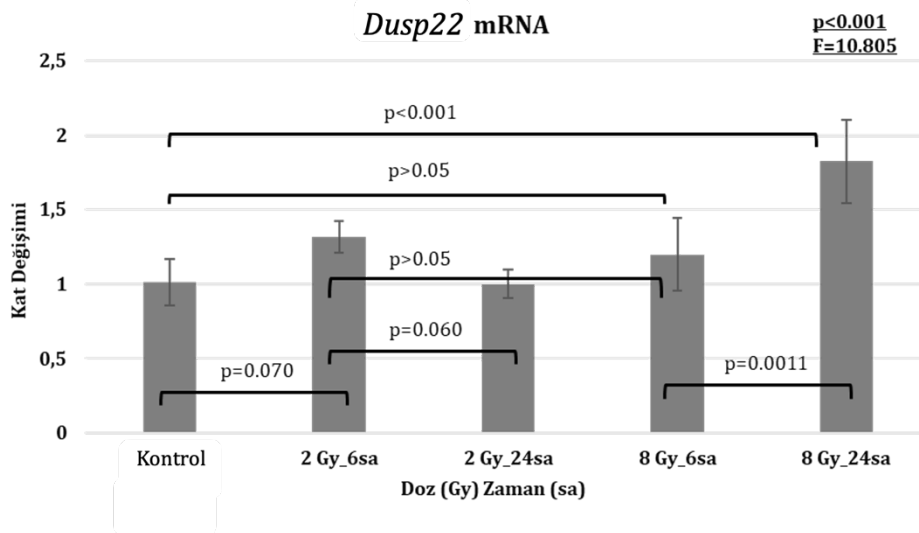
Şekil 4. 39. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin *Grn* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

Bdnf mRNA ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla, 2 ve 8 Gy radyasyon uygulandıktan 6 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı düzeyde doza bağlı bir azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (sırasıyla $P=0,011$ ve $P<0,001$) (Şekil 4.40). 2 ve 8 Gy radyasyon alan gruplar kendi içlerinde ayrı ayrı karşılaştırıldığında, sadece 8 Gy radyasyon uygulanan grupta 24 saat sonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$) (Şekil 4.40).



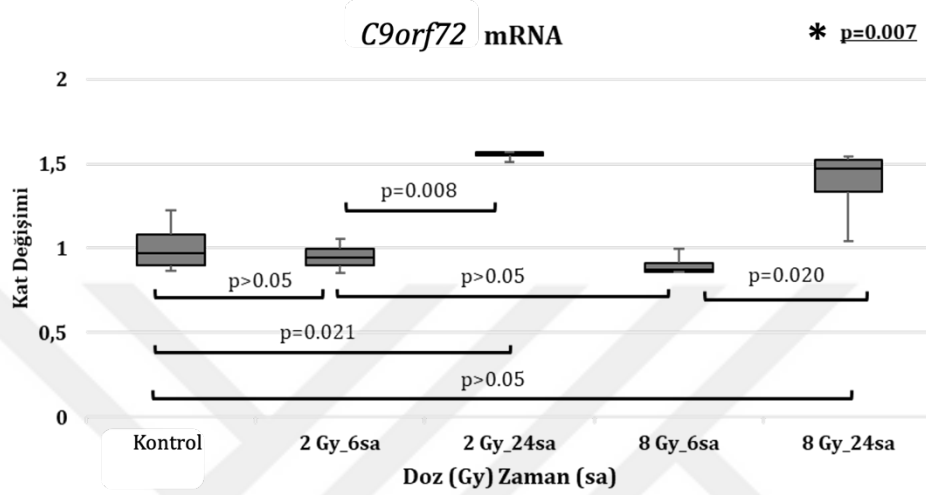
Şekil 4. 40. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin *Bdnf* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

Dusp22 mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı tek farklılık, kontrol grubuna kıyasla 8 Gy radyasyon verildikten sonra 24 saat beklenen grupta, artış yönünde görülmüştür ($P<0,001$) (Şekil 4.41). Ayrıca, 8 Gy radyasyona maruz kalan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 6 saat sonundaki ekspresyon düzeylerine göre 24 saat sonundaki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin *Dusp22* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

C9orf72 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla, 2 ve 8 Gy gruplarında iyonize edici radyasyon uygulamasından 6 saat sonra anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. 2 Gy doz radyasyondan 24 saat sonra ekspresyonun kontrol ve 6 saat gruplarına göre anlamlı biçimde arttığı tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0,021$, $P= 0,008$) (Şekil 4.42). 8 Gy radyasyon alt grupları karşılaştırıldığında 24 saat sonundaki artışın 6 saate göre anlamlı olduğu bulunmuştur ($P=0,02$) (Şekil 4.42).



Şekil 4. 42. Kontrol, 2 (6 sa ve 24 sa sonunda) ve 8 (6 sa ve 24 sa sonunda) Gy iyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin *C9orf72* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).^{*4}

4.3. Basamak 2.1 Bulguları

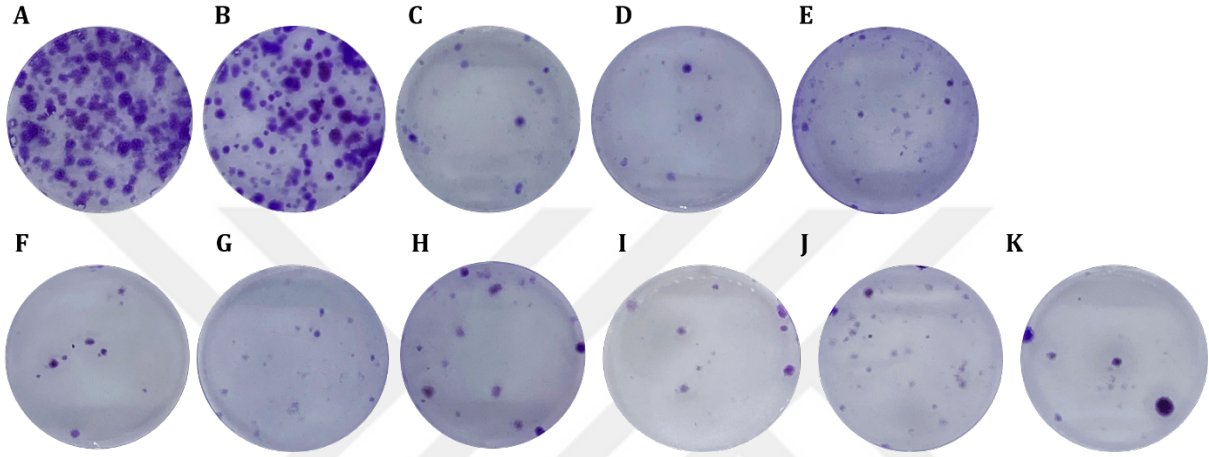
4.3.1. Canlı Kalan Hücre Kolonisi Testi Bulguları

Bu basamaktaki deneyler, 2 farklı seferde gerçekleştirilmiş ve deneylerde birçok farklı kombinasyonda makrofaj medyası kullanılmıştır (Şekil 3.6). Bu nedenle, karışıklık oluşturmaması açısından bu basamaktaki gruplar A ve B olarak alt gruplara ayrılmıştır. Yani, ilk seferde gerçekleştirilen ve Şekil 3.6A'da özetlenmiş olan gruplardan bahsedilirken grup (G) yanına A harfi konulmuş, Şekil 3.6B'deki gruplardan bahsedilirken G'nin yanına B harfi konulmuştur.

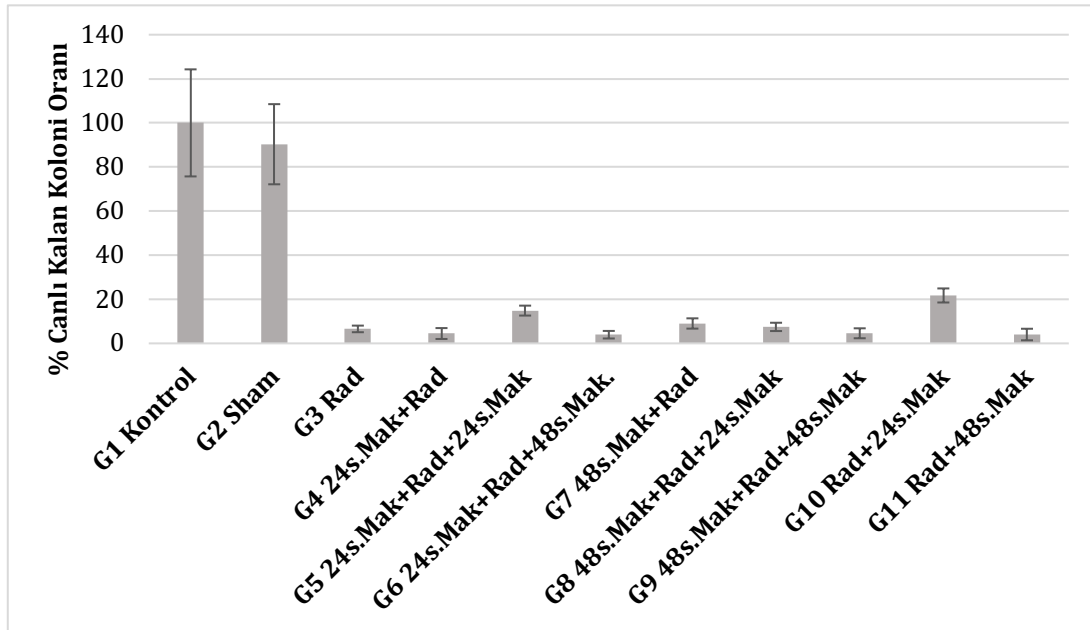
İyonize edici radyasyon tedavisinde kullanılan makrofaj medyasının (KM) sürelerinin ve radyasyon öncesi ve/veya sonrasındaki kombinasyonlarının test edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiş olan CKHKT sonuçlarındaki canlı kalan koloni oranları verileri incelendiğinde,

⁴ **C9orf72* mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında kullanılan grafiğin sağ üst köşesindeki p değeri, Kruskal-Wallis testi anlamlılık değerini göstermektedir. Box-Plot barları arasındaki çubuklar ve p değerleri, ilgili gruplar arasındaki Bonferroni post-hoc testi anlamlılık değerlerini göstermektedir.

kontrole (G1-A) göre sham (G2-A) hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0,001$) (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Tablo 4.4). Bunun yanında, diğer grupların radyasyon verilme işlemi süresi boyunca, steril bir şekilde inkübatör dışında tutulan sham grubundaki (G2-A) kontrole (G1-A) göre olan azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Tablo 4.4). Sadece radyasyon verilen gruba (G3-A) göre tek tek diğer tedavi grupları karşılaştırıldığında, G5-A, G7-A ve G10-A gruplarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Tablo 4.4).



Şekil 4.43. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve Şekil 3.4A'da özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan kolonileri. (A) G1-A, (B) G2-A, (C) G3-A, (D) G4-A, (E) G5-A, (F) G6-A, (G) G7-A, (H) G8-A, (I) G9-A, (J) G10-A, (K) G11-A, %0,5'lik kristal violet.

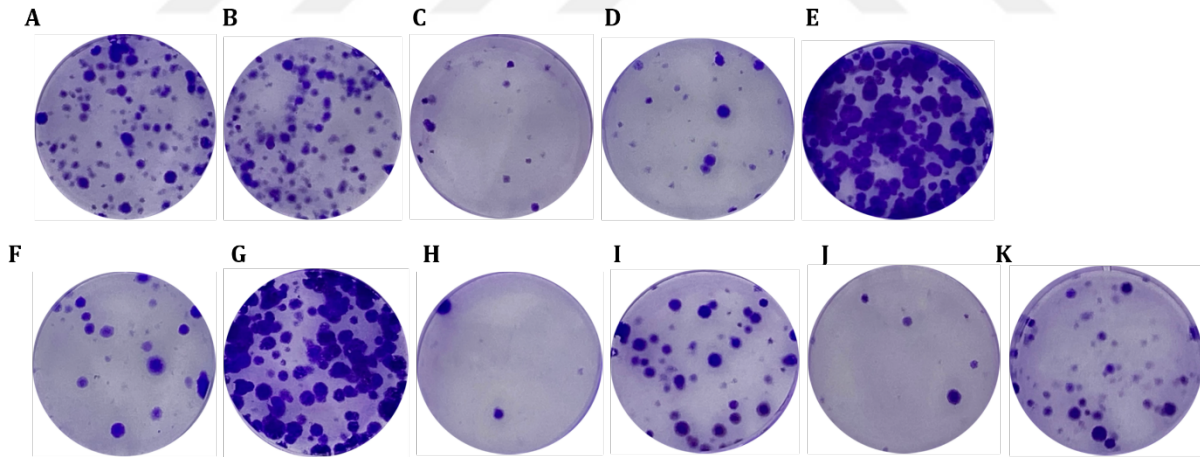


Şekil 4. 44. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin Şekil 3.6A'daki gruplar arasındaki CKHKT testi sonucu ölçülen yüzde canlı kalan koloni oranı grafiği. Grup (G), radyasyon (Rad), makrofaj medyası (Mak), saat (s). (n=12).

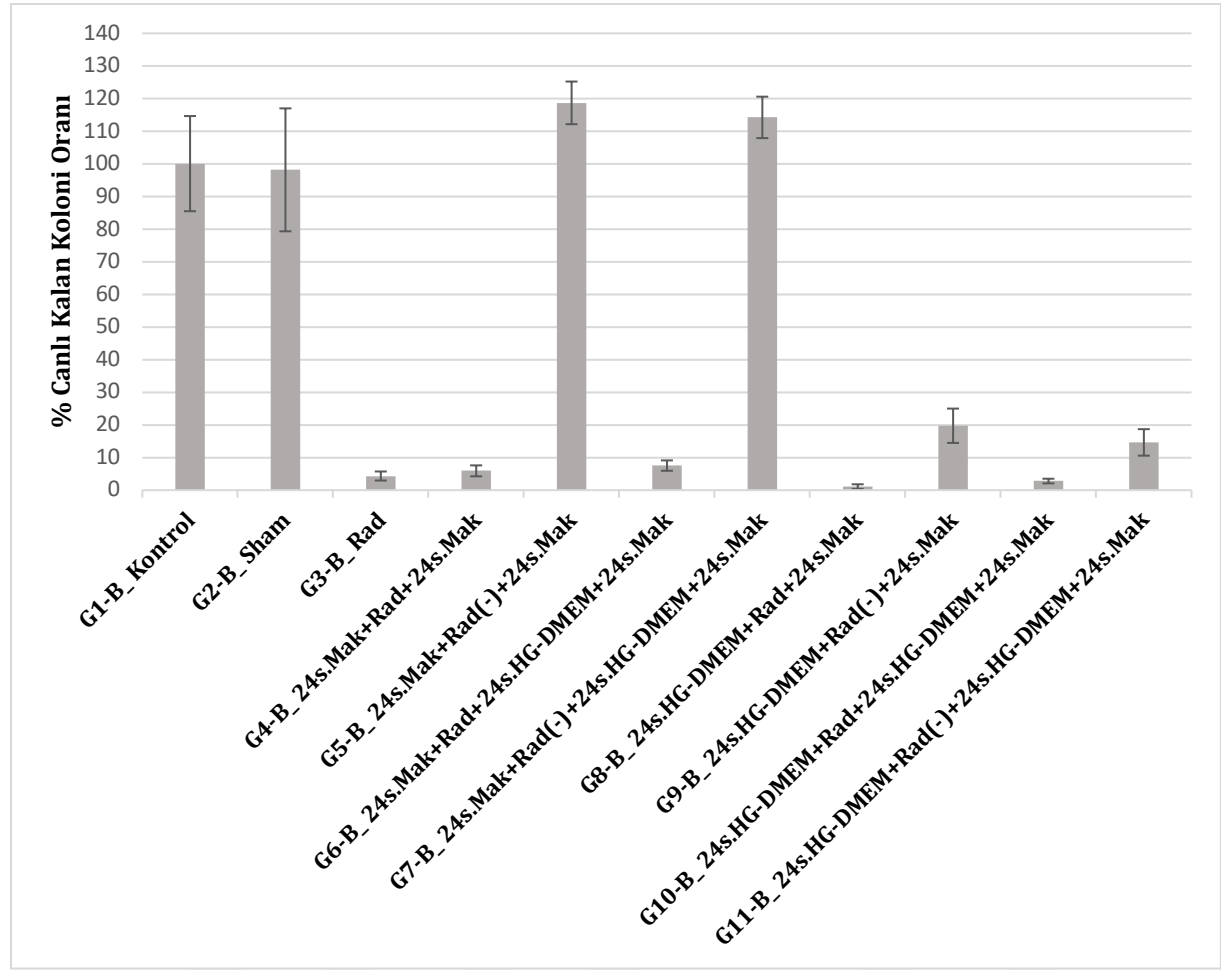
Tablo 4.4. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve Şekil 3.4A'da özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan koloni sayılarının ortalama ve standart sapma ($\pm$ SS) verileri (n=12)

	G1-A	G2-A	G3-A	G4-A	G5-A	G6-A	G7-A	G8-A	G9-A	G10-A	G11-A
ORTALAMA ($\pm$ SS)	311,00 $\pm$ 78,86	280,91 $\pm$ 59,28	20,42 $\pm$ 4,87	13,92 $\pm$ 8,02	46,25 $\pm$ 7,32	12,25 $\pm$ 5,56	28,08 $\pm$ 7,58	23,25 $\pm$ 6,12	14,25 $\pm$ 7,33	61,67 $\pm$ 17,59	12,50 $\pm$ 8,50

Grupları Şekil 3.6A'da özetlenen CKHKT'deki canlı kalan koloni oranlarının sonuçlarına göre gerçekleştirilmiş olan (Şekil 3.6A, Şekil 4.43, Şekil 4.44) ve grupları Şekil 3.6B'de özetlenen deneylerin CKHKT sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna göre (G1-B) tüm radyasyon gruplarının (G3-B, G4-B, G6-B, G8-B, G10-B) canlı kalan koloni oranlarının anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($P<0,001$) (Şekil 4.45, Şekil 4.46, Tablo 4.5). Diğer grupların radyasyon verilme işlemi süresi boyunca, steril bir şekilde inkübatör dışında tutulan sham grubundaki (G2-B) kontrole (G1-B) göre olan azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.45, Şekil 4.46). Bunun yanında, kontrol grubuna (G1-B) göre, radyasyon uygulanmayan makrofaj medya kombinasyonlarının sham gruplarındaki (G5-B ve G7-B) artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($P<0,001$) (Şekil 4.45, Şekil 4.46). Sadece iyonize edici radyasyon uygulanan gruba göre (G3-B), G6-B'deki artış, istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($P<0,001$) (Şekil 4.45, Şekil 4.46).



Şekil 4.45. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin CKHKT testi ile ölçülen ve Şekil 3.4B' de özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan kolonileri. (A) G1-B, (B) G2-B, (C) G3-B, (D) G4-B, (E) G5-B, (F) G6-B, (G) G7-B, (H) G8-B, (I) G9-B, (J) G10-B, (K) G11-B, %0,5'lik kristal violet.



Şekil 4.46. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan HT22 hücrelerinin Şekil 3.6B'deki gruplar arasındaki CKHKT testi sonucu ölçülen yüzde canlı kalan koloni oranı grafiği. Grup (G), radyasyon (Rad), makrofaj medyası (Mak), saat (s). (n=12).

Tablo 4.5. İyonize radyasyon dozlarına maruz kalan ve Şekil 3.4B'de özetlenen makrofaj medyası kombinasyonları ile tedavi edilen HT22 hücrelerinin CKHKT testi sonucu ölçülen canlı kalan koloni sayılarının ortalama ve standart sapma verileri (n=12)

Gruplar	G1-B	G2-B	G3-B	G4-B	G5-B	G6-B	G7-B	G8-B	G9-B	G10-B	G11-B
ORTALAMA (±SS)	232,42 ±35,37	228 ±45,88	10,08 ±3,37	13,75 ±4,07	275,67 ±16,10	17,33 ±4,15	265,33 ±15,41	2,56 ±1,74	45,86 ±13,2	6,5 ±1,74	34 ±9,85

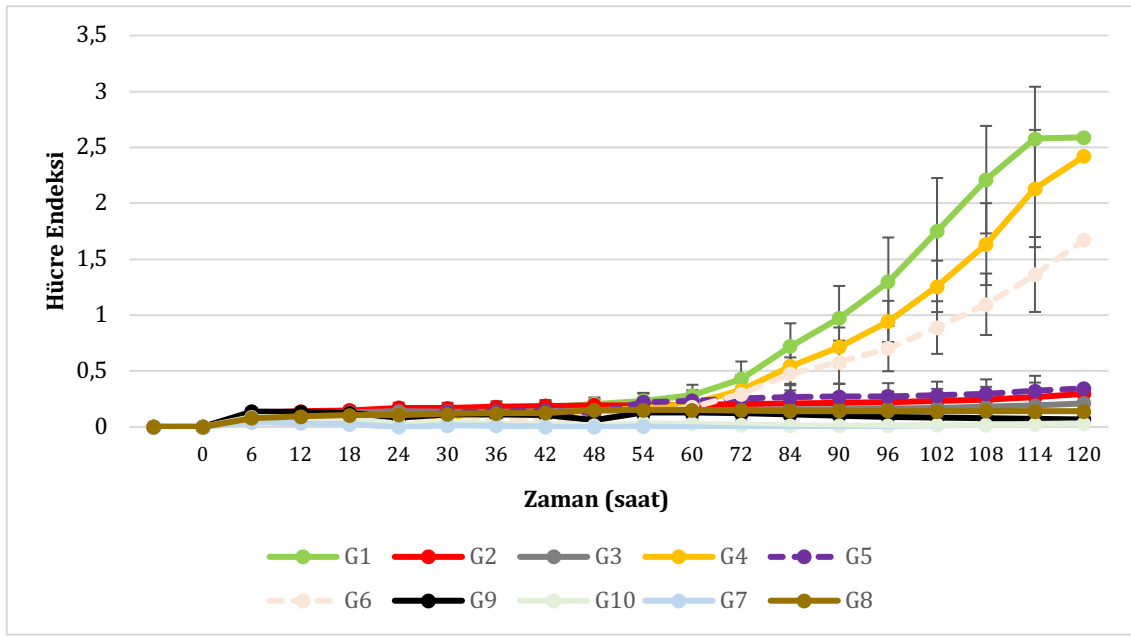
4.4. Basamak 2.2 Bulguları

4.4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları

Bu basamakta, diğer gruplara radyasyon verilme işlemi süresi boyunca, steril bir şekilde inkübatör dışında tutulan sham grubu oluşturulmamıştır. Çünkü CKHKT sonuçlarında, kontrol ile arasında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür. Bu basamakta radyasyona karşı tedavi

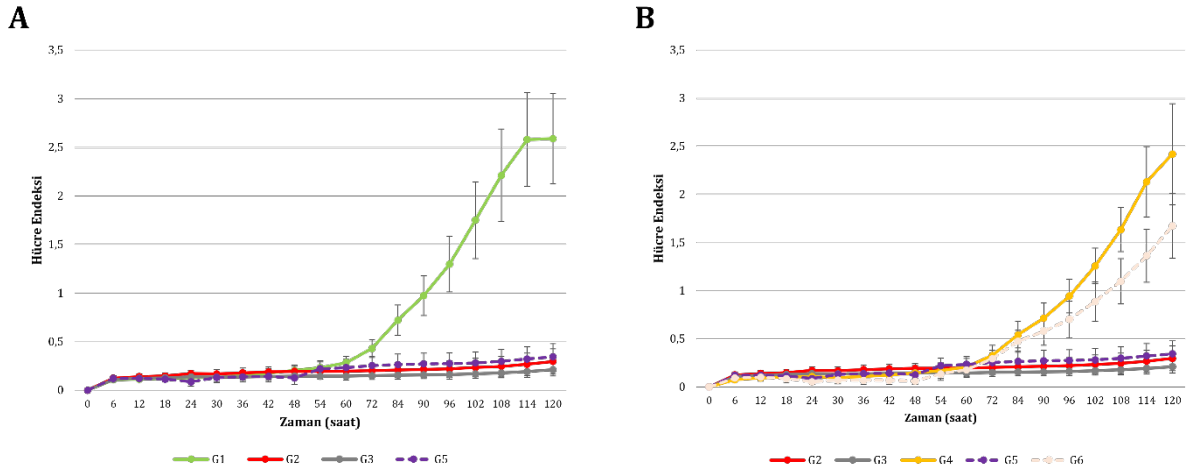
oluşturmayı amaçlayan (KM içeren) grupların radyasyon verilmeyen, sadece KM içeren sham grupları oluşturulmuştur.

120 saat boyunca gerçekleştirilen, gerçek zamanlı hücre analiz verilerine göre, KM verilen grupların sham gruplarından olan G4 ve G6'nın, zamana bağlı hücre endeksinin kontrol grubuna (G1) benzer bir davranış sergilediği gözlenmiştir. Fakat, G8 ve G10 gruplarının hücre endeksi ile belirlenen bölünme hızları kontrol grubunun (G1) ciddi düzeyde gerisinde kalmaktadır (Şekil 4.47).



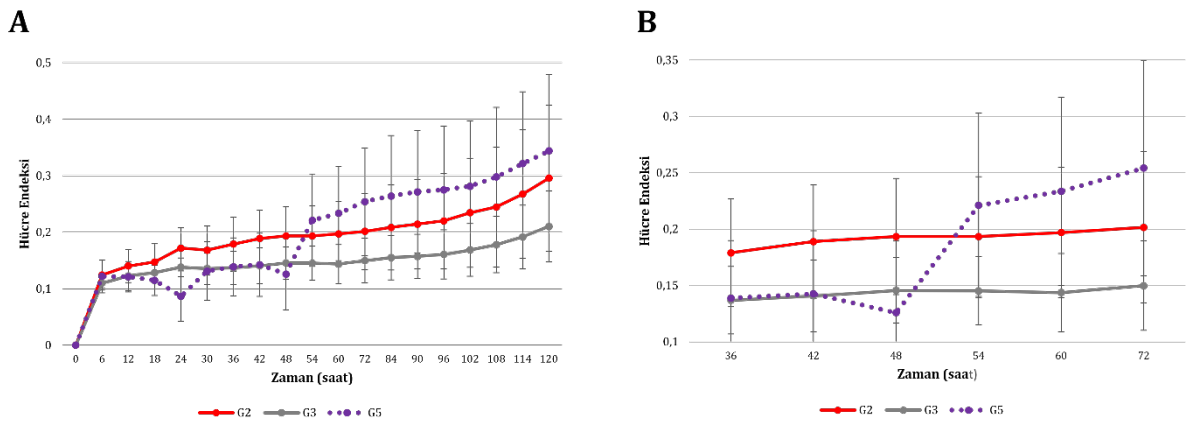
Şekil 4.47. Tüm grupların (G1-G10) zamana bağlı (120 saat) gerçekleştirilen hücre indeks eğrisi (n=4).

Kontrol grubuna (G1) göre gruplar karşılaştırıldığında, radyasyon (G2), radyasyondan önce 24 saat KM ile muamele edilip radyasyondan hemen sonra 24 saat KM uygulanan grup (G3) ve radyasyondan önce 24 saat KM uygulanıp radyasyondan 24 saat sonra KM uygulanan grubun (G5) zamana bağlı hücre indeks eğrilerinin anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.48A). Diğer taraftan, radyasyon grubuna (G2) göre gruplar karşılaştırıldığında ise radyasyondan önce 24 saat KM ile muamele edilip radyasyondan hemen sonra 24 saat KM uygulanan grubun sham grubu (G4), radyasyondan önce 24 saat KM uygulanıp radyasyondan 24 saat sonra KM uygulanan grup (G5) ve radyasyondan önce 24 saat KM uygulanıp radyasyondan 24 saat sonra KM uygulanan grubun sham grubunun (G6) anlamlı düzeyde artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.48B).

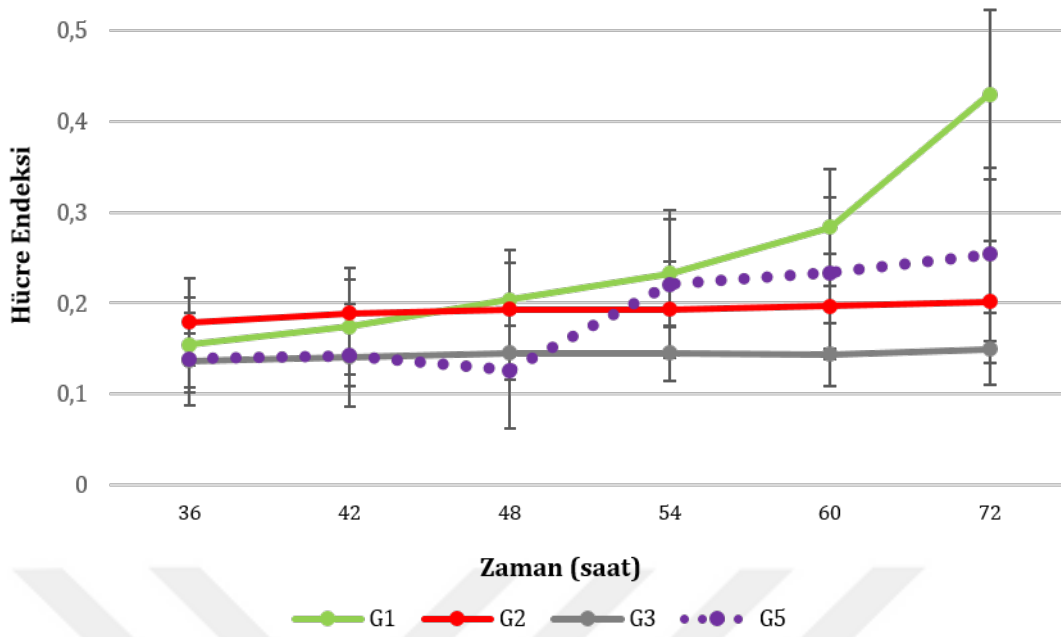


Şekil 4.48. Zamana bağlı (120 saat) gerçekleştirilen hücre indeks eğrisi. (A) G1, G2, G3 ve G5 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi (B) G2, G3, G4, G5 ve G6 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi (n=4).

120 saatlik hücre indeksi verilerine göre G2, G3 ve G5'in bölünme hızları incelendiğinde (Şekil 4.49A), 36. ve 72. saatler arasında, G2'nin 36 saat boyunca sabit bir hücre sayısında kaldığı, G3 ve G5 gruplarının 42. saate kadar sabit ve birbirlerine denk bir hızla ilerlediği, fakat 42. saatten sonra G5 grubu hücre bölünme davranışının 72. saate kadar diğer iki gruptan dikkat çekici biçimde ve istatistiksel olarak da anlamlı bir artış sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.49B). 48 ve 72. saatler arasında G5 grubu hücrelerinin bölünme davranışlarının oluşturduğu büyüme çizgisinin kontrol grubuna benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.50).



Şekil 4. 49. G2, G3 ve G5 gruplarının zamana bağlı hücre indeks eğrisi. (A) G2, G3 ve G5 gruplarının 0- 120 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi (B) G2, G3 ve G5 gruplarının 36-72 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi (n=4).



Şekil 4. 50. G1, G2, G3 ve G5 gruplarının 36-72 saatleri arasındaki hücre indeks eğrisi. (n=4).

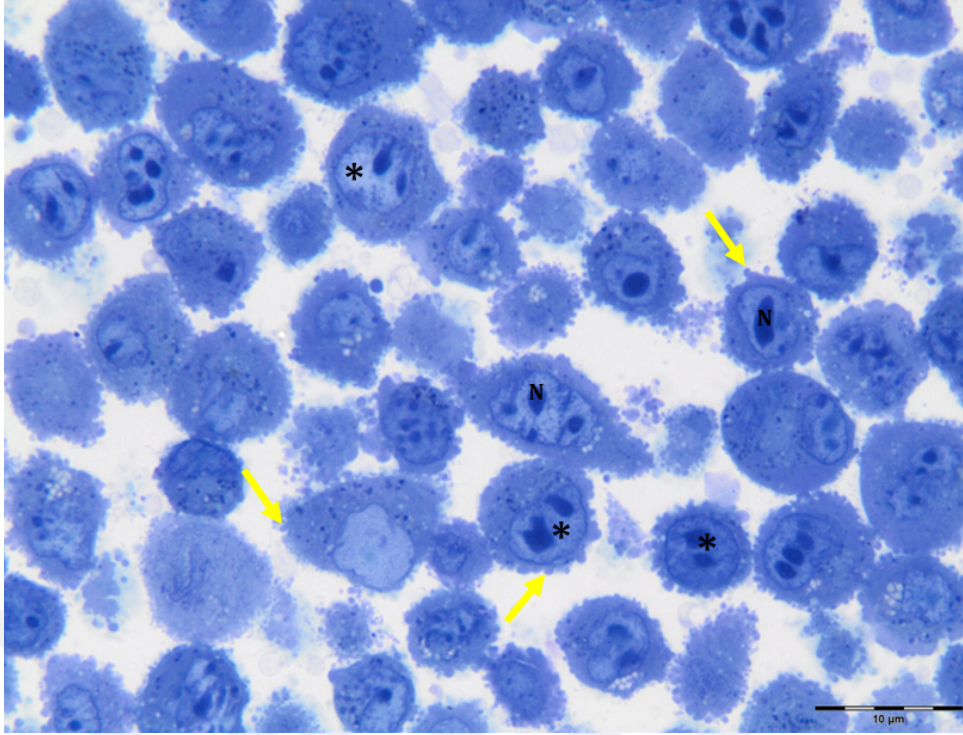
4.5. Basamak 2.3 Bulguları

Bu basamakta, bir önceki basamaklardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Basamak 2.1 ve Basamak 2.2) nihai deneyleri gerçekleştirebilmek amacıyla HT22 hücrelerine uygulanan 8 Gy radyasyonu tedavi etmek için en başarılı grup olarak; radyasyondan önce 24 saat KM ile muamele edilip radyasyondan 24 saat sonra KM uygulanan grup olan G5 (hücre canlılık indeksi verilerine göre; CKHKT sonuçlarına göre G6-B) belirlenmiştir. Tedavi grubunun potansiyel onarıcı etkileri iki farklı zaman noktasında (48 ve 72. saat) değerlendirilmiştir.

4.5.1. Morfolojik Bulgular

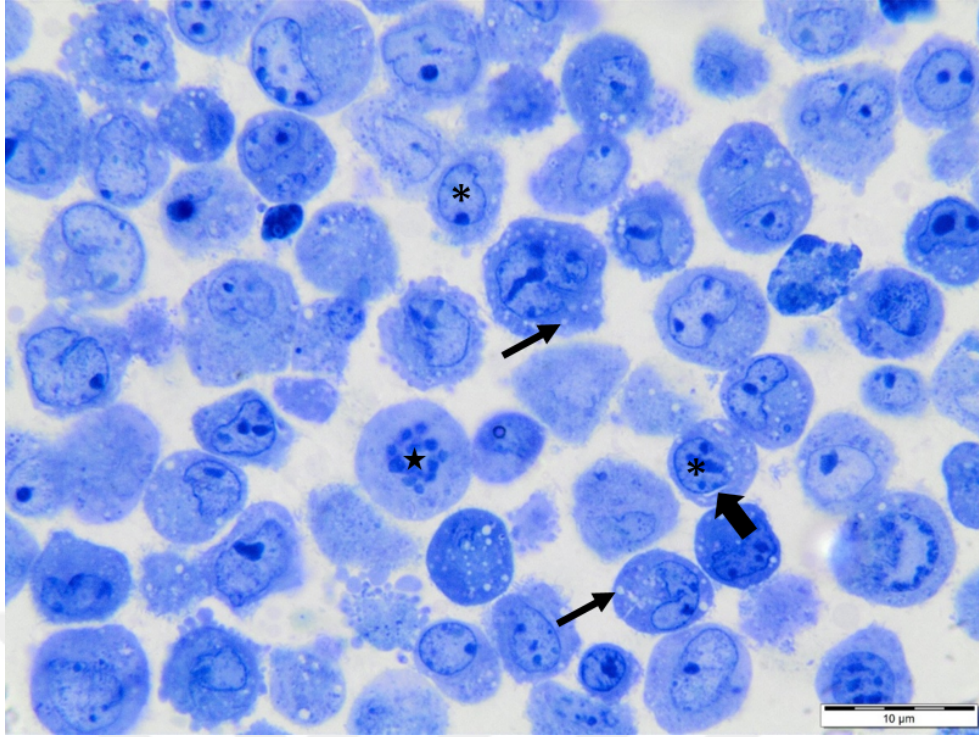
4.5.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular

HT22 hücrelerinin 2 µm kalınlığındaki kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmış ışık mikroskopik görüntülerinde, kontrol grubunda ökromatik nükleusa, belirgin ve çok sayıda nükleolusa ve lamellipodialara sahip olan hücrelere rastlanmıştır. (Şekil 4.51).

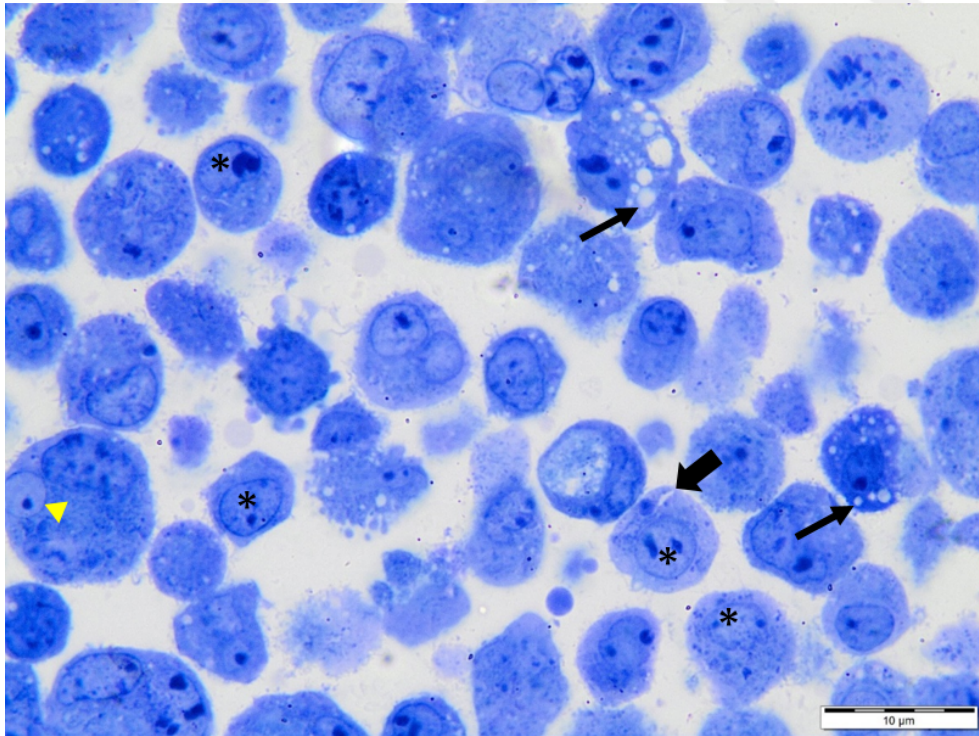


Şekil 4.51. HT22 hücre hattının kontrol grubunun ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyütmesi: Normal yapıda nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar), nükleolus (N). Objektif büyüklüğü:100X; ölçek:10 µm.

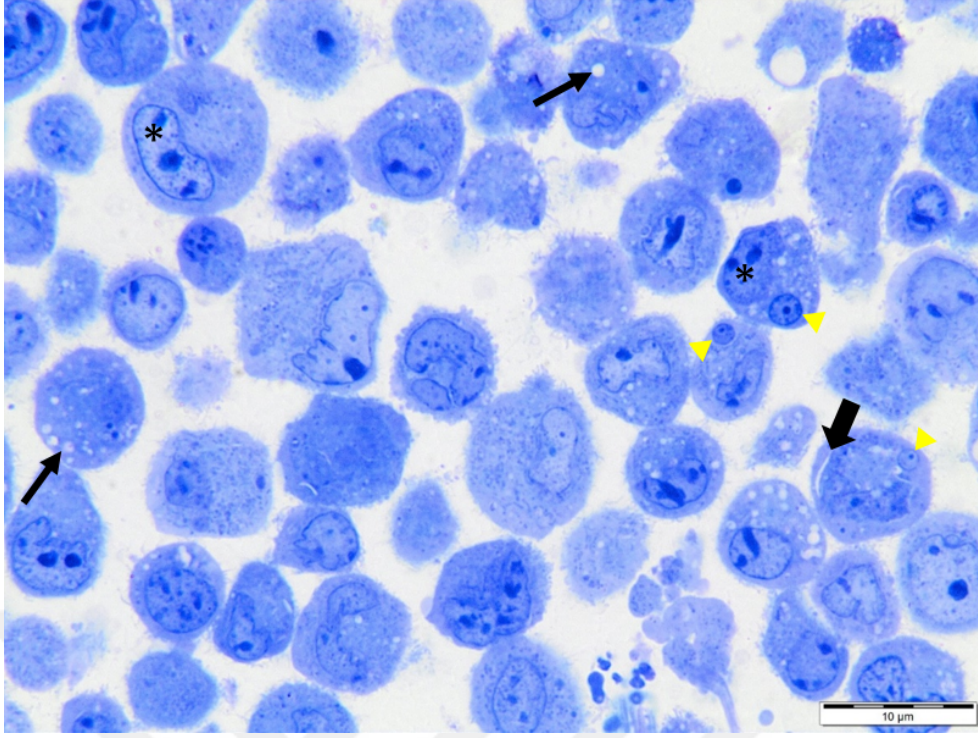
8 Gy radyasyon uygulanan gruplarda radyasyondan sonra 48. saatteki morfolojik görüntülerde, hücrelerin lamellipodia yapılarını kaybettiği ve veziküle sahip hücre sayılarında artış olduğu, hücrelerde izolasyon membranlarının ve mikronükleusların varlığı görülmüş, ayrıca dev polimorfonükleer hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4. 52-55).



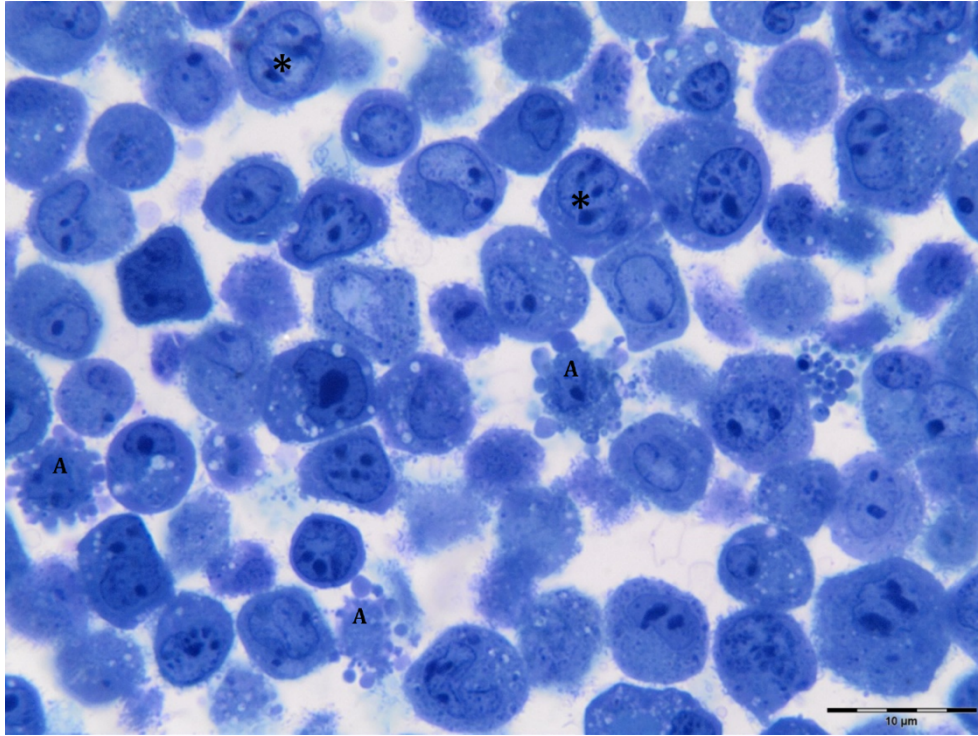
Şekil 4. 52. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), dev polimorfonükleer hücre (siyah yıldız). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm.



Şekil 4. 53. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), mikronükleus (sarı ok başı). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X, ölçek:10 µm.

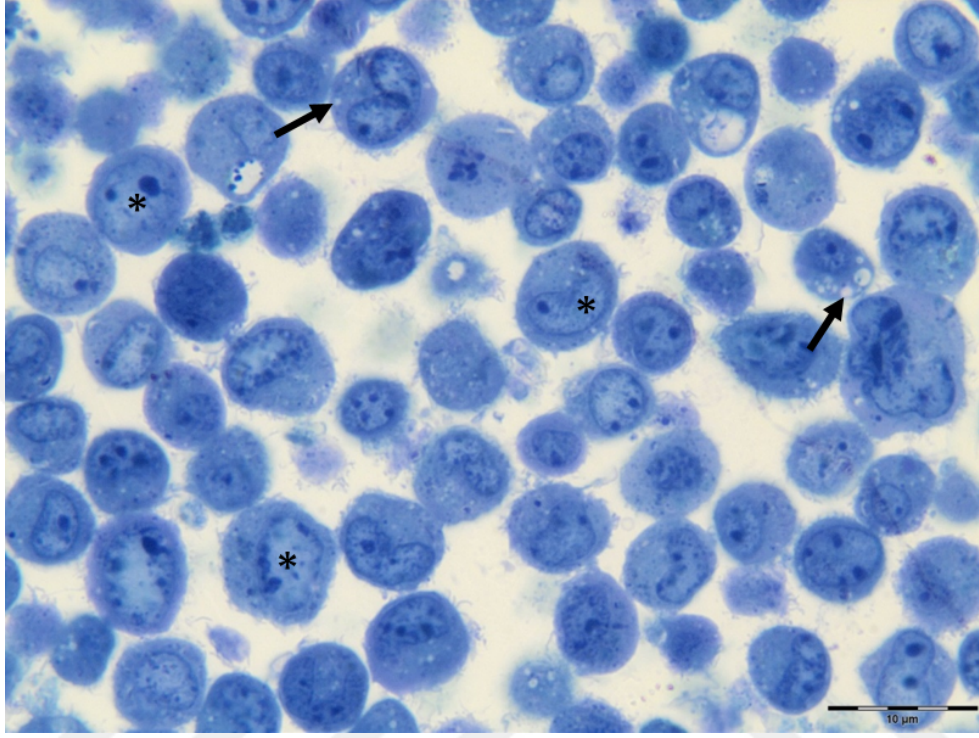


Şekil 4. 54. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), mikronükleus (sarı ok başı). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm.



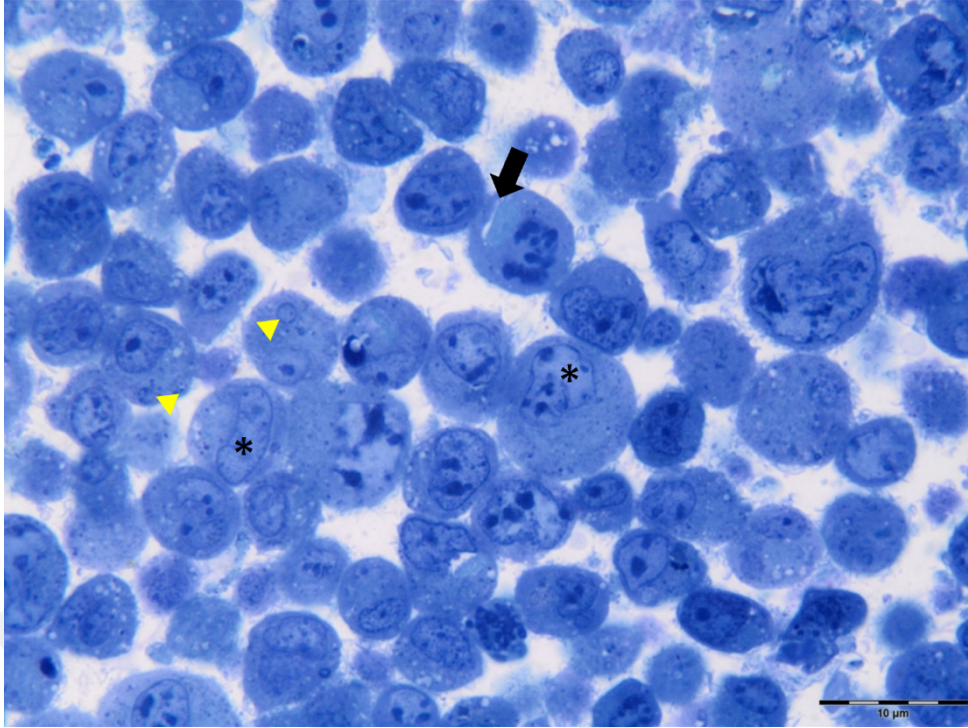
Şekil 4. 55. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonra 48. saatindeki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), apoptotoik hücreler (A). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü:100X, ölçek:10 µm.

İyonize edici radyasyon uygulanmayıp sadece KM ile muamele edilen sham grubundaki hücrelerin genel morfolojisinin normal yapıda olduğu ve kontrol grubundaki kadar yer yer vezikülleri bulunan hücelere sahip olduğu görülmüştür. Ancak, bu gruptaki hücrelerin lamellipodia yapılarını kaybettiği de tespit edilmiştir (Şekil 4. 56).

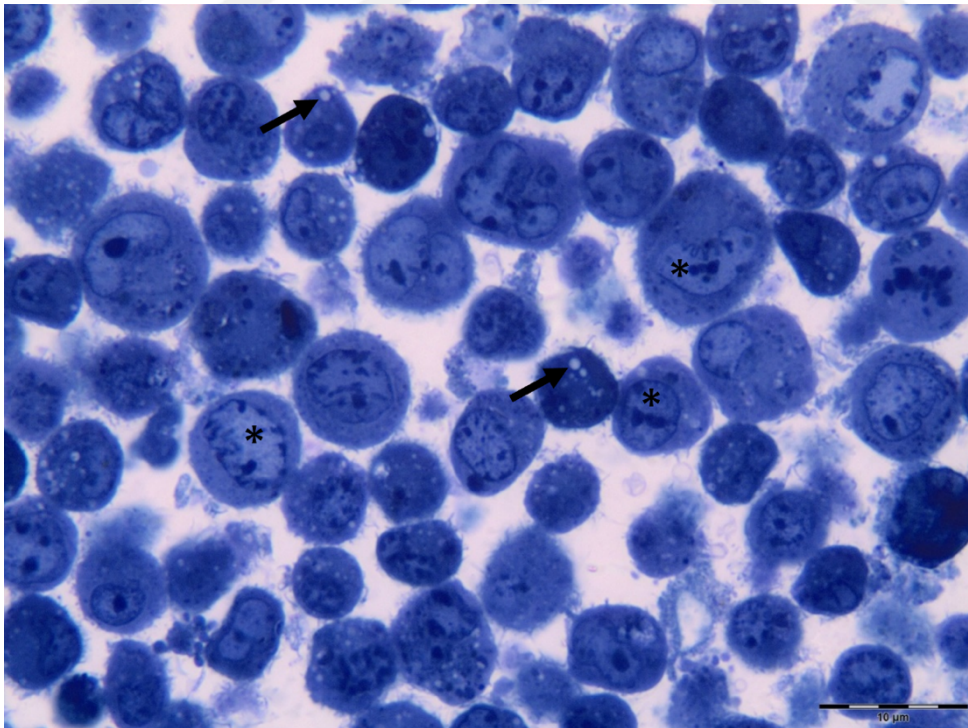


Şekil 4. 56. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulanmayıp sadece KM ile muamele edilen sham grubunun 48. saatteki ışık mikroskopik morfolojik görüntüsü. Nükleus (asteriskler), veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10 µm.

Bir önceki basamaklardan (Basamak 2.1 ve Basamak 2.2) elde edilen verilerin neticesinde, tedavi grubu olarak belirlediğimiz grupta 48. saatteki morfolojik görüntüler incelendiğinde, hücrelerdeki veziküllerin büyüklüğünde ve mikronükleusa sahip hücre sayısında azalma görülmüştür. Ancak, bu grupta, radyasyon ve sham grubundaki hücelere benzer şekilde, hücrelerin çoğunluğunda lamellipodia yapılarının olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.57, Şekil 4.58).



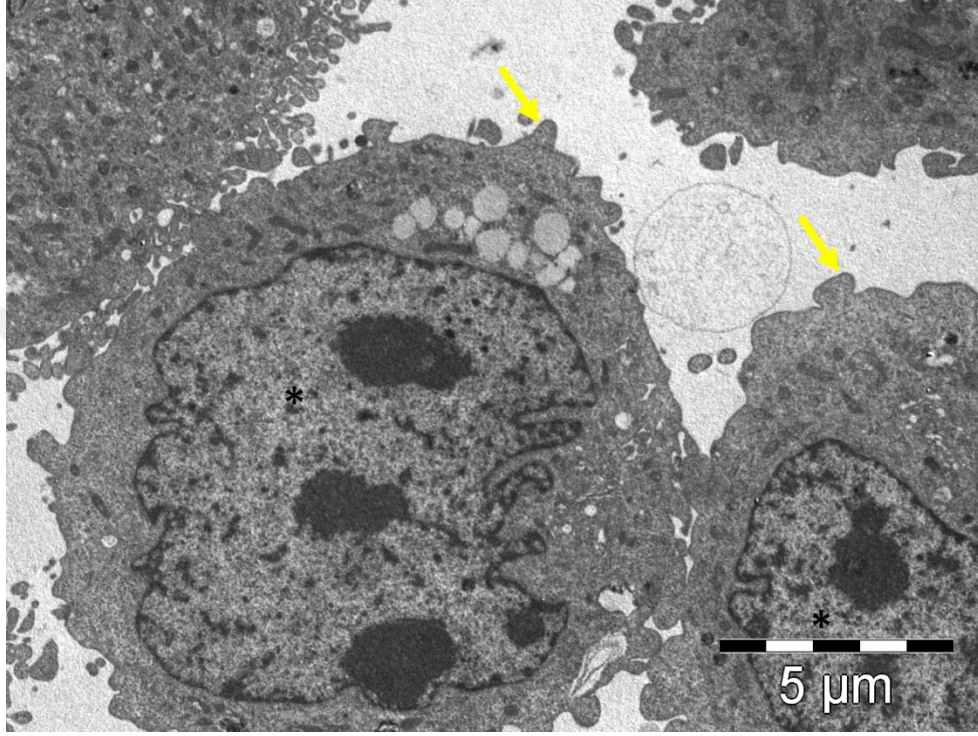
Şekil 4. 57. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojik değişikliklerin ışık mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı azalma gösteren izolasyon membranı (siyah kalın ok) ve sayısı azalma gösteren mikronükleuslar (sarı ok başları). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10µm.



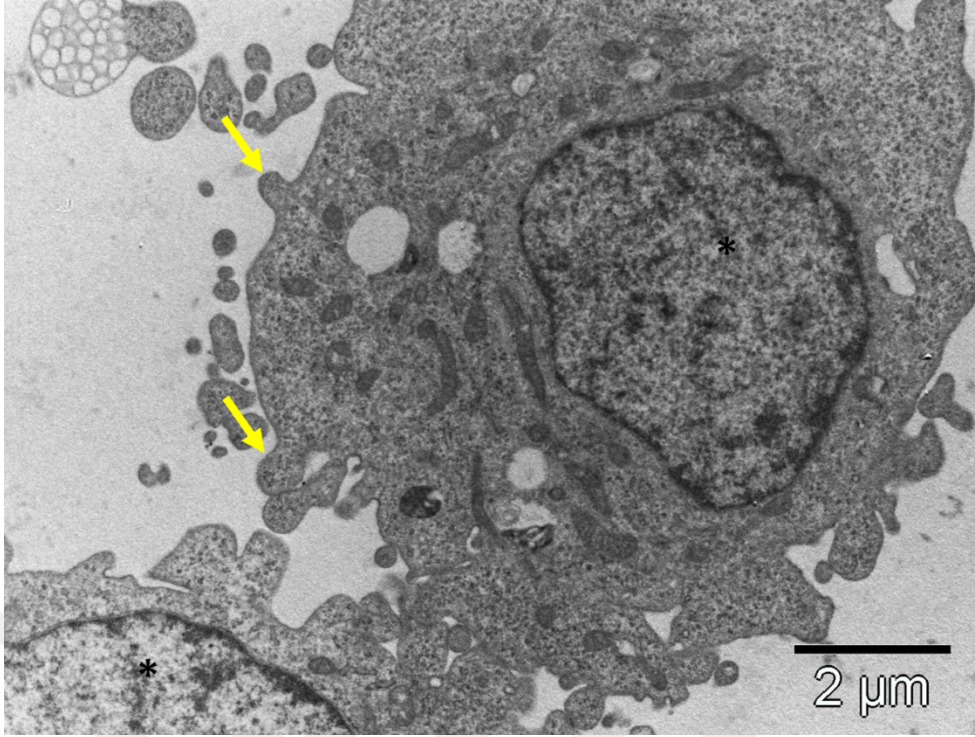
Şekil 4. 58. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojik değişikliklerin ışık mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı azalma gösteren veziküller (siyah oklar). %0,1'lik toluidin mavisi; objektif büyüklüğü: 100X; ölçek:10 µm.

4.5.1.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

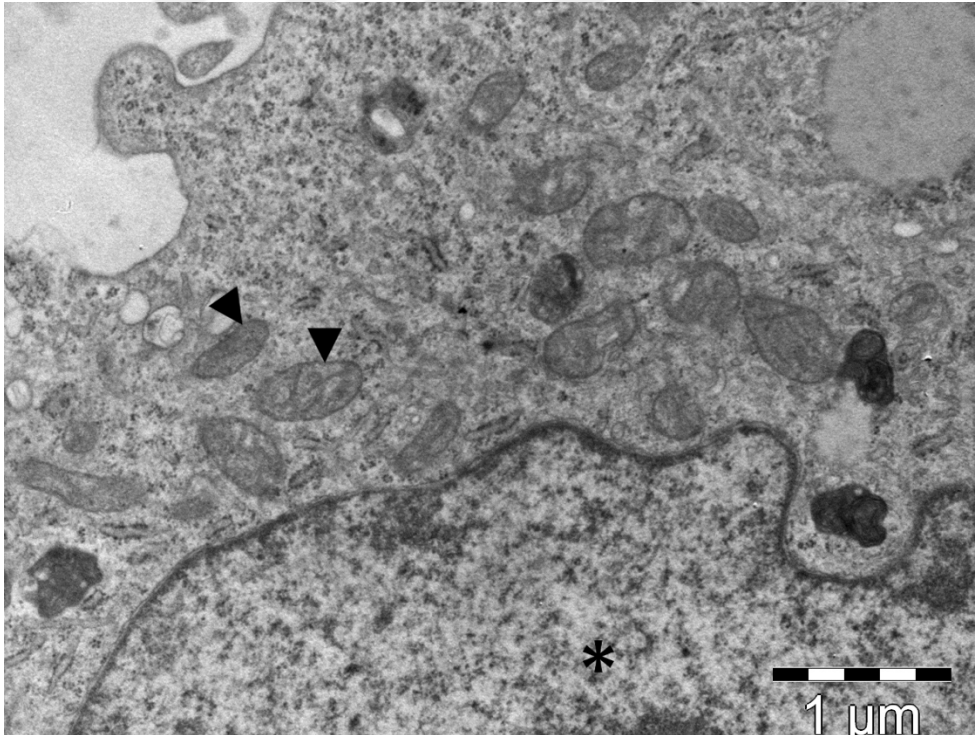
HT22 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubunun normal ultrastrüktürel yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 4.59-61).



Şekil 4. 59. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.

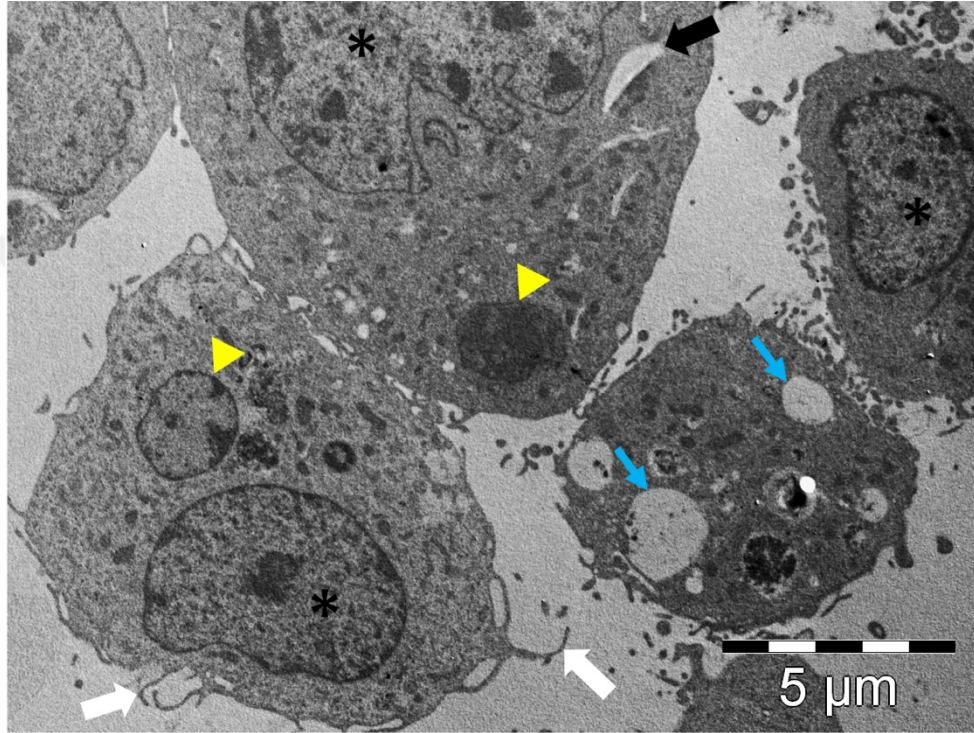


Şekil 4. 60. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asteriskler), lamellipodia (sarı oklar). Büyütme: 10000X, ölçek: 2 μm.

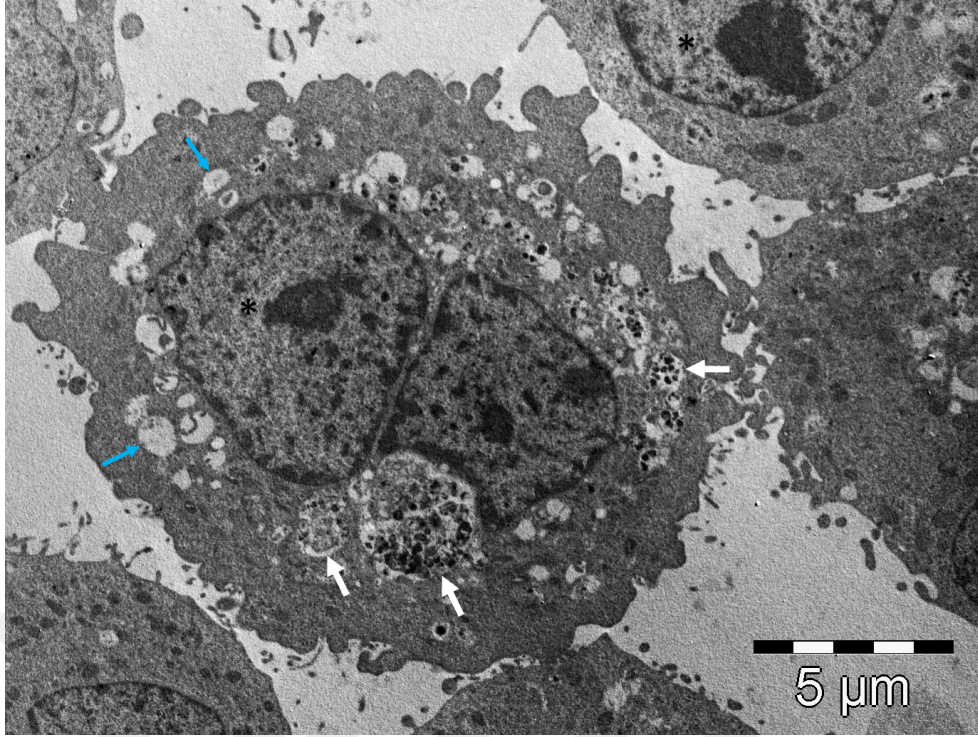


Şekil 4. 61. HT22 hücre hattının kontrol grubunun elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asterisk), mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 20000X, ölçek: 1 μm.

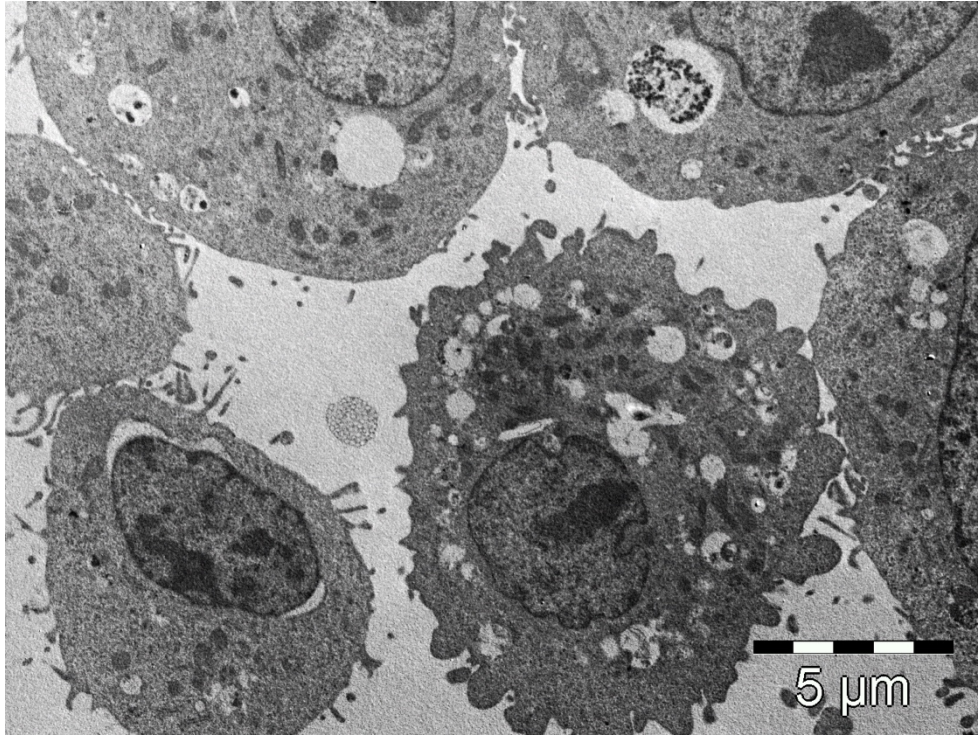
Hücrelerin 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulanması işleminden 48 saat sonraki elektron mikroskopik görüntülerinde, birçok hücrede filopodiyaların varlığını koruduğu görülmüştür. Bununla birlikte, lamellipodiyaların sayısında belirgin bir azalmaya, farklı büyüklüklerdeki çok sayıda otofagozomlara, mitokondriyal matrikste şişme ve dejenerasyona, genişlemiş GER sisternalarına, çok sayıda izolasyon membranlarına ve mikronükleusa rastlanmaktadır (Şekil 4.62-65).



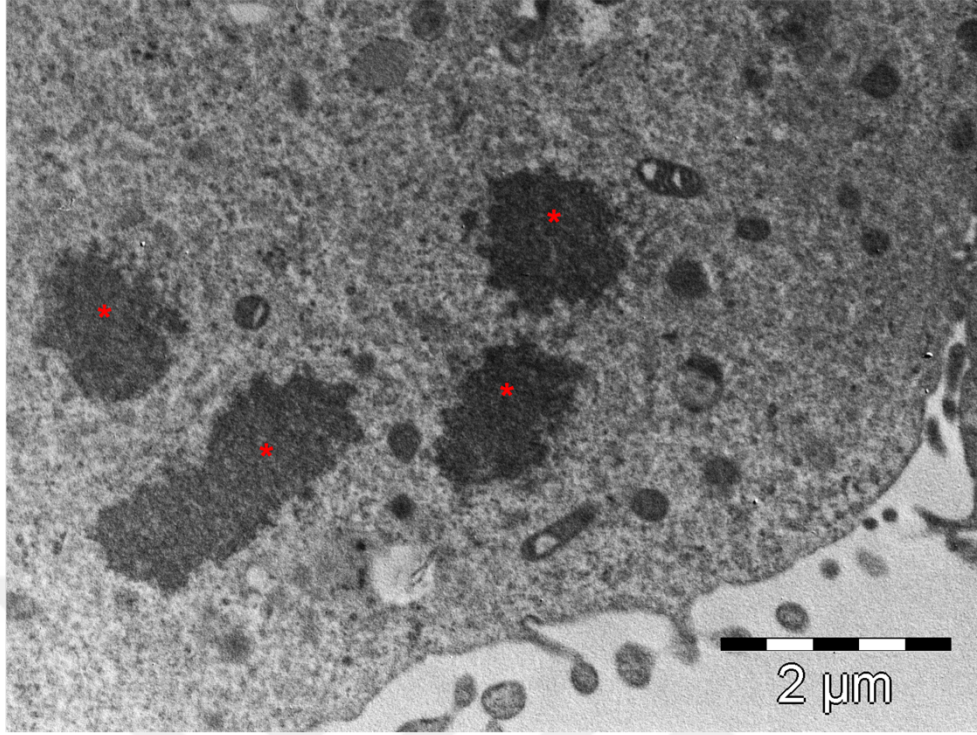
Şekil 4.62. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleuslar (asteriskler), sayısı artmış mikronükleuslar (sarı ok başları), filopodiyalar (kalın beyaz oklar), izolasyon membranı (siyah kalın ok), sayısı artmış veziküller (mavi oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



Şekil 4.63. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Nükleus (asteriskler), sayısı artmış veziküller (mavi oklar) ve sayısı artmış otofagozomlar (beyaz oklar). Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.

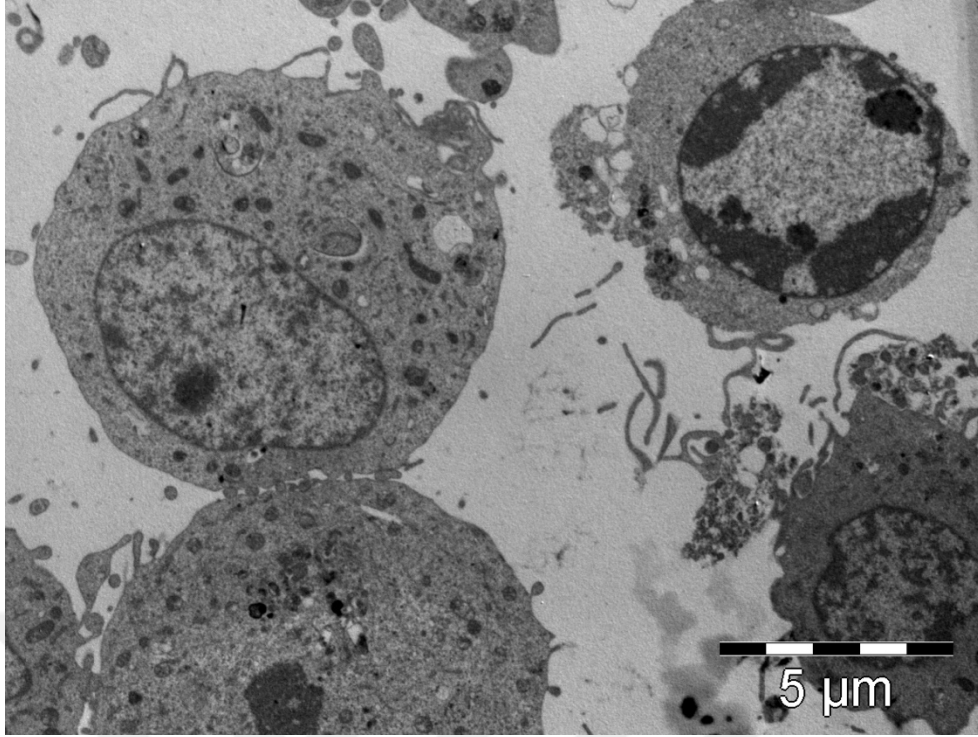


Şekil 4.64. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.

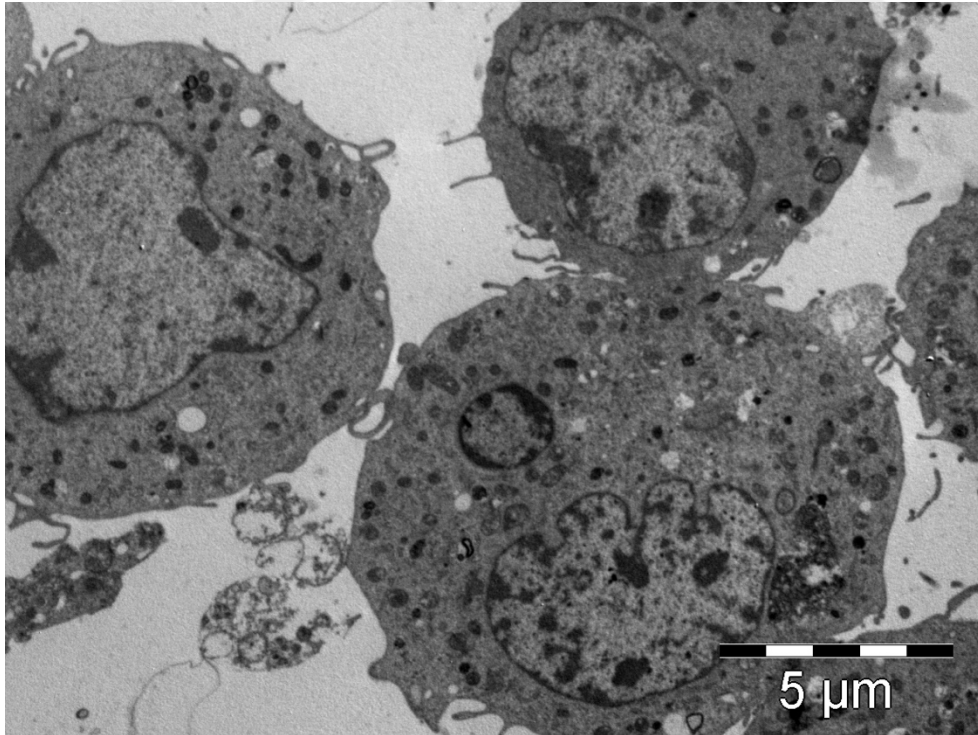


Şekil 4.65. HT22 hücre hattının 8 Gy iyonize edici radyasyona maruz kalan grubunun, radyasyondan sonraki 48. saatindeki bozulmuş kromozom morfolojisinin (kırmızı asteriskler) elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 μ m.

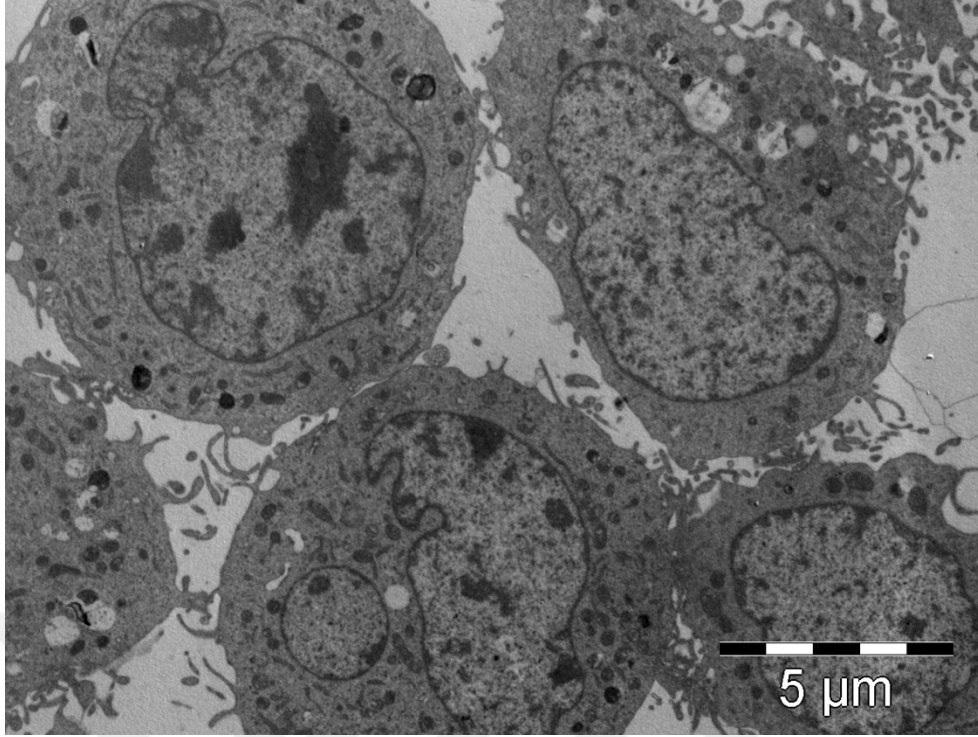
8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin KM ile tedavi edilen grubunun 48. saatindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak incelenmesi sonucunda elde edilen görüntülerde, hücrelerin lamellipodia yapılarını kontrol grubundaki kadar iyi koruyamadığı, ancak mitokondriyal matriksteki şişme ve dejenerasyonda, genişlemiş GER sisternalarının, izolasyon membranlarının ve mikronükleusların sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.66-73).



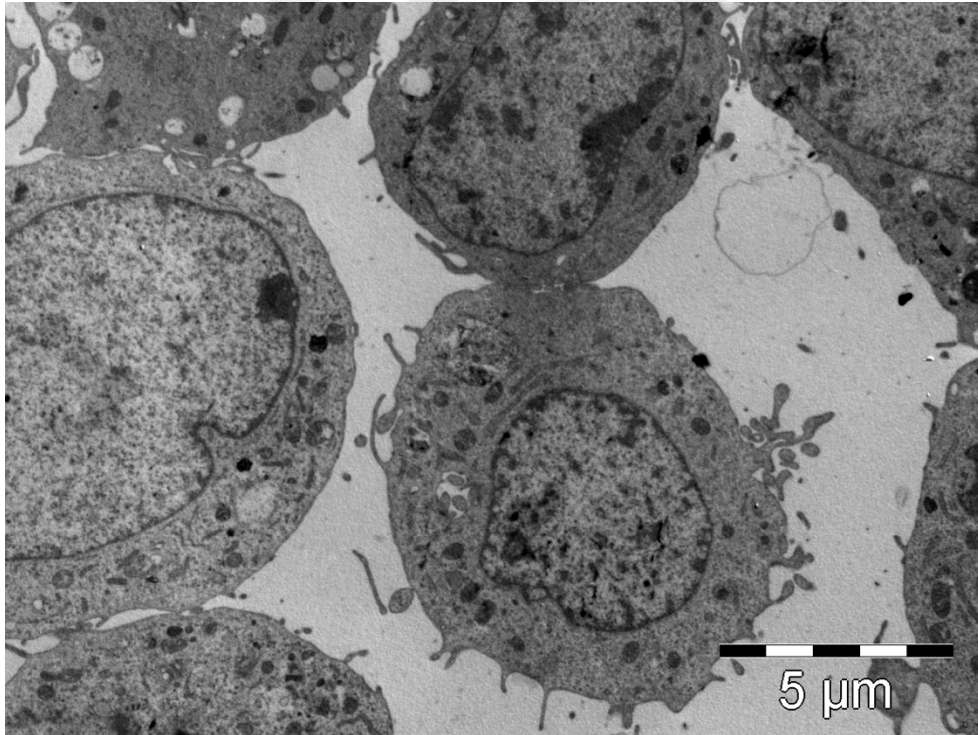
Şekil 4.66. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



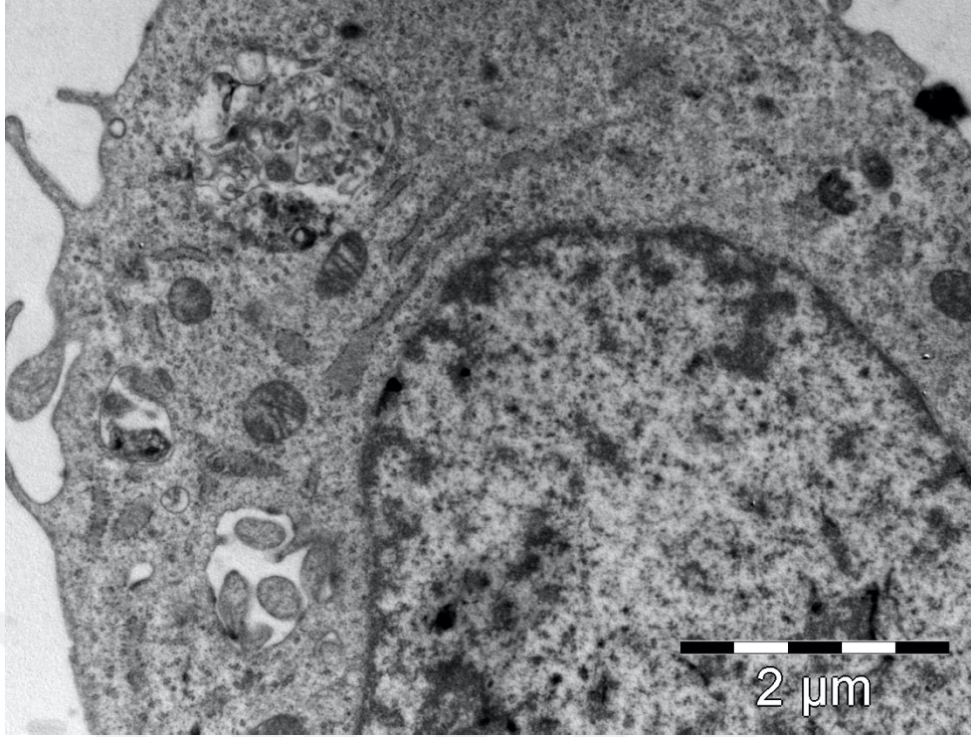
Şekil 4.67. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



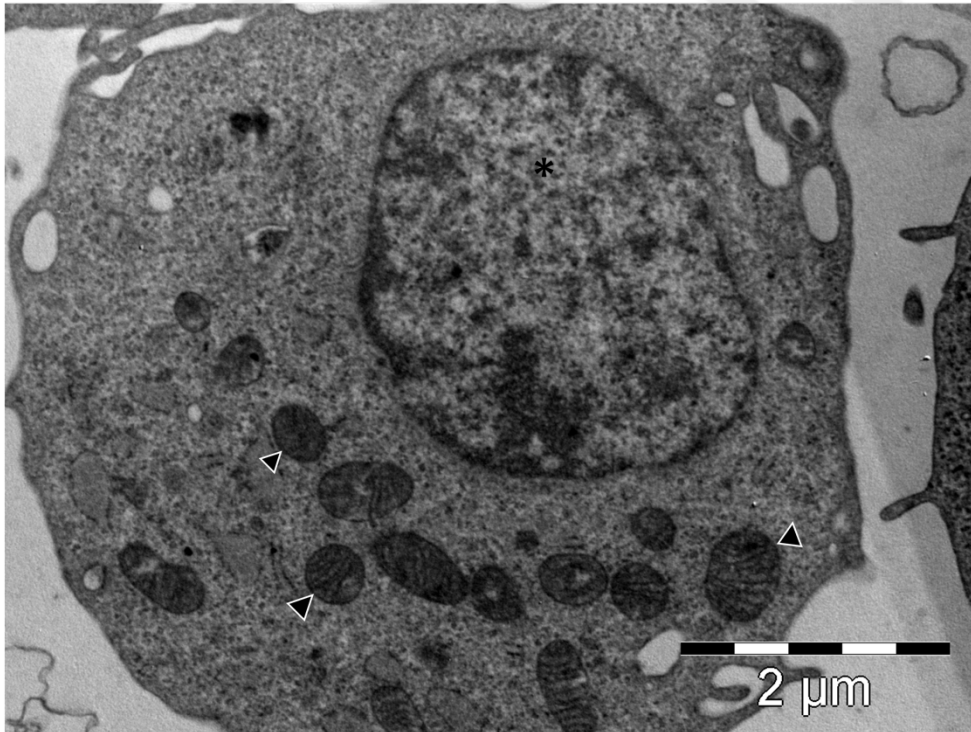
Şekil 4.68. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



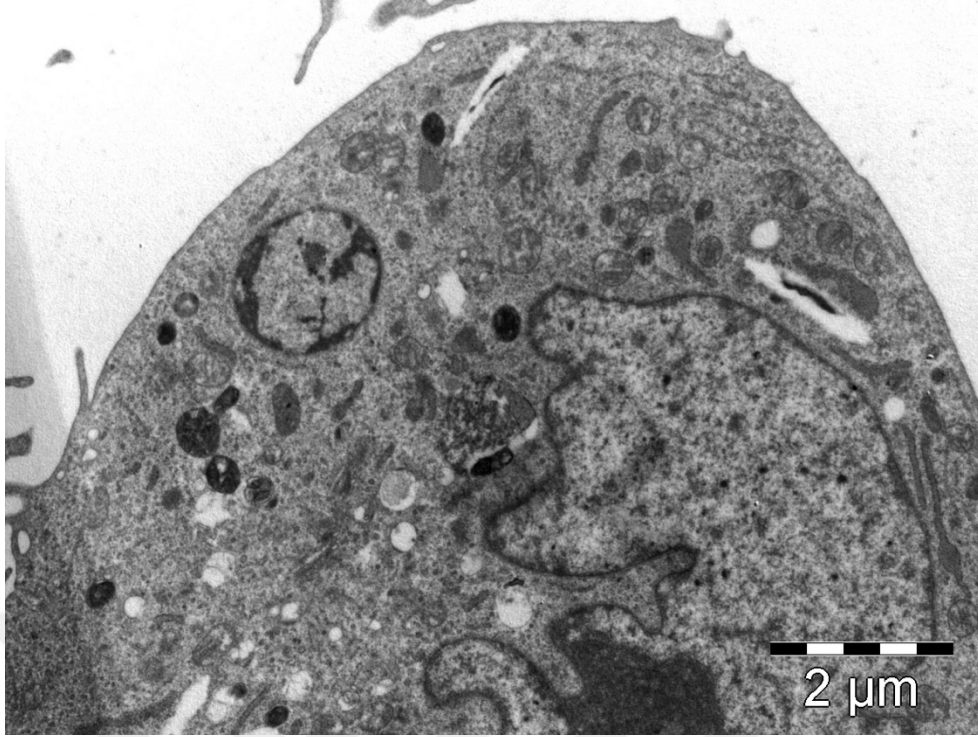
Şekil 4.69. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



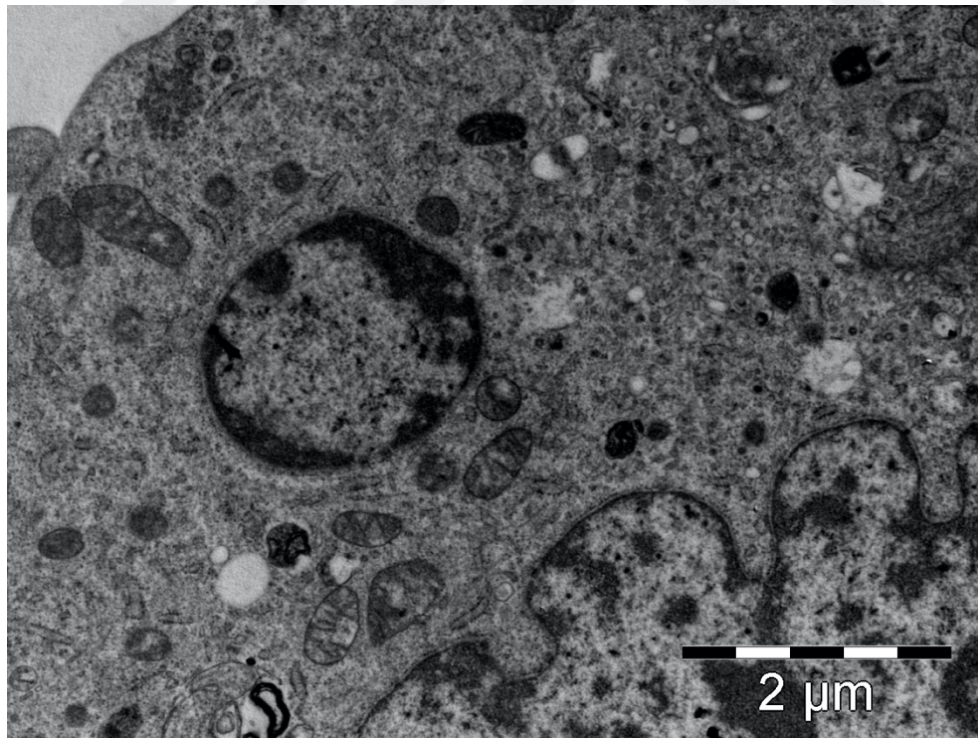
Şekil 4.70. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 μm.



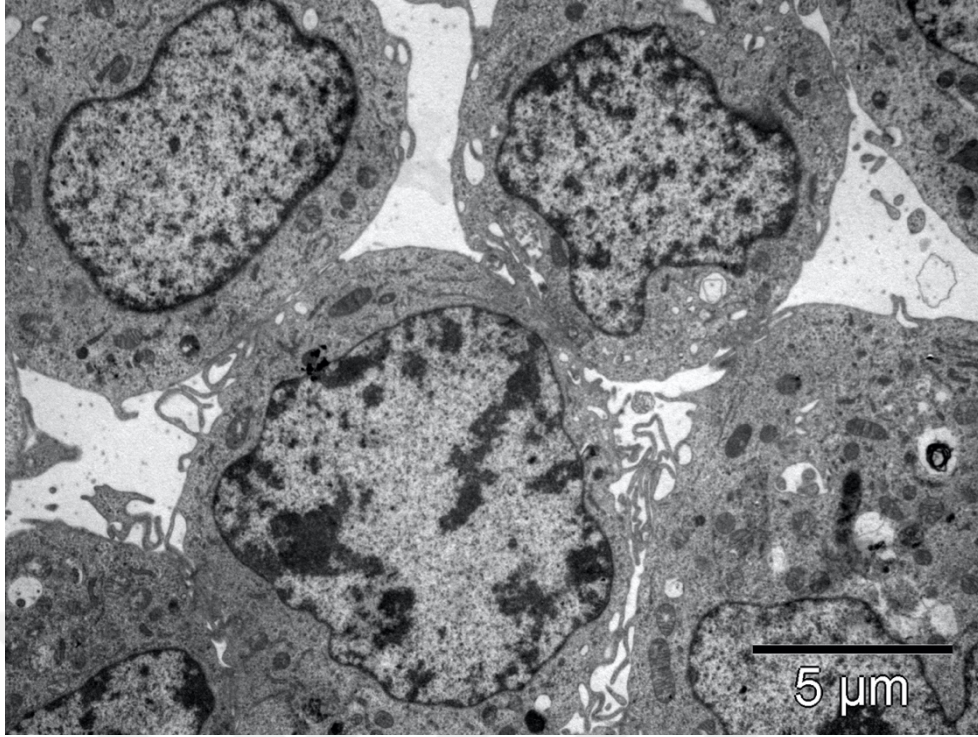
Şekil 4.71. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Normal yapıdaki nükleus (asterisk), mitokondriyonlar (siyah ok başları). Büyütme: 15000X, ölçek: 2 μm.



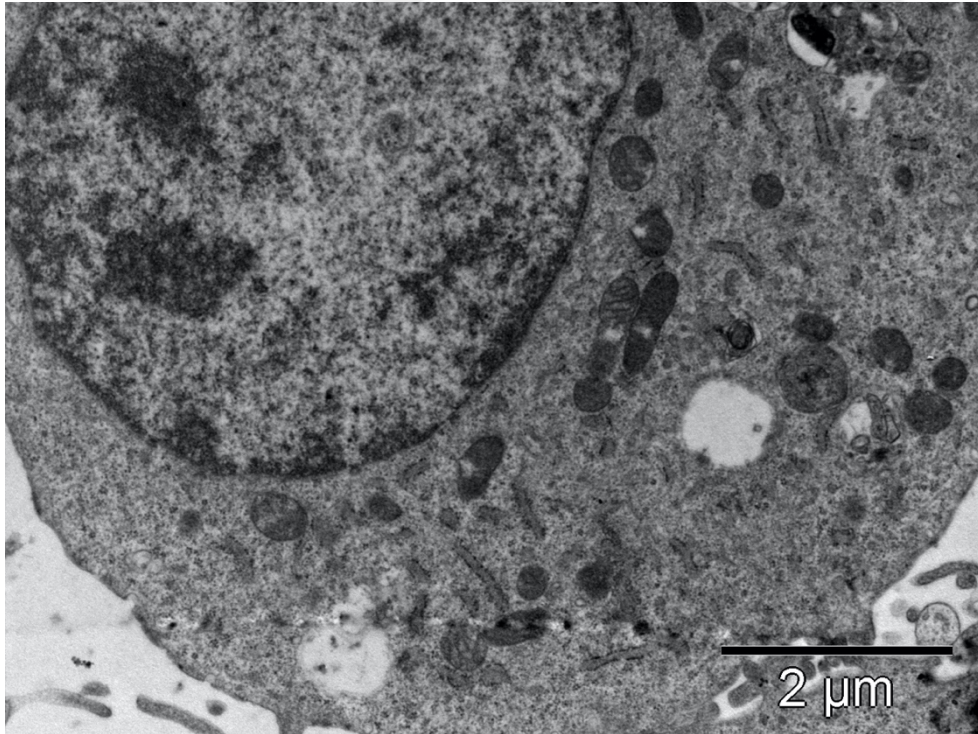
Şekil 4.72. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 10000X, ölçek: 2 µm.



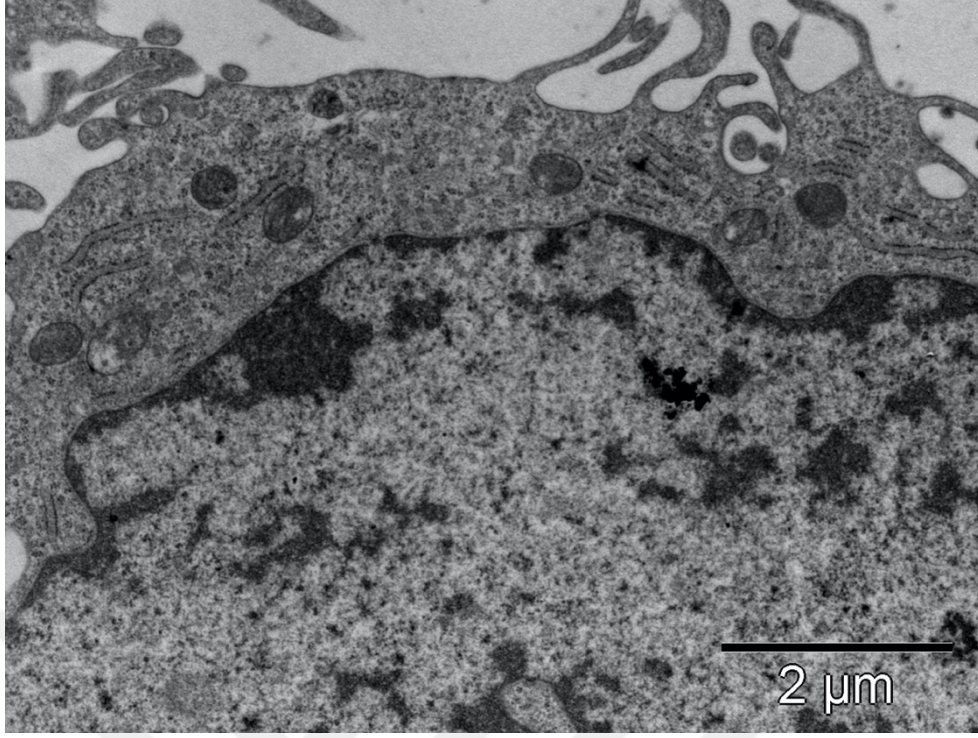
Şekil 4.73. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin tedavi grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm.



Şekil 4.74. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 5000X, ölçek: 5 µm.



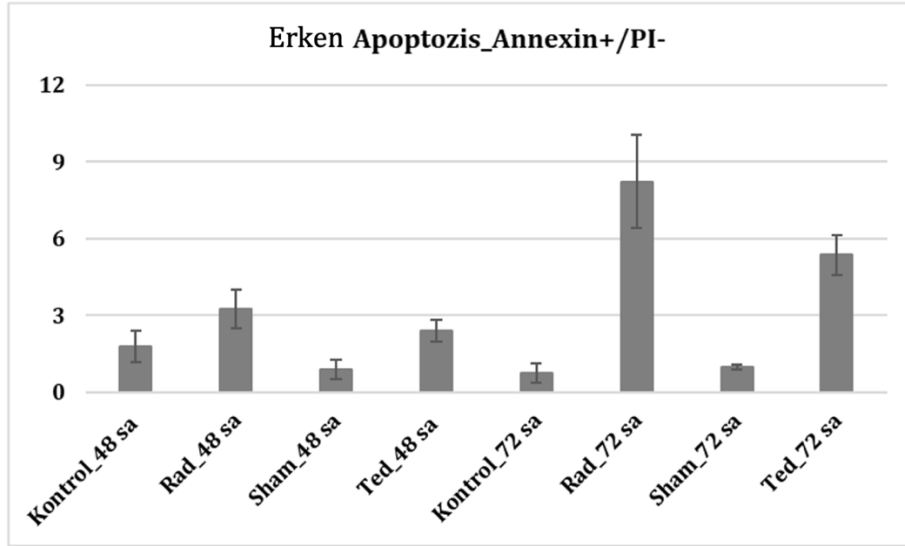
Şekil 4.75. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 µm.



Şekil 4.76. 8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin sham grubunun 48. saattindeki morfolojisinin elektron mikroskopik olarak gösterilmesi. Büyütme: 15000X, ölçek: 2 μm.

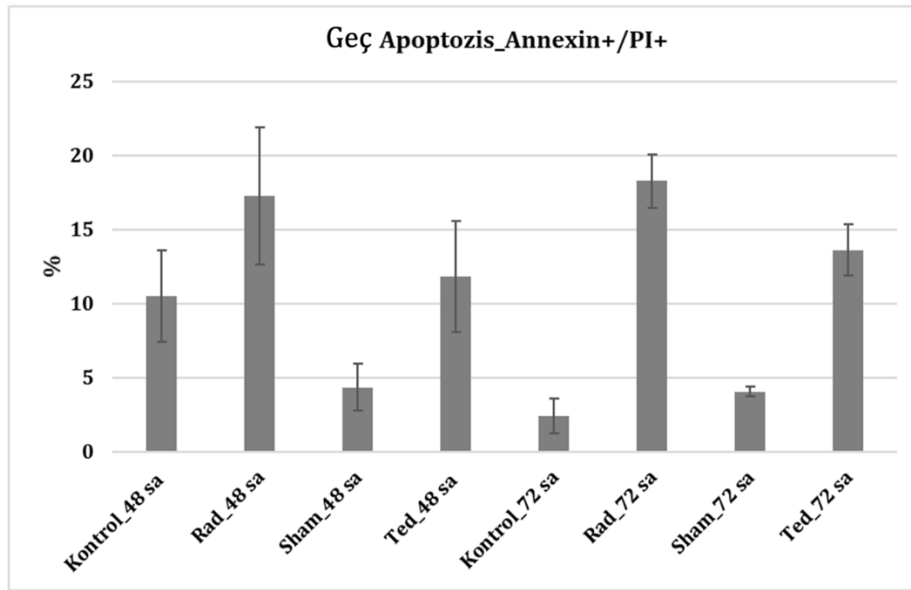
4.5.2 Akım Sitometrik Bulgular

HT22 hücrelerine 8 Gy iyonize edici radyasyon uygulama işleminden sonra, radyasyonun etkilerini ve tedavi grubu olarak belirlemiş olduğumuz grubun başarısını incelemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz testlerden biri olan akım sitometrik yöntem ile zamana bağlı hayatta kalan hücrelerin tüm popülasyona oranla ne kadarının erken apoptoza, ne kadarının sekonder apoptoza ve ne kadarının da nekroza gittiğini belirledik. Buna göre, erken apoptoz verileri incelendiğinde, 48. saatteki kontrole göre 48. saatteki radyasyon ve tedavi gruplarındaki artış ve sham grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Dahası, 48. saatteki radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.77, Şekil 4.80). Ancak, 48. ve 72. saatteki kontrollere göre 72. saatteki radyasyon grubunda erken apoptozdaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0,001$) (Şekil 4.77, Şekil 4.80). 72. saatteki kontrole göre sham grubundaki artış anlamlı değil iken, radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,001$) (Şekil 4.77, Şekil 4.80).



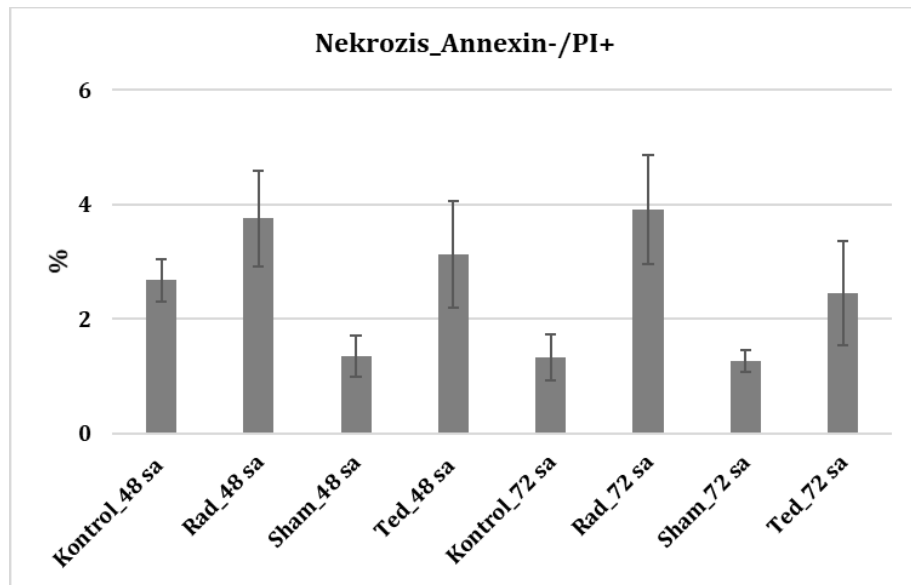
Şekil 4.77. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki erken apoptoz yüzdesi. (n=6).

Zamana bağlı değişen gruplar arası geç apoptoz verileri incelendiğinde, 48. saatteki kontrole göre radyasyondaki artış ve sham grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $P=0,002$, $P=0,014$) (Şekil 4. 78, Şekil 4.80). Dahası, 48. saatteki radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma da istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($P=0,034$) (Şekil 4. 78, Şekil 4.80). 72. saatteki kontrole göre radyasyon grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,001$) (Şekil 4.78, Şekil 4.80). Ayrıca, 72. saatteki kontrole göre sham grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değil iken, radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma anlamlı bulunmuştur ($P=0,035$) (Şekil 4.78, Şekil 4.80).

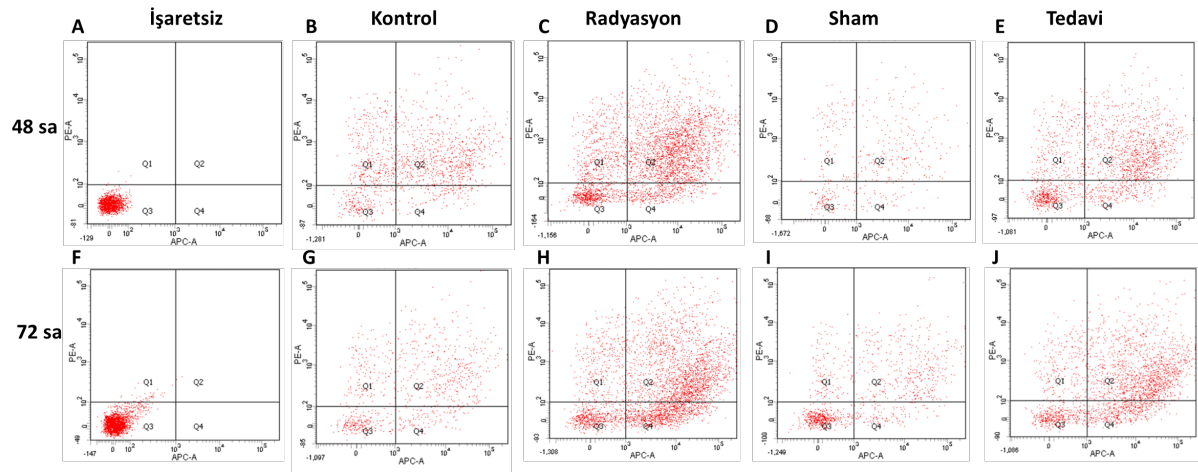


Şekil 4.78. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki geç apoptoz yüzdesi. (n=6).

Gruplar arasındaki zamana göre değişen nekroz verileri incelendiğinde ise, 48. saatteki kontrole göre radyasyondaki artış ve sham grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 48. saatteki radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki azalma da istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.79, Şekil 4.80). 72. saatteki kontrole göre, radyasyondaki artış istatistiksel olarak anlamlıyken ($P < 0,001$) sham grubundaki azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.79, Şekil 4.80). 72. saatteki radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P = 0,009$) (Şekil 4.79, Şekil 4.80).



Şekil 4.79. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki nekrozis yüzdesi. (n=6).



Şekil 4.80. Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (48. saat ve 72. saat) ve tedavi (48. saat ve 72. saat) gruplarında popülasyondaki erken, geç apoptoz ve nekroz yüzdelilerinin dağılımının gösterilmesi. İşaretlenmemiş hücreler_48. saat (A), işaretlenmemiş hücreler_72. saat (F), kontrol_48. saat (B), kontrol_72. saat (G), 8 Gy radyasyon_48. saat (C), 8 Gy radyasyon_72. saat (H), sham_48. saat (D), sham_72. saat (I), tedavi_48. saat (E), tedavi_72. saat (J). (n=6).

4.5.3. tRNA İzolasyon ve Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

4.5.3.1. tRNA Miktar ve Safılık Bulguları

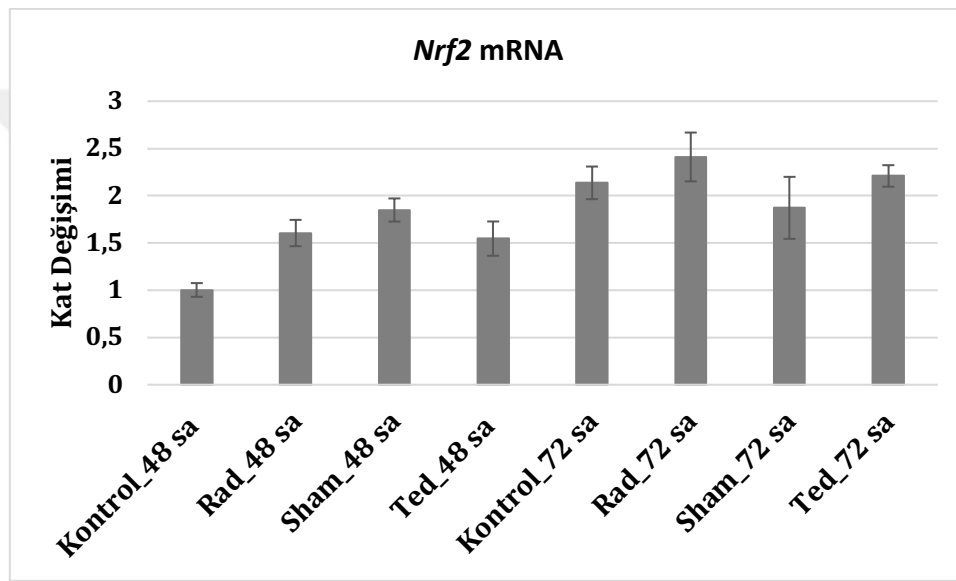
Kontrol (48. saat ve 72. saat), 8 Gy (Rad_48. saat ve 72. saat), sham (Sham_48. saat ve 72. Saat) ve tedavi (Ted_48. saat ve 72. saat) gruplarında, hedef genlerin ekspresyon analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla elde edilen tRNA'ların miktar ve saflık tayini yapılmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kontrol (48. ve 72. saat sonunda), 8 Gy (Radyasyon 48. ve 72. saat sonunda) Sham (48. ve 72. saat sonunda) ve Tedavi (48. ve 72. saat sonunda) elde edilen tRNA miktar ve saflık tayini (n=4)

Gruplar	48. saat (ortalama $\pm$ SS)			72. saat (ortalama $\pm$ SS)		
	tRNA (ng/ μ l)	A260/280	A260/230	tRNA (ng/ μ l)	A260/280	A260/230
Kontrol Grubu	79,23 $\pm$ 21,8	2,08 $\pm$ 0,003	2,265 $\pm$ 0,30	123,05 $\pm$ 85,23	2,07 $\pm$ 0,002	2,21 $\pm$ 0,15
Radyasyo Grubu	94,98 $\pm$ 32,89	2,07 $\pm$ 0,004	2,26 $\pm$ 0,44	42,78 $\pm$ 18,71	1,96 $\pm$ 0,007	1,87 $\pm$ 0,03
Sham Grubu	225,70 $\pm$ 125,12	2,08 $\pm$ 0,002	2,32 $\pm$ 0,12	189,65 $\pm$ 68,20	2,09 $\pm$ 0,005	2,32 $\pm$ 0,08
Tedavi Grubu	155,13 $\pm$ 85,15	2,07 $\pm$ 0,004	2,2875 $\pm$ 0,11	105,15 $\pm$ 29,36	1,98 $\pm$ 0,004	2,04 $\pm$ 0,10

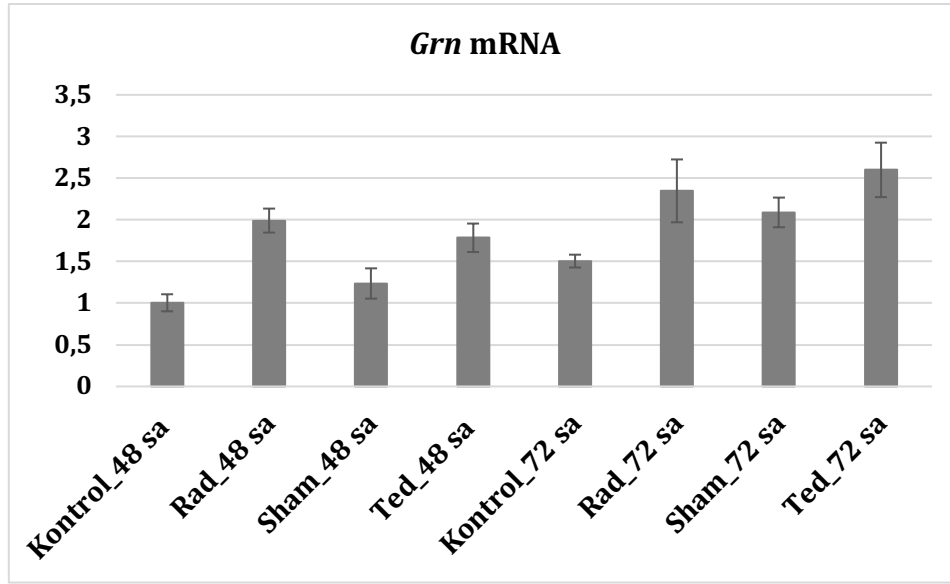
4.5.3.2. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

Nrf2 mRNA ekspresyonu incelendiğinde, 48. saatteki kontrol grubuna kıyasla, radyasyon ve sham gruplarında anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $P=0,020$, $P<0,001$) (Şekil 4.81) ancak, 48. saatte radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma anlamlı bulunmamıştır. 72. saatteki *Nrf2* mRNA ekspresyonu incelendiğinde ise 48. saatteki kontrol grubuna kıyasla, 72. saatteki radyasyon, sham ve tedavi gruplarında anlamlı düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $P<0,001$, $P<0,001$, $P=0,001$) (Şekil 4.81) fakat, ancak, 72. saatte radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma anlamlılık göstermemektedir (Şekil 4.81).



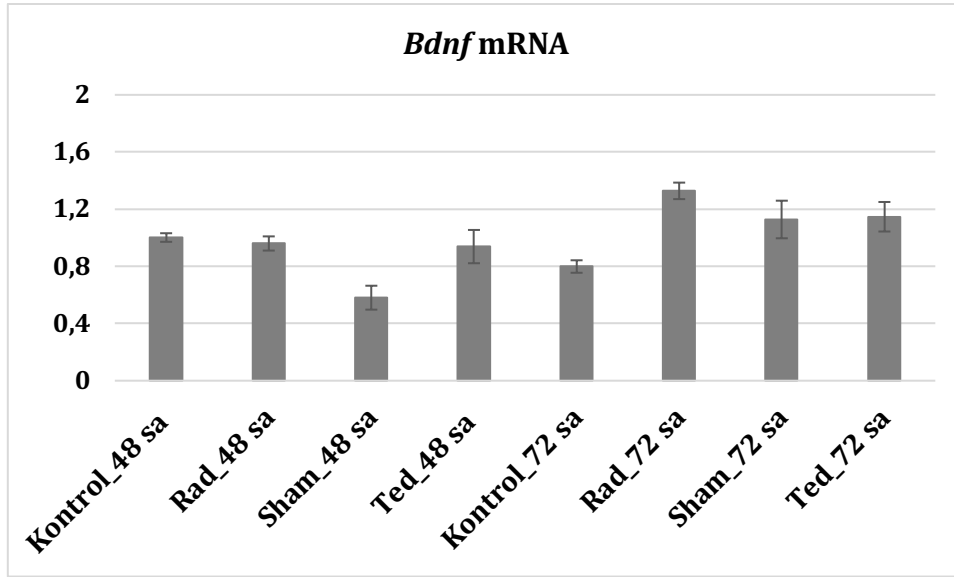
Şekil 4. 81. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki *Nrf2* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

Grn mRNA ekspresyonu incelendiğinde, 48. saatteki kontrol grubuna kıyasla, radyasyon grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($P<0,001$), sham grubundaki artış anlamlı değildir (Şekil 4.82). Ayrıca, 48. saatteki radyasyon ve tedavi grubu arasında da istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.82). 72. saatteki kontrol grubuna göre, radyasyon grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($P=0,002$) (Şekil 4.82). Ancak, 72. saatteki radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.82).



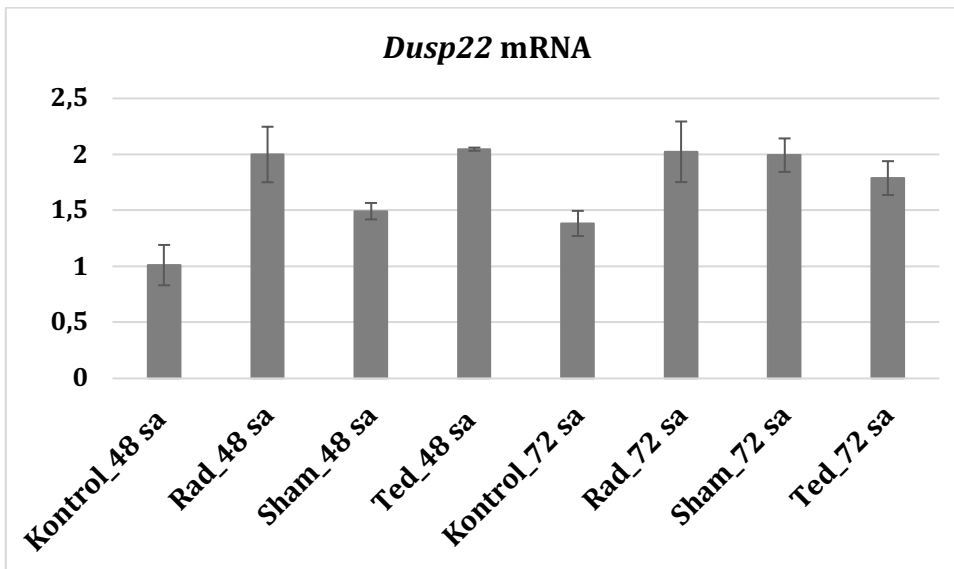
Şekil 4. 82. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve Sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki *Grn* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

Bdnf mRNA ekspresyonu incelendiğinde, 48. saatteki kontrol grubu ile radyasyon grubu arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmezken, kontrole göre sham grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$) (Şekil 4.83). 48. saatte radyasyon ile tedavi grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.83). 72. saatteki kontrol grubuna göre, radyasyon ve sham grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (sırasıyla $P<0,001$ ve $P=0,002$) (Şekil 4.83). 72. saatteki radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.83).



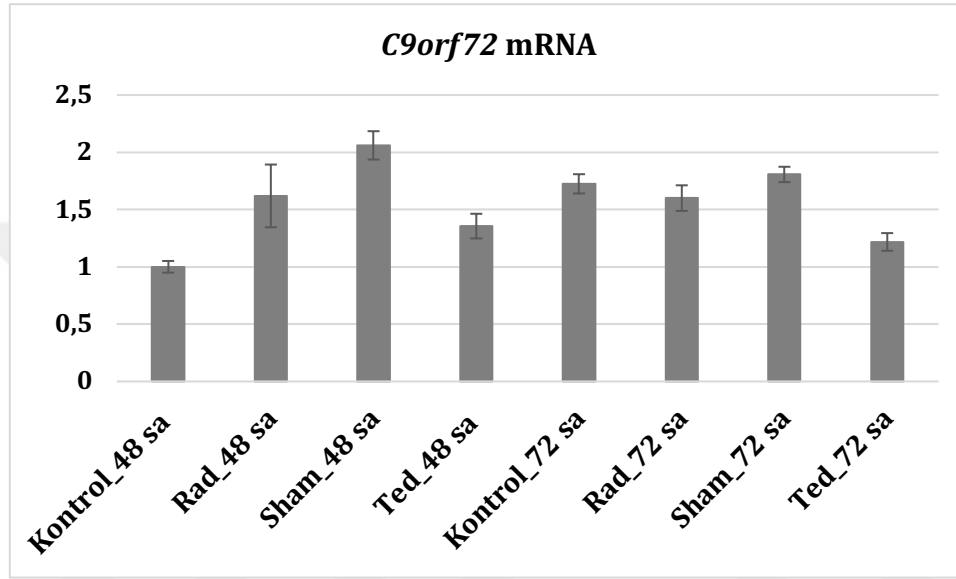
Şekil 4. 83. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki *Bdnf* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

Dusp22 mRNA ekspresyonu incelendiğinde ise 48. saatteki kontrol grubuna kıyasla, radyasyon grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı iken ($P<0,001$), sham grubundaki artış anlamlı değildir göstermektedir (Şekil 4.84). 48. saatteki radyasyon grubu ile tedavi grubu arasında ise bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.84). 72. saatteki kontrol grubuna göre, radyasyon ve sham grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (sırasıyla $P=0,003$ ve $P=0,005$) 72. saatteki radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalma anlamlı değildir (Şekil 4.84).



Şekil 4. 84. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki *Dusp22* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

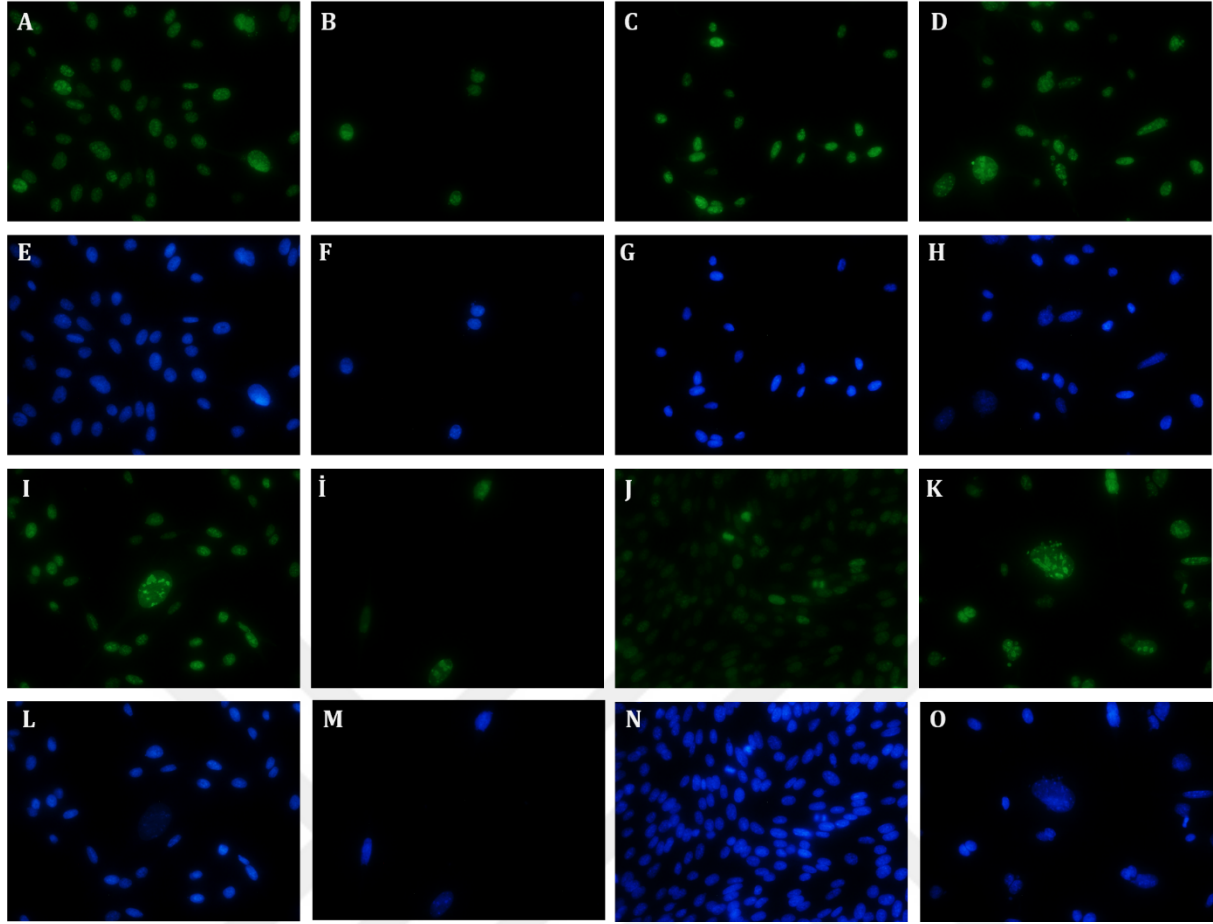
C9orf72 mRNA ekspresyonu incelendiğinde, 48. saatteki kontrol grubuna kıyasla, radyasyon ve sham grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$) (Şekil 4.85). 48. saatte radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.85). 72. saatteki kontrol grubuna kıyasla, radyasyon grubundaki azalma ve sham grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir (Şekil 4.85). 72. saatteki radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0,039$) (Şekil 4.85).



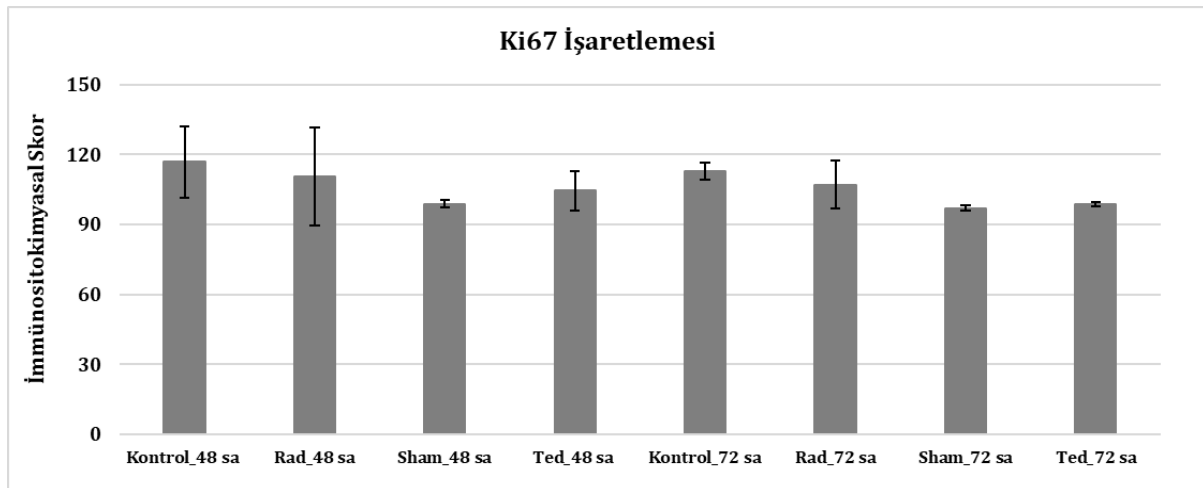
Şekil 4.85. Kontrol (48 sa ve 72 sa sonunda), radyasyon (8 Gy, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve sham (makrofaj medya eklenen grup, 48 sa ve 72 sa sonunda) ve tedavi (8 Gy radyasyonun makrofaj medyası ile tedavi edilen grubu, 48 sa ve 72 sa sonunda) gruplarının 48. ve 72. saatlerdeki *C9orf72* mRNA ekspresyonunun kat değişim grafiği. (n=4).

4.5.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

8 Gy doz iyonize edici radyasyon uygulanan HT22 hücrelerinin KM ile tedavi edilen gruplarında zamana bağlı değişen Ki67 immün işaretleme sonuçları incelendiğinde, 48. saatteki kontrol grubuna göre radyasyon ve sham gruplarında Ki67'nin protein ekspresyonundaki azalmanın ve radyasyon grubuna göre tedavi grubundaki azalmanın anlamlı düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.86, Şekil 4.87). 72. saatteki Ki67 immün işaretleme sonuçları incelendiğinde ise kontrol grubuna göre radyasyon ve tedavi gruplarındaki azalma anlamlı düzeyde değil iken sham grubundaki azalmanın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P=0,004$) (Şekil 4.86, Şekil 4.87).

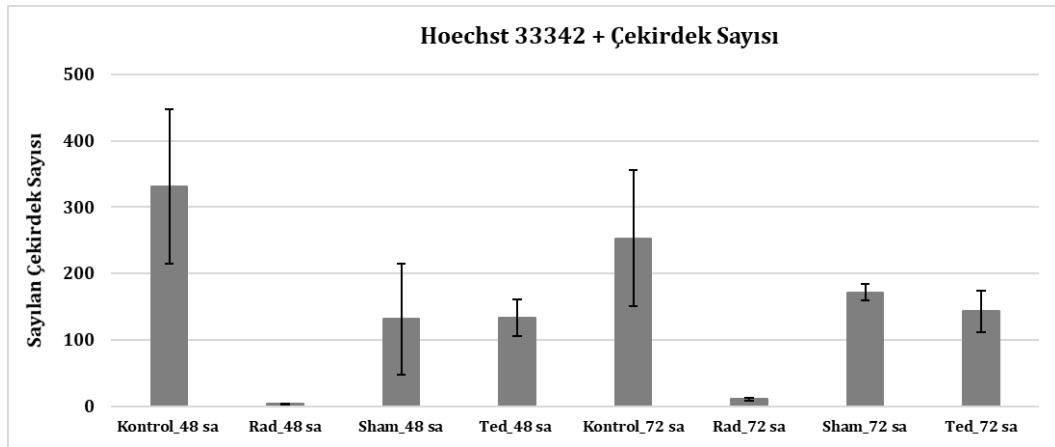


Şekil 4.86. Anti-Ki67 primer antikoru ile işaretlenmiş HT22 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki gruplar arası karşılaştırılması. (A-D, I-K) FITC, (E-H, L-O) Hoechst 33342. (A, E) Kontrol_48, (B, F) Rad_48, (C, G) Sham_48, (D, H) Ted_48, (I, L) Kontrol_72, (J, M) Rad_72, (K, N) Sham_72, (O) Ted_72. Objektif büyütmesi: 40X. (n=5).



Şekil. 4.87. Gruplar arası farklı zaman noktalarındaki (48 ve 72. saat) anti-Ki67 primer antikoru ile işaretlenmiş HT22 hücrelerinin işaretlenme yoğunluklarının karşılaştırılması. (n=5).

HT22 hücrelerinin KM ile tedavi edilen gruplarında zamana bağlı değişen Hoechst 33342 pozitif işaretlenmiş nükleus sayım sonuçları değerlendirildiğinde, 48. saatteki kontrol grubuna göre radyasyon ve sham grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (sırasıyla $P<0,001$, $P=0,003$) (Şekil 4.88). Ayrıca, 48. saatteki radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki artış, istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir (Şekil 4.88). Bunların yanında, 72. saatteki kontrol grubuna göre radyasyon grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı iken ($P<0,001$) sham grubundaki azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.88). 72. saatteki radyasyon grubuna göre, tedavi grubundaki artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.88).



Şekil. 4.88. Gruplar arası farklı zaman noktalarındaki (48 ve 72. saat) Hoechst 33342+/DAPI+ HT22 hücre sayılarının karşılaştırılması. (n=5).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hafıza ile ilişkili yapıların bir parçası olan HP, en çok araştırılan beyin bölgelerinden birisidir [16]. 25 Ağustos 1953'te, Henry Gustav Molaison'un (H.M.) dirençli epilepsisini tedavi etmek amacıyla bir beyin cerrahı olan William Beecher Scoville'in, hastasından HP'ye yakın temporal lobu çıkartmasının sonuçlarından biri olarak, hastanın bildirimsel anı oluşturma yeteneğini kaybetmesiyle başlayan HP çalışmaları, nörobiyolojik araştırmalarda önemli bir yere sahiptir [16,139]. Hipokampus'ta gerçekleşen biyolojik olaylar, kişinin bir ortamda yolunu bulması ve bu süreçte meydana gelen olayları hatırlaması gibi birçok bilişsel yeteneklerle ilişkili olduğundan, bu bölgede meydana gelen bir hasar kişinin yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir [5]. Örneğin, Makale ve ark. tarafından 2017 yılında yayınlanan bir derlemede, Amerika Birleşik Devletleri'nde, beyin tümörü olan ve RT gören hastaların 100.000'i kadarının altı aydan fazla süre yaşamakta olduğunu ancak bu hastaların %50-90'ında öğrenme, hafıza, konuşma, dikkat ve muhakeme gibi önemli bilişsel fonksiyonlarda, engellilik düzeyinde bozukluklar gözlemlendiği rapor edilmiştir [49,140-142].

İyonize edici radyasyon biyolojik sistemler ile etkileşime girmekte ve bu etkileşim sırasında radyoaktif kaynak, çevresindeki molekülleri iyonlaştırarak enerji kaybetmektedir. Bu tür bir radyasyonun önemli ölçüde zararları gözlenmektedir, çünkü radyasyonun canlı dokuya nüfuz etmesi durumunda ortaya çıkan iyonlar, vücutta zararlı etkilere yol açan bir takım kimyasal değişikliklere neden olabilmektedir [143]. Günlük hayatta en sık karşılaşılabilecek radyasyon şekli, nükleer santral kazalarındaki büyük radyasyon sızıntıları dışında, tıpta teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan cihazlardan alınan iyonize edici radyasyon olarak kabul edilebilmektedir [144]. Radyasyon tedavisi, başarılı bir yöntem olmakla birlikte, insidansı giderek artan primer ve sekonder intrakraniyal tümörler için baskın bir tedavi seçeneği haline gelmektedir. Bununla birlikte, radyasyon o bölgedeki tümörü ortadan kaldırmaya çalışırken, sağlıklı beyin dokusuna da zarar vererek, kişilerde radyasyona bağlı bilişsel işlev bozukluğuna neden olmasından ötürü önemli bir dezavantaja sahiptir [91]. Merkezi sinir sistemi (MSS), radyasyona en çok duyarlı organ olarak kabul edilmese de bu dokulardaki iyonize edici radyasyon hasarının, özellikle yaşam kalitesi için yıkıcı etkileri bulunabilmektedir ve oluşan hasarın onarılması oldukça zordur. Radyoterapi (RT) sırasında akut yüksek doz radyasyon, MSS'de seyirci etkisi (bystander effect) hasarına neden olarak, erişkin hipokampal nörogenezin azalmasına ve korteks ve hipokampus boyunca nöroinflamasyonun gelişmesine yol açabilmektedir. Bu durum, hasta özellikle çocukluk veya ergenlik çağında ise gelişmekte olan beyin için, bilişsel fonksiyon bozuklukları ve hafıza kaybı ile sonuçlanabilmektedir [72,145,146]. İyonize edici radyasyon, MSS üzerinde hem akut hem de kronik etkilerle, DNA hasarı, hücre ölümü, sistemik inflamasyon ve oksidatif stres gibi birçok karmaşık hücresel ve moleküler değişikliğe neden olmaktadır [62]. Bu nedenle, iyonize

edici radyasyonun zararlı etkilerini azaltmaya yönelik önlem ve/veya terapötik yaklaşımlar, kapsamlı ve karşılaştırmalı analizlere ihtiyaç duyan önemli bir çalışma alanıdır [62].

Çok uzun bir süredir sağlıklı hücreler ve/veya kanser hücreleri üzerindeki radyasyon maruziyeti ve sonrasında gerçekleşen biyolojik olaylar araştırılmaktadır [147,148]. İlk radyasyon maruziyetinden sonra, maruziyet anından bu enerji birikiminin yarattığı hasarın oluşumuna kadar geçen sürede meydana gelen biyolojik süreçler iyi tanımlanabilirse, iyonize edici radyasyon hasarının düzenlenmesi için birtakım araçlar geliştirilebilir [149]. Bu amaçla, nöral sistem üzerindeki radyasyon bağımlı bilişsel bozuklukların temelindeki patogeneze mekanizmalarını ve/veya radyasyonun etkisini anlamak üzere, birçok *in-vitro* ve *in-vivo* çalışma gerçekleştirilmiştir [79,80,150]. Literatür incelendiğinde, HT22 hücreleri ile oluşturulmuş *in-vitro* radyasyon modellerinde, çalışmamızda uygulananla benzer şekilde, kaynağı X-ışını olan iyonize edici radyasyonun etkilerinin doz ve süreye bağlı olarak değerlendirildiği görülmektedir (Tablo 2.1) [76,77,91-94]. Çalışmamızda literatürde sıklıkla kullanılan ve fare hipokampusunu temsil eden ölümsüzleştirilmiş nöral hücre hattı olan HT22 hücreleri kullanılmıştır [87-90]. Çalışmamızın ilk kısmında, sağlıklı beyin dokusunu temsil eden bu hücelere farklı dozlarda ve sürelerde, kaynağı X-ışını olan iyonize edici radyasyon uygulanmış ve radyasyonun etkileri süreye bağlı olarak birçok açıdan, farklı teknikler kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, radyasyonun sağlıklı hücrelerde tahrip edici etkisinin olduğunu göstermektedir. Literatürde, HT22 hücrelerine uygulanan radyasyonun dozu arttıkça hayatta kalan hücre sayısında azalmaya ve apoptoza giden hücre oranlarında ciddi düzeyde artışa rastlanmakta olduğu rapor edilmiştir [77,91-93,96]. Bu anlamda çalışmamızda da literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34-37, Şekil 4.47- 50, Şekil 4.77-80, Şekil 4.88) (Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.4, Tablo 4.5). Şöyle ki, radyasyon dozunun artışına bağlı olarak hayatta kalan hücrelerin sayısında önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3) (Tablo 4.1). Akım sitometrik bulgulara, hücelere uygulanan radyasyonun düşük (2 Gy) ve yüksek (8 Gy) dozlarında, ilk 6 saatin sonunda bile erken ve geç apoptozda ve nekrozda belirgin bir artış olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.34-36). Bu sonuçların yanı sıra, ışık ve elektron mikroskopik bulgulara hasarın morfolojik düzeyde belirgin bir şekilde gözlemlenmesi ancak 24 saatin sonrasında gerçekleşebilmektedir. Bu durumun nedeninin hücrelerdeki hasarın morfolojik bulgu olarak daha geç ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.4-31). Biyolojik sistemler üzerine iyonize edici radyasyon uygulanan çalışmaların elektron mikroskopik verileri incelendiğinde, hasarın oluştuğuna dair ilk ortak bulgu mitokondriyonlar üzerinedir. Bazı çalışmalarda şişmiş ve dejenere olmuş mitokondriyonların varlığının tespit edildiği vurgulanırken [151,152] bazılarında da radyasyon hasarına karşı küçülmüş mitokondriyonların varlığı bildirilmektedir [153]. Bu sonuçlar, hücrelerin radyasyona karşı ilk tepki gösteren

organellerinin mitokondriyonlar olması açısından tutarlılık göstermektedir, ancak bahsedilen bulgulardaki farklılıklar çalışılan değişik tipteki hücrelerin organel düzeyinde farklı yanıtlar vermesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, literatürde iyonize edici radyasyon hasarının bir sonucu olarak apoptotik hücre görüntülerine ve yoğun kromatin parçacıklarına rastlandığı da belirtilmektedir [154,155]. Çalışmamızda, özellikle 8 Gy radyasyon maruziyeti sonucu, şişmiş ve dejenere olmuş mitokondriyonların varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, hücrelerde stresi, hasarı ve/veya ölümü işaret eden bulgulardan olan sayısı artmış otofagozomlara, veziküllere, lizozomlara, izolasyon membranlarına, genişlemiş perinükleer alana ve GER sisternalarına; hatalı hücre bölünmesinin sonucu olarak ışık mikroskopik olarak da gözlemlendiğimiz, artmış mikronükleuslara ve dev polimorfonükleer hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4.6, Şekil 4.11, Şekil 4.22-31, Şekil 4.52- 55, Şekil 4.62- 65) [156–163]. İyonize edici radyasyon hasarı farklı DNA hasar onarım mekanizmaları tarafından düzeltilmesine rağmen, radyasyon doğrudan ve su moleküllerinin iyonlaşması yoluyla dolaylı olarak DNA hasarına neden olabilmektedir [128]. Dahası, radyasyon kaynaklı oluşan serbest oksijen türleri (ROT), proteinlere ve DNA'ya saldırarak protein yapılarında değişikliklere; DNA'da tek ve/veya çift zincir kırıklarına, DNA dizisinde bozulmaya ve proto-onkogen ve tümör inhibitörü gen mutasyonları da dahil olmak üzere mutasyonlara neden olarak hücrelerde hasar oluşturabilmektedir [128,164]. Artan radyasyon dozuna bağlı olarak, mikronükleus ve dev polimorfonükleer hücre oluşumları gibi hücre nükleuslarında meydana gelen patolojik morfolojileri ışık ve elektron mikroskopik olarak da gözlemleyebilmekteyiz (Şekil 4. 6, Şekil 4.11, Şekil 4.26, Şekil 4.30, Şekil 4.52-54, Şekil 4.62). Yukarda bahsedilen tüm bu morfolojik bulguların yanı sıra, radyasyon hasarı sonucu hem ışık hem de elektron mikroskopta net bir şekilde fark edilebilen, lamellipodia yapılarında dramatik bir azalma olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bu durumun nedeni olarak, radyasyon hasarına karşı, hücre iskeleti elemanlarının (özellikle aktin) yapısındaki ve/veya düzenlenmesindeki bozulmalar gösterilebilir [46,165–170]. Hatta literatürde bu durumla ilgili, kanser hücrelerini ortadan kaldırmaya ya da en azından hücrelerin göçünü engellemeye yönelik, bu hücrelerdeki aktin iskeletin yapısını bozmayı hedefleyen terapötik yaklaşımlar da ileri sürülmektedir [166,167].

Çalışmamızın ikinci kısım deneyleri ilk kısmından elde edilen bilgilerden faydalanılarak tasarlanmış olup, klinikte tek seferde en yüksek kranial doz olarak uygulanan 8 Gy radyasyonun hücrelerde neden olduğu yıkıcı etkiyi immünoterapi yaklaşımıyla *in-vitro* ortamda azaltmayı hedeflemiştir. Bu aşamada, hücrelere uygulamak için en yüksek doz seçilmiştir, çünkü bu dozda oluşan bir hasarı onarabilme potansiyeli olan bir yaklaşımın daha düşük dozlarda da başarılı olabileceği öngörülmüştür. Çalışmamız, HT22 hücrelerinde radyasyonun oluşturduğu hasarı, fare makrofaj hücre hattı olan RAW 264.7 makrofajlarından elde edilen koşullandırılmış medyum

(KM) kullanarak onarma yaklaşımıyla tasarlanmıştır. Yakın geçmişte, HT22 hücreleri ile yapmış olduğumuz bir başka çalışmada, fare makrofaj hücre hattı KM'si kullanılarak, bu medyanın nöral hücrelere olgun nöron oluşum yönünde katkı sağlayabildiğini göstermiştik [137]. Bu sonuçlar doğrultusunda, koşullandırılmış medyumun radyasyon hasarına karşı koruyucu ve/veya onarıcı bir etkisi olup olmadığını anlamak için bu tez çalışmasının ikinci kısmında, bu yaklaşım test edilmiştir. Bu aşamada, mikrogliya kullanmak yerine makrofajların kullanılması tercih edilmiştir. Mikrogliaların MSS'de nöronal hücreler üzerindeki rolü vazgeçilmez olsa bile, insanlardan mikrogliya elde etmenin pratik veya makul olamayabileceği gerekçesiyle immünoterapötik bir yaklaşımda kullanılması önemli bir dezavantaj oluşturabilmektedir. Pratikte de elde edilmesi daha kolay ve daha az invaziv olan periferik kandan monosit/makrofajların kullanılması daha avantajlı ve umut verici bir strateji olmasından dolayı bu hücreler tercih edilmiştir. Çalışmamızda, öncelikle radyasyona maruz kalan HT22 hücrelerini KM ile muamele etme işlemi sonucunda, hayatta kalan canlı hücre popülasyonunu en başarılı şekilde oluşturan grubun hangisi olacağı belirlenmiştir. Çünkü çalışma boyunca asıl amacımız, radyasyonun neden olduğu ve hücre ölümüne kadar giden yıkıcı etkiyi maksimum düzeyde azaltan grubu belirlemektir. Yani bu bağlamda, KM ile muamele işleminin radyasyondan önce mi, sonra mı, yoksa hem önce hem de sonra mı yapılmasının daha etkili olduğu ve dahası, bu medyumla 24 saat boyunca mı yoksa 48 saat boyunca mı muamele etmek gerektiği sorularına cevaplar aranmıştır. Bu soruları cevaplayabilmek için, kültür ortamından sürekli olarak anlık veri toplama kapasitesine sahip ve yaygın olarak kullanılan, gerçek zamanlı hücre canlılık testlerinden biri olan xCELLigence sistemi kullanılmıştır. Radyasyon maruziyeti sonrasında bu sistemden elde edilen hücre bölünme hızı verileri ve ayrıca canlı kalan hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini test eden CKHKT sonuçlarına göre potansiyel tedavi olarak en başarılı grup belirlenmiştir. Her iki test de aynı sürede (120 saat) ve eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hem koloni testi hem de gerçek zamanlı hücre canlılık testi sonucunda, en başarılı grup, radyasyondan önce 24 saat KM uygulanıp radyasyondan 24 saat sonra KM uygulanan grup olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.47-50). Bunun yanı sıra xCELLigence deneyleri sonucunda, en başarılı olarak belirlediğimiz grubun 120 saatlik süreçteki çoğalma davranışının 36-72. saatler arasında değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Bu sebeple, daha ileri soruları cevaplamak amacıyla iki farklı zaman noktası belirlenip (48 ve 72. saat) seçtiğimiz tedavi grubunda, bu zamanlarda gerçekleşen bir takım biyolojik olaylar da araştırılmıştır.

Literatürden ulaşabildiğimiz, HT22 hücreleri ile gerçekleştirilmiş, iyonize edici radyasyonun olumsuz etkilerini onarabilme potansiyeli bulunan bu yaklaşımın uygulandığı, çok az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır [91]. Bu açıdan bakıldığında, çalışmamız literatürde az sayıda bulunan bu yaklaşımla ilgili, özellikle gen ekspresyonu ve KM süreleri açısından literatüre yeni

veriler sunmaktadır. Huang Y. ve ark.'nın (2021) HT22 hücrelerini kullanarak yaptığı bir çalışmada, mezenkimal kök hücre ile koşullandırılmış medyumun (MSC-KM), hipokampal nöronları iyonize edici radyasyon hasarından koruduğu bildirilmektedir [91]. Bu çalışma, radyasyonun HT22 hücrelerinde ROT ve malondialdehid (MDA) üretimini arttırdığını ve bu yolla da hücre kaybına neden olduğunu belirtmektedir. Dahası, bu çalışmayla radyasyon yüzünden artan ROT üretimi ile radyasyonun sağlıklı hücrelerde neden olduğu oksidatif stres üzerindeki rolünün daha da desteklendiği vurgulanmaktadır. Bu durumu düzeltmek için araştırmacılar, HT22 hücreleri üzerine uyguladıkları MSC-KM'nin, radyasyon almış HT22 hücrelerinde, ROT ve MDA üretimini azalttığını ve süperoksitdismutaz (SOD) aktivitesini ve glutatyon (GSH) seviyelerini arttırdığını ve nöronal apoptozu hafifletebileceğini ileri sürmektedir. Ayrıca, MSC-KM'nin bu etkisini hücrelerdeki antiapoptotik ve antioksidan düzenlenmede görevi olan PI3K/AKT yolunu aktive ederek, radyasyona bağlı apoptozu azalttığını ve MSC-KM'nin radyasyonun neden olduğu oksidatif strese karşı hücrelerde koruma sağlayabileceğini bildirmişlerdir [91]. Bu tez çalışmasıyla yukarıda belirtilen çalışmanın ortak noktalarından biri, iyonize edici radyasyon hasarını, medyum içeriğinde pek çok parakrin faktör barındıran bir hücre tipinin medyumunu ile onarma yaklaşımıdır. Gelecekte, çalışmamızın ilerleyen aşamalarında makrofaj medyumunun radyasyon almış HT22 hücrelerinde oluşturduğu, oksidatif strese karşı olası koruyucu etkisi de araştırılmaya değer bulunmaktadır. Bu çalışmada, sadece radyasyondan sonra MSC-KM ile muamele işlemi gerçekleştirilmiş ve bu işlemin ne kadar süre gerçekleştirildiği vurgulanmamıştır. Çalışmamızda, radyasyon hasarını onarma potansiyeli bulunan makrofaj medyasıyla koşullandırılmış medyumun HT22 hücreleri üzerinde etki süreleri ayrıntılarıyla oluşturulmuş ve sonuçlar birçok açıdan değerlendirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneyler sonucunda, KM'nin özellikle zaman ilerledikçe (72. saat) erken ve geç apoptozu ve nekrozu azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, gerçek zamanlı hücre analizi, CKHKT ve Hoechst 33342 pozitif çekirdek sayım sonuçları ile de uyumluluk göstermektedir (Şekil 4.43-4, Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.77-80, Şekil 4.88). Bunların yanı sıra, hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan bir belirteç olan Ki67 [171] ile işaretlenmemiş hiçbir hücrenin olmadığı gözlenmiştir. Dahası, işaretlenmiş olan tüm bu hücrelerin ekspresyon yoğunluğu değerlendirildiğinde, gruplar arasında hem 48. hem de 72. saatlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar bize, radyasyonun birçok hücrenin ölümüne neden olduğunu ancak, hayatta kalan hücrelerin hala çoğalma yeteneklerini koruduğunu göstermektedir. Daha ileri çalışmalar için bu verilere ek olarak, tüm gruplar için hücre siklusu deneyleri gerçekleştirilerek, tedavi grubunun radyasyona karşı hücre bölünmesinin hangi aşamasında nasıl bir etki oluşturduğu da incelenebilir.

Çalışmamızda, hücrelerin radyasyon ile uyarılan gruplarında ve tedavi grubu olarak belirlediğimiz grubun, iki farklı zaman noktasında bazı genlerin ekspresyonları incelenmiştir. Bu genlerden ilki, antioksidan yanıtta ve ilaç metabolizmasında önemli görevleri bulunan ve bir transkripsiyon faktörü olan *Nrf2*'dir [101]. *Nrf2* yalnızca gen ifadesini indüklemekle kalmayıp, aynı zamanda baskılayıcı olarak da çift yönlü bir işlev görmektedir [172]. Çalışmamızda, *Nrf2*'nin doz ve zamana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir (Şekil 4.38, Şekil 4.81). Bu durum, radyasyona bağlı olarak gelişen, hücrelerin oksidatif strese karşı oluşturduğu en önemli tepkilerden biri olarak düşünülebilir. Yapılan son araştırmalar, kanser hücrelerinde *Nrf2* inhibisyonunun hücre büyümesinde bir azalmaya ve radyasyon duyarlılığında bir artışa yol açtığını bildirmektedir. Dahası, *Nrf2*'nin radyasyon tedavisi de dahil olmak üzere kanser tedavisinde hedef bir faktör olduğu düşünülmektedir [173].

Progranulin (PGRN) proteinini kodlayan *Grn* geninin MSS'de bazı nöron gruplarında eksprese olduğu bilinmektedir. Bu genin kodladığı PGRN'nin çoğunlukla ekstraselüler EphA2 reseptörü ve Notch sinyal yolağı vasıtasıyla aksonal ilerleme ve nöral hayatta kalma gibi nöral fonksiyonlar üzerinde nörotropik bir faktör gibi etkileri olduğu düşünülmektedir [108,174]. Öte yandan, iyonize edici radyasyon sonrasında *Grn* geninin ya da PGRN proteinin hipokampal hücrelerde nasıl bir davranış gösterdiğini inceleyen bir literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda ise *Grn* ifadesi radyasyon maruziyeti sonrasında HT22 hücrelerinin hayatta kalma tepkilerini ölçebilmek açısından değerli bir parametre olarak görülmektedir. Çalışmamızın ilk basamağında *Grn* ifadesinde gözle görülür bir artış olduğu tespit edilmiştir. Özellikle bu artışın 8 Gy dozunda 2 Gy'ye kıyasla daha yüksek biçimde ve istatistiksel olarak da anlamlı bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 4.39). Bu bulgu *Grn* ifadesinin radyasyon dozundaki artışla doğru orantılı biçimde arttığı şeklinde de yorumlanabilir. Artan radyasyon dozu ile *Grn* ifadesinin de artması HT22 hücrelerinin hayatta kalmak için otokrin biçimde nörotropik bir faktör olan PGRN proteinini arttırma eğiliminde olduğunu işaret edebilir. Çalışmamızın ikinci basamağında elde edilen veriler incelendiğinde radyasyon maruziyetinden 48 ve 72 saat sonra HT22 hücrelerinde *Grn* ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ve zamanla doğru orantılı biçimde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.82). Bu bulgu, çalışmamızın ilk basamağında elde edilen verilerle örtüşmekte ve HT22 hücrelerinin radyasyona bağlı ortaya çıkan hasarı önlemek veya sağ kalım mekanizmalarını oluşturmak üzere *Grn* ifadesini arttırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sinir büyüme faktörü ailesinin en iyi bilinen üyelerinden biri olan *Bdnf* geni tarafından kodlanan BDNF proteininin, nöral gelişim, nöronal farklılaşma, sinaptik aktivite ve nöral hayatta kalım gibi birçok hücresel olayı etkilediği bilinmektedir [175,176]. Çalışmamızın ilk basamağında, 2 Gy radyasyonla *Bdnf* ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla değişmediği, 8 Gy dozla ise 6 saat sonunda anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. 24 saat sonra ise ifade seviyesinin tekrar

yükselmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.40). *Bdnf* ifadesinin çok kısa sürede dikkat çekici bir şekilde azalıp, 6. saatten 24. saate kadar yine belirgin bir artış göstermesi oldukça ilginçtir. Bu tablo, *Bdnf* transkripsiyonun HT22 hücrelerinde radyasyona karşı zamana bağlı tepkiler şeklinde düzenlendiğini işaret etmektedir. Çalışmamızın 2. basamağında gösterildiği üzere, 8 Gy radyasyon maruziyetinden 48 saat sonra, kontrol ve radyasyon grubu arasında *Bdnf* ifadesi açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.83). Bu sonuç, çalışmamızın ilk basamağında görülen 6. saatten 24. saate kadar olan anlamlı ekspresyon yükselişi ve 24. saatte radyasyon grubu ifade seviyesinin kontrol grubu ile denk olması ile örtüşmektedir (Şekil 4.40). Çalışmamızda, 24 ve 48. saat arasındaki ifade değişimlerini gözlemleyemsek de 8 Gy radyasyon etkisinin 48. saate kadar kontrol grubu ile denk biçimde ifade olduğu görülmektedir (Şekil 4.83). Öte yandan, çalışmamızda ikinci basamakta kontrol grupları, deney grupları için bekletilen süre kadar, yani 48 ve 72 saat boyunca kontrol şartlarında kültüre edilmişlerdi. Bu anlamda, 72. saatteki *Bdnf* ifadesinin 48. saatte ölçülen seviyeye kıyasla değişmediği gözlenmiştir. Bu noktada, gerçek zamanlı hücre verileri incelendiğinde (Şekil 4. 47-50), 48. saatten 72. saate kadar geçen süre içerisinde kontrol grubu HT22 hücrelerinin bölünme hızının belirgin biçimde artış gösterdiği, buna karşın *Bdnf* ifadesinin değişmediği dikkat çekicidir (Şekil 4.83). Proliferatif karakterde olduğu bilinen HT22 hücre hattında, incelediğimiz saatler arasında bölünme hızı artarken *Bdnf* ekspresyonunun değişmemesi, HT22 hücrelerindeki kromatin materyalinin, hücrelerin bölünmesine *Bdnf* transkripsiyonu açısından kayda değer bir etki oluşturmadığını işaret etmektedir. Ancak, başka gruplardaki *Bdnf* ifadesinin kontrol grubuna kıyasla farklılıklar gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.83). Bunlardan en çarpıcı olanı, 72. saatte radyasyon grubu *Bdnf* ifadesinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmış olması olarak gösterilebilir (Şekil 4.83). Ya da aynı tabloya başka bir açıdan bakacak olursak, radyasyon maruziyetinden 72 saat sonra *Bdnf* ekspresyon seviyesinin, yine radyasyon grubundaki fakat 48. saatteki seviyeye kıyasla belirgin biçimde yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.83). Radyasyon maruziyetinden 6 saat sonra azalan, 24. saatte tekrar yükselen ve en azından bulgularımız kapsamında gördüğümüz kadarıyla 48. saate kadar kayda değer biçimde değişmeyen *Bdnf* ifadesinin 72. saatte tekrar yükselmesi, kromatin materyalinin HT22 hücrelerinde sadece anlık bir moleküler tepki değil zamana bağlı tekrar düzenlenebilen bir tepki oluşturduğunu işaret etmektedir. Bu büyüme faktörünün hücrelerde parakrin ve otokrin işlevleri bulunduğu düşünüldüğünde çift yönlü çalışan bir faktör olduğu da anlaşılmaktadır [175,177]. Canlı hipokampus dokusu içerisinde kemokinler ve sitokinler de dahil olmak üzere karışık bir sinyal molekül kokteyli, ortamdaki hücrelerin kendilerine özgü verdiği cevapları anlamamızı maskeleymektedir. Ko-kültür olmayan kültür çalışmalarının avantajı ise hücrelere yapılan bir etkinin hücrenin verdiği izole yanıtları net bir şekilde anlamamızı sağlamasıdır. Doğal ortamlarında yani hipokampus dokusu içerisinde, nöronal hücrelerdeki *Bdnf* etkinliği, muhtemelen çevre hücrelerin de sinyallerine bağlı olarak hücrelerin izole yanıtlarını

değiştirmektedir. Ancak, kültür ortamındaki hipokampal HT22 hücrelerinde *Bdnf* ekspresyonunun, radyasyon maruziyeti sonrasında zamana bağlı olarak arttığı noktaların bulunması, *Bdnf*'nin hücrenin radyasyon ile oluşan yıkıcı etkiye karşı otokrin olarak koruma sağlayabileceği anlamına gelebilmektedir. Deney fareleri ya da sıçanlarıyla oluşturulan kraniyal radyasyon modellerinde, radyasyonun hipokampus dokusu üzerinde oluşturduğu etkilere dair elde edilen bilgiler vazgeçilmezdir. Fakat, *in-vivo* çalışmalarda radyasyonun hipokampal hücreler üzerinde oluşturduğu izole yanıtları anlamak da mümkün değildir. Bu sebeple, *Bdnf* ekspresyonundaki değişiklikler yorumlanırken, HT22 hücrelerinin radyasyona karşı verdiği izole yanıtlar olduğu unutulmamalıdır.

Lenfomalarda etkili olduğu bilinen *Dusp22* geninin, radyasyonla ilişkisini gösteren çok az sayıda kaynak bulunmaktadır. Çalışmamızda, 2 Gy radyasyon uygulamasından 6 saat sonra *Dusp22* ekspresyonunda anlamlı bir şekilde artış ve zaman geçtikçe de bu genin ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.41). İlginç bir şekilde, 8 Gy radyasyon uygulanan gruplarda ise 6 saatin sonunda çok fazla bir artış gözlenmezken 24 saatin sonundaki artışın anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Dahası, 8 Gy radyasyondan sonraki bu artış 72. saatte de devam etmektedir (Şekil 4. 84). Tedavi grubunda ise *Dusp22* ekspresyonunda azalma olduğu görülmüş ama bu azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4. 84). Bu bulgular, bize *Dusp22* ekspresyonunda yüksek dozda zaman ilerledikçe artışın olduğunu, daha etkili ve kapsamlı bir immün sistem yaklaşımıyla bu genin ekspresyon seviyelerinin normale dönme potansiyeli bulunduğunu göstermektedir.

C9orf72 mRNA ekspresyonunun ise kontrol grubuna kıyasla, 2 ve 8 Gy gruplarında iyonize edici radyasyon uygulamasından sonra zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.42). Birçok nörodejeneratif hastalıkta mutasyona uğradığı tespit edilen *C9orf72*'nin, son yıllarda yapılan çalışmalarda, ekspresyon düzeyindeki değişikliklerin, hücrelerde otofagozom oluşumuyla ilişkilendirildiği ve veziküler trafiğin düzenlenmesinin farklı seviyelerinde etkili olduğu da gösterilmektedir [120]. Webster ve ark. (2016) tarafından *C9orf72* aşırı ekspresyonundan sonra nöronal olmayan HeLa ve HEK293 hücrelerinde artmış otofajik aktivite görüldüğü bildirilmiştir [178]. Leskelä ve ark. (2019)'nın fare Na2 nöroblastoma hücreleri ile yapmış olduğu başka bir çalışmada ise *C9orf72*'nin aşırı ekspresyonu sonucu, otofagozomların oluşumuna yol açtığı ve rapamisin ile indüksiyonu sonucu ise *C9orf72* seviyelerinde önemli ölçüde azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir [179]. Çalışmamızda, ışık ve elektron mikroskopik morfolojik veriler sonucu, doza ve zamana bağlı olarak otofagozomlarda artış olduğu (Şekil 4.5-7, Şekil 4.9), tedavi uygulanan gruplarda ise veziküllerde ve otofagozomlarda azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak *C9orf72*'nin otofajiyi aktive/inhibe edip etmediği tartışmalı bir konu olarak görülmektedir [179]. Dahası, *C9orf72*'nin işlevleri ile ilgili artan çalışmalar, bu genin otofaji ve inflamasyon arasında

güçlü bir düzenleyici olan GTPaz ile etkileşime giren bir kompleksin parçası olduğunu da göstermektedir [120]. *C9orf72* ekspresyonunun nörodejenerasyon, inflamasyon ve çevre ile bağışıklık etkileşiminin düzenlenmesini birbirine bağlayan yeni bir hedef olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle, *C9orf72* geninin otofagozomlarla ilişkisi hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

MSS'den türetilmemiş bağışıklık sistemi hücreleri kullanarak radyasyona bağlı oluşan sağlıklı hücre hasarı ile mücadele etmek için immünoterapi stratejileri geliştirilmekle birlikte henüz net bir tedavi biçimi sağlanamamıştır. Dahası, sağlıklı hücrelerin iyonize edici radyasyon hasarına karşı verdiği yanıtların altında yatan mekanizmaları netleştirmek ve bol miktarda deneysel kanıt sağlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, bu tez çalışması, radyasyon hasarına karşı hücreleri koruyabilecek ve nöral hücre hasarını onarabilme potansiyeli taşıyan, makrofaj bazlı koşullandırılmış besiyerinin olumlu etkilerini destekleyen ön bulguları sunmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda, nöral hücreler üzerindeki bu etki, *in-vivo* ortamlarda test edilerek koşullandırılmış medyumun potansiyel koruyucu ve/veya onarıcı etkisi biyolojik sistemler üzerinde de test edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1]. McTyre E, Scott J, Chinnaiyan P. Whole brain radiotherapy for brain metastasis. *Surg Neurology*, **2013**, 4:S236, PMC3656558.
- [2]. McDuff SGR, Taich ZJ, Lawson JD, Sanghvi P, Wong ET, Barker FG, vd. Neurocognitive assessment following whole brain radiation therapy and radiosurgery for patients with cerebral metastases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **2013**, 84(12):1384–91.
- [3]. Owonikoko TK, Arbiser J, Zelnak A, Shu HKG, Shim H, Robin AM, vd. Current approaches to the treatment of metastatic brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, **2014**, 11(4):203. PMC4041037.
- [4]. Green MR, McCormick CM. Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Horm Behav*, **2013**, 64(2):364–79.
- [5]. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, **2002**, 35(4):625–41.
- [6]. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, **1965**, 124(3):319–35.
- [7]. Noonan MA, Bulin SE, Fuller DC, Eisch AJ. Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *J Neurosci*, **2010**, 30(1):304–15.
- [8]. Sahay A, Wilson DA, Hen R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, **2011**, 70(4):582–8.
- [9]. Tatu L, Vuillier F. Structure and Vascularization of the Human Hippocampus. *Hippocampus Clin Neurosci*, **2014**, 34:18–25.
- [10]. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi 3. Baskı, **2021**, s 506–509.
- [11]. Snell R.S. Clinical Neuroanatomy, 7th baskı. Lippincot Williams& Wilkins; **2010**, s 308, 318.
- [12]. Pothuizen HHJ, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*, **2004**, 19(3):705–12.
- [13]. Fogwe LA, Reddy V, Mesfin FB. Neuroanatomy, Hippocampus. StatPearls [Internet]. 18 Temmuz **2022**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482171/>
- [14]. İzci Y, Cem Y, Adresi Y. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları Hippocampus: Its Structure and Functions. *Türk Nöroşir Derg*. **2015**;3:287–95.
- [15]. Standring S. Gray' Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practise. 41. baskı. Elsevier; **2016**.
- [16]. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*, 07 Aralık **2015**, 25(23):R1116–21.
- [17]. Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Rangananth C, Redish AD. Viewpoints: how

- the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci*, 10 Ekim **2017** ,20(11):1434.
- [18]. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*, 23 Nisan **2014**, 34:6–17.
- [19]. Perez-Cruz C, Nolte MW, Van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, vd. Reduced Spine Density in Specific Regions of CA1 Pyramidal Neurons in Two Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci*, 09 Mart **2011** ,31(10):3926–34.
- [20]. Songur A, Aslan ÖO, Mustafa S. 2001_Hipokampus HIPPOCAMPUS. *T Klin J Med Sci*; **2001**, s. 21:427-431.
- [21]. Tanaka T, Masubuchi Y, Okada R, Nakajima K, Nakamura K, Masuda S, vd. Ameliorating effect of postweaning exposure to antioxidant on disruption of hippocampal neurogenesis induced by developmental hypothyroidism in rats. *J Toxicol Sci.*, **2019**;44(5):357–72.
- [22]. Shoukry Y, Soliman NB. Effect of cyclic versus continuous hormonal replacement therapy on the structure of dentate gyrus of ovariectomized adult albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Egypt J Histol*, **2014** ,37(2):339–49.
- [23]. Toni N, Schinder AF. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 01 Ocak **2016**, 8(1):a018903.
- [24]. Jahn HM, Bergami M. Critical periods regulating the circuit integration of adult-born hippocampal neurons. *Cell Tissue Res*, 01 Ocak **2018**, 371(1):23–32.
- [25]. Hevner RF. Evolution of the Mammalian Dentate Gyrus. *J Comp Neurol*, 02 Şubat **2016**, 524(3):578.
- [26]. Rolando C, Taylor V. Neural Stem Cell of the Hippocampus: Development, Physiology Regulation, and Dysfunction in Disease. *Curr Top Dev Biol*. 01 Ocak **2014**, 107:183–206.
- [27]. Thomas. W. Sadler. *Langman’s Medical Embryology*, 14. baskı. Taylor C, editör. Wolters Kluwer. **2019**. 313–350 s.
- [28]. Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron*. 25 Mart **2004**;41(6):881–90.
- [29]. Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, vd. Neuronal or Glial Progeny: Regional Differences in Radial Glia Fate. *Neuron*. 06 Mart **2003**;37(5):751–64.
- [30]. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. 25 Haziran **2009**, 32:149–84.
- [31]. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*, 28 Ekim **2003** ,6(11):1127–34.
- [32]. Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 20 Temmuz **2007**, 317(5836):381–4.
- [33]. Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 25

Ekim **2004**,478(4):359–78.

- [34]. Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, vd. Embryonic Development–Anatomy&Physiology,OregonStateUniversity.
<https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/14-1-embryonic-development/>
- [35]. Dekeyzer S, De Kock I, Nikoubashman O, Vanden Bossche S, Van Eetvelde R, De Groote J, vd. “Unforgettable”–a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. Insights Imaging,01 Nisan **2017**,8(2):199–212.
- [36]. Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place Cells, Grid Cells, and the Brain’s Spatial Representation System,.17 Haziran **2008**,31:69–89.
- [37]. Brenner DJ, Hall EJ. Computed Tomography — An Increasing Source of Radiation Exposure. ,29 Kasım **2007**,357(22):2277–84.
- [38]. Grasty RL, LaMarre JR. The annual effective dose from natural sources of ionising radiation in Canada. Radiat Prot Dosimetry, 01 Şubat **2004** ,108(3):215–26.
- [39]. Kırac FS, Yüksel D. Radyasyon biyolojisi. GÜLTÜRK OFSET TANITIM; **2001**.
- [40]. Canadian Nuclear Safety Commission. Introduction to radiation. Canadian Nuclear Safety Commission (CNSC). **2012**,28–37 s.
- [41]. Symonds P (R. P, Mills J (John A., Duxbury A. Walter and Miller’s textbook of radiotherapy : radiation physics, therapy and oncology. :615.
- [42]. McBride WH, Schaue D. Radiation-induced tissue damage and response. C. 250, Journal of Pathology. John Wiley and Sons Ltd; **2020**. s. 647–55.
- [43]. Arslan N. The Effects of Radiation on Biological Systems. Nucl Med Semin. 01 Aralık **2017**;3(3):178–83.
- [44]. Sharma NK, Sharma R, Mathur D, Sharad S, Minhas G, Bhatia K, vd. Role of ionizing radiation in neurodegenerative diseases. Front Aging Neurosci. 14 Mayıs **2018**;10(MAY):134.
- [45]. Schaue D, Micewicz ED, Ratikan JA, Xie MW, Cheng G, McBride WH. Radiation and Inflammation. Semin Radiat Oncol. 01 Ocak **2015**;25(1):4–10.
- [46]. Huang Q, Zhou Z, Yan F, Dong Q, Wang L, Sha W, vd. Low-dose X-ray irradiation induces morphological changes and cytoskeleton reorganization in osteoblasts. Exp Ther Med. 29 Ekim **2020**;20(6):1–1.
- [47]. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Bystander effects of ionizing radiation: Conditioned media from X-ray irradiated MCF-7 cells increases the angiogenic ability of endothelial cells. Cell Commun Signal, 16 Aralık **2019** ,17(1):1–12.
- [48]. Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim EG, vd. Cellular Stress Responses in Radiotherapy. C. 8, Cells. NLM (Medline); **2019**.
- [49]. Greene-Schloesser DM, Moore E, Robbins ME. Molecular pathways: radiation-induced cognitive impairment. Clin Cancer Res, 01 Mayıs **2013**,19(9):2294–300.
- [50]. Lomax ME, Folkes LK, O’Neill P. Biological Consequences of Radiation-induced DNA

- Damage: Relevance to Radiotherapy. Clin Oncol. 01 Ekim **2013**;25(10):578–85.
- [51]. Allen C, Her S, Jaffray DA. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. Adv Drug Deliv Rev. 15 Ocak **2017**;109:1–2.
- [52]. De Ruyscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM, Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. Nat Rev Dis Prim, 21 Şubat **2019**, 5(1):1–20.
- [53]. Wang J song, Wang H juan, Qian H li. Biological effects of radiation on cancer cells. Mil Med Res, 30 Haziran **2018**, 5(1):1–10.
- [54]. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biol. 01 Temmuz **2019**, 25:101084.
- [55]. Chatterjee J, Nair RK, Langhnoja J, Tripathi A, Patil RK, Pillai PP, vd. ER stress and genomic instability induced by gamma radiation in mice primary cultured glial cells. Metab Brain Dis, 01 Haziran **2018**, 33(3):855–68.
- [56]. DeAngelis LM, Delattre JY, Posner JB. Radiation-induced dementia in patients cured of brain metastases. Neurology, 01 Haziran **1989**, 39(6):789–789.
- [57]. Abayomi OK. Pathogenesis of Irradiation-Induced Cognitive Dysfunction. **2009**, 35(6):659–63.
- [58]. Meyers CA, Brown PD. Role and relevance of neurocognitive assessment in clinical trials of patients with CNS tumors. J Clin Oncol. 10 Mart **2006**;24(8):1305–9.
- [59]. Li J, Bentzen SM, Renschler M, Mehta MP. Regression after whole-brain radiation therapy for brain metastases correlates with survival and improved neurocognitive function. J Clin Oncol. 01 Nisan **2007**;25(10):1260–6.
- [60]. Welzel G, Fleckenstein K, Schaefer J, Hermann B, Kraus-Tiefenbacher U, Mai SK, vd. Memory Function Before and After Whole Brain Radiotherapy in Patients With and Without Brain Metastases. Int J Radiat Oncol. 01 Aralık **2008**;72(5):1311–8.
- [61]. Chang EL, Wefel JS, Hess KR, Allen PK, Lang FF, Kornguth DG, vd. Neurocognition in patients with brain metastases treated with radiosurgery or radiosurgery plus whole-brain irradiation: a randomised controlled trial. Lancet Oncol. 01 Kasım **2009**;10(11):1037–44.
- [62]. Pariset E, Malkani S, Cekanaviciute E, Costes S V. Ionizing radiation-induced risks to the central nervous system and countermeasures in cellular and rodent models. Int J Radiat Biol, **2021**, 97(S1):S132–50.
- [63]. Peißner W, Kocher M, Treuer H, Gillardon F. Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. Mol Brain Res. 23 Temmuz **1999**;71(1):61–8.
- [64]. Collier TJ, Quirk GJ, Routtenberg A. Separable roles of hippocampal granule cells in forgetting and pyramidal cells in remembering spatial information. Brain Res. 21 Nisan **1987**;409(2):316–28.
- [65]. Fike JR, Rola R, Limoli CL. Radiation Response of Neural Precursor Cells. Neurosurg Clin, 01 Ocak **2007**, 18(1):115–27.

- [66]. Lee PWH, Hung BKM, Woo EKW, Tai PTH, Choi DTK. Effects of radiation therapy on neuropsychological functioning in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 01 Nisan **1989**, 52(4):488–92.
- [67]. Leung SF, Kreel L, Tsao SY. Asymptomatic temporal lobe injury after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: incidence and determinants. 28 Ocak **2014**, 65(776):710–4.
- [68]. Grattan-Smith PJ, Morris JGL, Shores EA, Batchelor J, Sparks RS. Neuropsychological abnormalities in patients with pituitary tumours. *Acta Neurol Scand*, 01 Aralık **1992**, 86(6):626–31.
- [69]. Sakata K-I, Aoki Y, Karasawa K, Nakagawa K, Hasezawa K, Muta N, vd. Analysis of the Results of Combined Therapy for Maxillary Carcinoma. 1993;2715–22.
- [70]. Nagai R, Tsunoda S, Hori Y, Asada H. Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. *Surg Neurol*. 01 Mayıs **2000**;53(5):503–7.
- [71]. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med*, 05 Ağustos **2002**, 8(9):955–62.
- [72]. Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR. Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of X-Irradiation 1. *CANCER Res*, **2003**, 63:4021–7. A
- [73]. Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, vd. Radiation-Induced Cognitive Impairments are Associated with Changes in Indicators of Hippocampal Neurogenesis. 01 Temmuz **2004**, 162(1):39–47.
- [74]. Lensu S, Waselius T, Mäkinen E, Kettunen H, Virtanen A, Tirola M, vd. Irradiation of the head reduces adult hippocampal neurogenesis and impairs spatial memory, but leaves overall health intact in rats. *Eur J Neurosci*, 01 Mart **2021**, 53(6):1885–904.
- [75]. Metzdorf J, Hobloss Z, Schlevogt S, Ayzenberg I, Stahlke S, Pedreiturria X, vd. Fingolimod for irradiation-induced neurodegeneration. *Front Neurosci*. **2019**;13(JUL):699.
- [76]. Liao G, Li R, Chen X, Zhang W, Du S, Yuan Y. Sodium valproate prevents radiation-induced injury in hippocampal neurons via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Neuroscience*. 07 Eylül **2016**;331:40–51.
- [77]. Zhang L, Huang P, Chen H, Tan W, Lu J, Liu W, vd. The inhibitory effect of minocycline on radiation-induced neuronal apoptosis via AMPK α 1 signaling-mediated autophagy. *Sci Reports*, 27 Kasım **2017**, 7(1):1–16.
- [78]. Lumniczky K, Szatmári T, Sáfrány G. Ionizing radiation-induced immune and inflammatory reactions in the brain. *Front Immunol*. 05 Mayıs **2017**;8(MAY):517.
- [79]. Ruddy RM, Morshead CM. Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell Tissue Res*, 01 Ocak **2018**, 371(1):125–41.
- [80]. Fabbri MR, Warshowsky KE, Zobel CL, Hallahan DE, Sharma GG. Molecular and epigenetic regulatory mechanisms of normal stem cell radiosensitivity. *Cell death Discov*, 01 Aralık **2018**, 4(1). A
- [81]. Pacelli R, Mansi L, Eric Hall and Amato J. Giaccia: Radiobiology for the radiologist, 6th edn. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 24 Mart **2007**, 34(6):965–6.

- [82]. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother.* 01 Nisan **2020**;124:109821.
- [83]. Jagodinsky JC, Harari PM, Morris ZS. The Promise of Combining Radiation Therapy with Immunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*,09 Eylül **2020**,108(1):6.
- [84]. Huguet F, Durand B, Atallah S, Prébet C, Richard S, Baujat B. Combination of radiation therapy-immunotherapy for head and neck cancers: Promises kept? *Cancer Radiothérapie* 01 Aralık **2021** ,25(8):811-5.
- [85]. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 25 Mart **2011**,331(6024):1565-70.
- [86]. Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin*,Mart **2020** ,70(2):86-104.
- [87]. Wang C, Cai X, Hu W, Li Z, Kong F, Chen X, vd. Investigation of the neuroprotective effects of crocin via antioxidant activities in HT22 cells and in mice with Alzheimer's disease. *Int J Mol Med*,01 Şubat **2019**,43(2):956.
- [88]. Park JS, Park JH, Kim KY. Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. *RSC Adv*, 01 Ekim **2019**,9(54):31247-54.
- [89]. Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res*,25 Temmuz **1994** , 652(1):169-73.
- [90]. Morimoto BH, Koshland DE. Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron*. 01 Aralık **1990**;5(6):875-80.
- [91]. Huang Y, Mei X, Jiang W, Zhao H, Yan Z, Zhang H, vd. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Protects Hippocampal Neurons From Radiation Damage by Suppressing Oxidative Stress and Apoptosis. *Dose-Response*,**2021**,19(1).
- [92]. Liao G, Zhao Z, Yang H, Li X. Honokiol ameliorates radiation-induced brain injury via the activation of SIRT3. *J Int Med Res*,20 Ekim **2020**,48(10):1-11.
- [93]. Zhao DY, Jacobs KM, Hallahan DE, Thotala D. Silencing Egr1 attenuates radiation-induced apoptosis in normal tissues while killing cancer cells and delaying tumor growth. *Mol Cancer Ther*, 01 Ekim **2015**,14(10):2343-52.
- [94]. Kempf SJ, Buratovic S, Von Toerne C, Moertl S, Stenerlö B, Hauck SM, vd. Ionising Radiation Immediately Impairs Synaptic Plasticity-Associated Cytoskeletal Signalling Pathways in HT22 Cells and in Mouse Brain: An In Vitro/In Vivo Comparison Study. **2014**. <http://uniprot.org>
- [95]. Thotala DK, Hallahan DE, Yazlovitskaya EM. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitors protect hippocampal neurons from radiation-induced apoptosis by regulating MDM2-p53 pathway. *Cell Death Differ*, **2012**,19(3):387-96.
- [96]. Yang ES, Nowsheen S, Wang T, Thotala DK, Xia F. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition enhances repair of DNA double-strand breaks in irradiated hippocampal neurons. *Neuro Oncol*, 01 Mayıs **2011**,13(5):459-70.

- [97]. Kobayashi A, Kang M-I, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, vd. Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol*, Ocak **2006**, 26(1):221.
- [98]. Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol*, 01 Mayıs **2019**, 23:101107.
- [99]. Parga JA, Rodriguez-Perez AI, Garcia-Garrote M, Rodriguez-Pallares J, Labandeira-Garcia JL. NRF2 Activation and Downstream Effects: Focus on Parkinson's Disease and Brain Angiotensin. *Antioxidants*, **2021**, 10(11):1649.
- [100]. Davies DA, Adlimoghaddam A, Albensi BC. Role of Nrf2 in Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer's Disease. *Cells*, **2021**, 10(8):1884.
- [101]. Cameron BD, Sekhar KR, Ofori M, Freeman ML. The Role of Nrf2 in the Response to Normal Tissue Radiation Injury, 01 Ağustos **2018**, 190(2):99–106.
- [102]. Root J, Merino P, Nuckols A, Johnson M, Kukar T. Lysosome dysfunction as a cause of neurodegenerative diseases: Lessons from frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 01 Temmuz **2021**;154:105360.
- [103]. Holler CJ, Taylor G, Deng Q, Kukar T. Intracellular Proteolysis of Progranulin Generates Stable, Lysosomal Granulins that Are Haploinsufficient in Patients with Frontotemporal Dementia Caused by GRN Mutations. *eNeuro*, 01 Temmuz **2017**, 4(4):100–17.
- [104]. Brady OA, Zheng Y, Murphy K, Huang M, Hu F. The frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, regulates lysosomal morphology and function. *Hum Mol Genet*, 15 Şubat **2013**, 22(4):685–95.
- [105]. Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, vd. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. *Hum Mol Genet*, 01 Mart **2017**, 26(5):969–88.
- [106]. Mackenzie IRA, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem*, 01 Ağustos **2016**, 138:54–70.
- [107]. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron*. 07 Ağustos **2013**;79(3):416–38.
- [108]. Rhinn H, Tatton N, McCaughey S, Kurnellas M, Rosenthal A. Progranulin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 15 Ocak **2022**.
- [109]. Colucci-D'amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci* **2020**, 21(20):7777.
- [110]. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 01 Ocak **2014**, 76(PART C):639–56.
- [111]. Chen S Der, Wu CL, Hwang WC, Yang DI. More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *Int J Mol Sci*, **2017**, 18(3):545.

- [112]. Björkholm C, Monteggia LM. BDNF – a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 01 Mart **2016**,102:72–9.
- [113]. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson’s Disease. *Int J Mol Sci*,01 Şubat **2020**, 21(3).
- [114]. Zhang J, Yao W, Hashimoto K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Curr Neuropharmacol*, 20 Ocak **2016**,14(7):721.
- [115]. DUSP22 dual specificity phosphatase 22 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [kaynak 21 Ekim 2022]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56940>
- [116]. Ge C, Tan J, Dai X, Kuang Q, Zhong S, Lai L, vd. Hepatocyte phosphatase DUSP22 mitigates NASH-HCC progression by targeting FAK. *Nat Commun*,08 Ekim **2022**,13(1):5945.
- [117]. Wang M, Kibbi N, Ring N, Siddon A, Foss F, Totonchy M. DUSP22-IRF4 rearrangement in AIDS-associated ALK-negative anaplastic large cell lymphoma. *BMJ Case Rep*, 01 Eylül **2019**,12(9).
- [118]. Zhao XD, Huang C, Wang RX, Wang SA. DUSP22 promotes senescence of HS-1 skin cancer cells through triggering MAPK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **2018**,22(22):7819–25.
- [119]. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 27 Temmuz **2017**,130(4):410–23.
- [120]. Smeyers J, Banchi EG, Latouche M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front Cell Neurosci*. 05 Mayıs **2021**;15:109.
- [121]. Rizzu P, Blauwendraat C, Heetveld S, Lynes EM, Castillo-Lizardo M, Dhingra A, vd. C9orf72 is differentially expressed in the central nervous system and myeloid cells and consistently reduced in C9orf72, MAPT and GRN mutation carriers. *Acta Neuropathol Commun*, 14 Nisan **2016**,4(1):37.
- [122]. Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, vd. The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nat Neurosci*, 03 Kasım **2013**,16(12):1725–7.,
- [123]. Braems E, Swinnen B, Van Den Bosch L. C9orf72 loss-of-function: a trivial, stand-alone or additive mechanism in C9 ALS/FTD? *Acta Neuropathol*, 01 Kasım **2020**,140(5):625.
- [124]. Sivadasan R, Hornburg D, Drepper C, Frank N, Jablonka S, Hansel A, vd. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat Neurosci*, 10 Ekim **2016**,19(12):1610–8.
- [125]. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, vd. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*, 01 Temmuz **2014**,23(13):3579–95.
- [126]. Beckers J, Tharkeshwar AK, Van Damme P. C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels. *Autophagy*, **2021**, 17(11):3306.

- [127]. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Bystander effects of ionizing radiation: Conditioned media from X-ray irradiated MCF-7 cells increases the angiogenic ability of endothelial cells. *Cell Commun Signal* [Internet]. 16 Aralık **2019**, 17(1):1–12.
- [128]. Wood CR, Juárez EH, Ferrini F, Myint P, Innes J, Lossi L, vd. Mesenchymal stem cell conditioned medium increases glial reactivity and decreases neuronal survival in spinal cord slice cultures. *Biochem Biophys Reports*. 01 Temmuz **2021**;26:100976.
- [129]. Jonakait GM, Luskin MB, Wei R, Tian XF, Ni L. Conditioned Medium from Activated Microglia Promotes Cholinergic Differentiation in the Basal Forebrain in Vitro. *Dev Biol*. 10 Temmuz **1996**;177(1):85–95.
- [130]. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. Aralık **2006**;1(5):2315–9.
- [131]. Puck TT, Marcus PI. Action of X-Rays on Mammalian Cells, *J Exp Med*, **1956**, 103(5):653–66.
- [132]. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, **1961**, 14:213–22.
- [133]. Kirsch DG, Diehn M, Kesarwala AH, Maity A, Morgan MA, Schwarz JK, vd. The future of radiobiology. C. 110, *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press; **2018**.
- [134]. Thotala DK, Hallahan DE, Yazlovitskaya EM. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3B Attenuates Neurocognitive Dysfunction Resulting from Cranial Irradiation. **2008**. <http://cancerres.aacrjournals.org/>
- [135]. Head T, Dau P, Duffort S, Daftarian P, Joshi PM, Vazquez-Padron R, vd. An enhanced bioluminescence-based Annexin V probe for apoptosis detection in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*, **2017**, 8(5):e2826.
- [136]. Brauchle E, Thude S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci Rep*, **2014**, 4.
- [137]. Batu Öztürk A, Can Öztürk N, Ayaz F. Conditioned media of mouse macrophages modulates neuronal dynamics in mouse hippocampal cells. *Int Immunopharmacol*, 01 Ocak **2023**;114:109548.
- [138]. Singh RP, Shiue K, Schomberg D, Zhou FC. Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell Transplant*, 01 Ekim **2009**, 18(10–11):1197–211.
- [139]. Augustinack JC, van der Kouwe AJW, Salat DH, Benner T, Stevens AA, Annese J, vd. H.M.'s contributions to neuroscience: A review and autopsy studies. *Hippocampus*, 01 Kasım **2014**, 24(11):1267–86.
- [140]. Makale MT, McDonald CR, Hattangadi-Gluth JA, Kesari S. Brain irradiation and long-term cognitive disability: Current concepts. *Nat Rev Neurol*, 28 Aralık **2017**, 13(1):52.
- [141]. Davis CM, Roma PG, Armour E, Gooden VL, Brady J V., Weed MR, vd. Effects of X-ray radiation on complex visual discrimination learning and social recognition memory in rats. *PLoS One*, 06 Ağustos **2014**, 9(8).

- [142]. Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, Shaw EG, Wheeler KT, Chan MD. Radiation-induced brain injury: A review., *Front Oncol*, 2012, 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833841/>
- [143]. Cherrie JW, Howie RM, Semple S. Monitoring for Health Hazards at Work: Fourth Edition. *Monitoring for Health Hazards at Work: Fourth Edition*. **2010**.
- [144]. Ribeiro A, Husson O, Drey N, Murray I, May K, Thurston J, vd. Ionising radiation exposure from medical imaging – A review of Patient's (un) awareness. *Radiography*. 01 Mayıs **2020**;26(2):e25–30.
- [145]. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 06 Aralık **2003**;302(5651):1760–5.
- [146]. Rooney JW, Laack NN. Pharmacological interventions to treat or prevent neurocognitive decline after brain radiation. 16 Aralık **2013**, 2(6):531–41.
- [147]. Gianfaldoni S, Gianfaldoni R, Wollina U, Lotti J, Tchernev G, Lotti T. An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology. *Open Access Maced J Med Sci*, 07 Temmuz **2017**, 5(4):521.
- [148]. Huh H Do, Kim S. History of Radiation Therapy Technology. *Korean Soc Med Phys*, 30 Eylül **2020**, 31(3):124–34.
- [149]. Ward JF. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 01 Ocak **1988**;35(C):95–125.
- [150]. Lumniczky K, Szatmári T, Sáfrány G. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol*, 05 Mayıs **2017**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529513/>
- [151]. Sharma NK, Stone S, Kumar VP, Biswas S, Aghdam SY, Holmes-Hampton GP, vd. Mitochondrial Degeneration and Autophagy Associated With Delayed Effects of Radiation in the Mouse Brain. *Front Aging Neurosci*. 20 Aralık **2019**;11:357.
- [152]. Fernandez-Gil B, Abdel Moneim AE, Ortiz F, Shen YQ, Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, vd. Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. *PLoS One*. 01 Nisan **2017**;12(4).
- [153]. Li X, Zhuang X, Qiao T. Role of ferroptosis in the process of acute radiation-induced lung injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 05 Kasım **2019**;519(2):240–5.
- [154]. Freyter BM, Abd Al-Razaq MA, Isermann A, Dietz A, Azimzadeh O, Hekking L, vd. Nuclear Fragility in Radiation-Induced Senescence: Blebs and Tubes Visualized by 3D Electron Microscopy. *Cells*, 01 Ocak **2022**, 11(2):273.
- [155]. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A, Ellinger A, Gruber F, Narzt MS, vd. Analysis of the Secretome of Apoptotic Peripheral Blood Mononuclear Cells: Impact of Released Proteins and Exosomes for Tissue Regeneration. *Sci Reports*, 16 Kasım **2015**, 5(1):1–18.
- [156]. Trybus W, Król T, Trybus E, Stachurska A, Król G, Kopacz-Bednarska A. Emodin Induces Death in Human Cervical Cancer Cells Through Mitotic Catastrophe. *Anticancer Res*, 01

Şubat **2019**,39(2):679–86.

- [157]. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 29 Nisan **2011**,12(6):385–92.
- [158]. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 11 Nisan **2008** ,15(7):1153–62.
- [159]. Huang X, Tran T, Zhang L, Hatcher R, Zhang P. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci*, 25 Ocak **2005**,102(4):1065–70.
- [160]. Syaifudin M, Defiyandra V, Nurhayati S, Purnami S, Pudjadi E. Micronucleus Assay-based Evaluation of Radiosensitivity of Lymphocytes among Inhabitants Living in High Background Radiation Area of Mamuju, West Sulawesi, Indonesia. *Genome Integr*, 31 Mayıs **2018**,9(1).
- [161]. Kanagaraj K, Raavi V, Visweswaran S, Selvan TG, Dhanashekar S, Perumal V. Technical note on cytokinesis-arrested binucleated cell and micronucleus assay. *J Radiat Cancer Res*,**2017**,8(4):180.
- [162]. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci*,24 Şubat **2020** ,21(4):1534.
- [163]. Perumal V, Sekaran TSG, Raavi V, Basheerudeen SAS, Kanagaraj K, Chowdhury AR, vd. Radiation signature on exposed cells: Relevance in dose estimation. *World J Radiol*, **2015**,7(9):266.
- [164]. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee C-W, Pang B, Borenshtein D, vd. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest*, 01 Temmuz **2008**,118(7):2516–25.
- [165]. Gabryś D, Greco O, Patel G, Prise KM, Tozer GM, Kanthou C. Radiation Effects on the Cytoskeleton of Endothelial Cells and Endothelial Monolayer Permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 01 Aralık **2007**;69(5):1553–62.
- [166]. Brayford S, Schevzov G, Vos J, Gunning P. The role of the actin cytoskeleton in cancer and its potential use as a therapeutic target. İçinde: *The Cytoskeleton in Health and Disease*. Springer New York; **2015**. s. 373–91.
- [167]. Imaizumi H, Sato K, Nishihara A, Minami K, Koizumi M, Matsuura N, vd. X-ray-enhanced cancer cell migration requires the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex. *Cancer Sci*. 01 Nisan **2018**;109(4):1158–65.
- [168]. Malacrida A, Meregalli C, Rodriguez-Menendez V, Nicolini G. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and changes in cytoskeleton. C. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; **2019**.
- [169]. Xie J, Minc N. Cytoskeleton Force Exertion in Bulk Cytoplasm. C. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; **2020**.
- [170]. Huang Q, Chai H, Wang S, Sun Y, Xu W. 0.5-Gy X-ray irradiation induces reorganization of cytoskeleton and differentiation of osteoblasts. *Mol Med Rep*. 01 Mayıs **2021**;23(5).

- [171]. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, vd. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. Clin Transl Oncol, 01 Mayıs **2018**,20(5):570-5.
- [172]. Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. J Biol Chem. 13 Ekim **2017**;292(41):16817-24.
- [173]. Yoshino H, Murakami K, Nawamaki M, Kashiwakura I. Effects of Nrf2 knockdown on the properties of irradiated cell conditioned medium from A549 human lung cancer cells. Biomed Reports, 01 Mayıs **2018**, 8(5):461-5.
- [174]. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, Van Swieten J, vd. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. J Cell Biol, 07 Nisan **2008**,181(1):37-41.
- [175]. Li X, Wolf ME. Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. Behav Brain Res. 15 Şubat **2015**;279:240-54.
- [176]. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. Mol Neurobiol, 17 Ağustos **2018**,56(5):3295-312.
- [177]. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and Autocrine Functions of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Nerve Growth Factor (NGF) in Brain-derived Endothelial Cells. J Biol Chem. 06 Ağustos **2004**;279(32):33538-46.
- [178]. Webster CP, Smith EF, Bauer CS, Moller A, Hautbergue GM, Ferraiuolo L, vd. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. EMBO J, Ağustos **2016**, 35(15):1656-76.
- [179]. Leskelä S, Huber N, Rostalski H, Natunen T, Remes AM, Takalo M, vd. C9orf72 Proteins Regulate Autophagy and Undergo Autophagosomal or Proteasomal Degradation in a Cell Type-Dependent Manner. Cells,10 Ekim **2019**,8(10):1233.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : AYL A BATU ÖZTÜRK

Doğum Tarihi :

E-mail

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Mersin Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2017
Doktora	Histoloji ve Embriyoloji	Mersin Üniversitesi	Devam ediyor

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl
Öğretim Görevlisi (uygulamalı birim)	Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2019- Devam ediyor

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

Makaleler

- BATU ÖZTÜRK A., ÖZTÜRK N. C., AYAZ F.** Conditioned media of mouse macrophages modulates neuronal dynamics in mouse hippocampal cells, *INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY*, **2023**, 114, 109548. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109548>.
- AK, B.; EROĞLU, E.; ERTUĞRUL, A.; BATU ÖZTÜRK, A.; YILMAZ, Ş. N.** Non-Destructive Removal of Dental Implant by Using the Cryogenic Method. *MEDICINA*, **2022**, 58, 849-867.
- AKTAŞ, S.; ÜN, İ.; BARLAS, İ.; BATU ÖZTÜRK, A.; KARAGÜL, M.** Evaluation of the Rho A/Rho-kinase pathway in the uterus of the rat model of polycystic ovary syndrome. *REPRODUCTIVE BIOLOGY*, **2019**, 19, 45-54.
- KARAGÜL, M.; BATU, A.; AKTAŞ, S.; ÖZKAYA, T.; AKAR, A.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü.; OVLA, D.** Subkronik 1800 MHz elektromanyetik alan uygulanmasının sıçan tuba uterina ampullası üzerine etkileri. *MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ*, **2017**, 10, 1-13.

Bildiriler

- Olbert, M.; Lipkowska, A.; Batu, A.; Librowski, T.; Gdula-Argasińska, J.** Anti-inflammatory properties of zinc nanoparticles in RAW 264.7 cells activated with LPS. The XXV International Symposium "Molecular nad Physiological Aspects of Regulatory Processes in the Organism, 2016-09-04, 2016-09-07, Krakow, Polonya, **2016**.
- Gdula-Argasińska, J.; Czepiel, J.; Toton-Żurańska, J.; Wołkow, P.; Perucki, W.; Batu, A.; Librowski, T.** PAHs and fatty acids interactions in the in vitro models. The XXV International Symposium Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processesin the Organism, Krakow, Polonya, 04-07.09. **2016**.

3. Gdula-Argasińska, J.; Woźniakiewicz, A.; Woźniakiewicz, M.; Librowski, T.; Czepiel, J.; **Batu, A.**, Resolvins D1 and D2 improve protective role of EPA in RAW 264.7 cells. The IVXX Internal Symposium Molecular and Physiological Aspects of the Regulatory Processes of the Organism, 2015-09-01, 2015-09-04, Krakow, Polonya, **2015**.

Ödül(ler)

1. Poster Presentation on the topic of "Imaging of the zinc finger transcription factors during neurogenesis" Jagiellonian University, Biophysics Students Association, IV International Conference of Biophysics Students, Krakow, Polonya, 24.05.**2015**. (poster 3.lük ödülü).

