

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

RADYOAKTİF İYOT 131 UYGULAMA SONRASI RADYASYONLA
İNDÜKLENMİŞ MİDE DOKU HASARINDA p53 TÜMÖR SUPRESÖR GENİ
ROLÜNÜN REAL TIME PCR VE HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERLE ORTAYA
KONULMASI

Emrah UĞURELLİ

HAZİRAN 2018

Biyoloji Anabilim Dalında Emrah UĞURELLİ tarafından hazırlanan RADYOAKTİF İYOT 131 UYGULAMA SONRASI RADYASYONLA İNDÜKLENMİŞ MİDE DOKU HASARINDA p53 TÜMÖR SUPRESÖR GENİ ROLÜNÜN REAL TIME PCR VE HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERLE ORTAYA KONULMASI adlı Yüksek Lisans tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi F. Azize BUDAK YILDIRAN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr. Mustafa TÜRK:

Üye (Danışman): Dr. Öğr. Üyesi F. Azize BUDAK YILDIRAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tarkan YORULMAZ

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

RADYOAKTİF İYOT 131 UYGULAMA SONRASI RADYASYONLA İNDÜKLENMİŞ MİDE DOKU HASARINDA p53 TÜMÖR SUPRESÖR GENİ ROLÜNÜN REAL TIME PCR VE HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERLE ORTAYA KONULMASI

UĞURELLİ Emrah

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi F. Azize BUDAK YILDIRAN

Haziran 2018, 51 sayfa

Amaç: Bu çalışmada radyoaktif iyot (I^{131}) uygulanan ratlarda, I^{131} 'in etkilerinin ve p53 geninin ifadesinin belli zaman süreçleri (4. saat, 24. Saat, 48. Saat, 7. gün ve 30. gün) için değerlendirilmesi amaçlandı.

Metod: Bu araştırmada 24 Wistar rat kullanıldı. Kontrol ve herbir zaman dilimi için 4'er örneklik gruplar oluşturuldu. Örneklerin histopatolojik incelemesi yapıldı. Ayrıca Real-time PCR'da genin ifadesi gruplar açısından analiz edildi ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Histopatolojik analizde semikantitatif skorlama veri analizine göre en fazla dejenerasyon 4. saatte gözlenirken en az dejenerasyon 24. saatte gözlemlendi. Real-time PCR sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde, gen ifadesinin en az olan grubun 4. Saat olduğu belirlendi. P53'ün ifadesinin en fazla olduğu grup ise 24. Saat olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmada histopatolojik değerlendirme ve Real-time PCR analizi sonuçları genel olarak uyumlu bulundu. P53 geninin ifadesinin en fazla olduğu süreçte, histolojik olarak dejenerasyonun en az olduğu belirlendi. Bilindiği gibi p53 geni

DNA hasarlarında öncül yanıt mekanizması olarak devreye girer. Bu genin cevabı ya hücrede tamir mekanizması devreye girer ya da hücre apoptozise yönlendirilir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; I ¹³¹ ‘in yarılanma süresi dikkate alındığında 16 saat içinde en fazla dejenerasyona neden olduğu, daha sonra p53 geninin aktifleşmesi ile tamir mekanizmasının devreye girdiği söylenebilir. P53 gen ifadesi radyasyonik ajanların dejeneratif etkisini en aza indirdiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: I-131, p53, tiroit, mide, radyoaktif iyot tedavi, real time PCR



ABSTRACT

RADYOAKTİF İYOT 131 UYGULAMA SONRASI RADYASYONLA İNDÜKLENMİŞ MİDE DOKU HASARINDA p53 TÜMÖR SUPRESÖR GENİ ROLÜNÜN REAL TIME PCR VE HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERLE ORTAYA KONULMASI

UĞURELLİ Emrah

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Dr.Öğr. Üyesi Fatma Azize BUDAK YILDIRAN

June 2018, 51 pages

Objectives: This study aims to the effects of I 131 and the expression of the p53 gene are determined for certain time periods (4 h, 24 h, 48 h, 7 day and 30 day) in the radioactive iodine (I 131) applied rats.

Metod: In this research were used twentyfour Wistar rats. Groups of 4 samples were created for control and each time. Histopathological examination of the samples was performed. It was also analyzed the gene expression by Real-time PCR for the groups and statistically assessed.

Findings: According to semiquantitative scoring data in histopathological analysis was observed, the most degeneration at the 4th hour and the least degeneration was observed at the 24th hour. The data obtained from Real-time PCR were evaluated, it was determined that the minimum group of gene expression was 4th hour. The group that the highest expression of P53 was observed at 24 hours.

Results: In the study were found as histopathological evaluation and Real-time PCR analysis are generally compatible. It was determined that the histologically degeneration was the least in the process in which the expression of the P53 gene

was the highest. As is known, p53 gene acts as a premise response mechanism in DNA damages. This genetic response is either driven by the repair mechanism in the cell, or the cell is directed to apoptosis. When the obtained data are evaluated; Considering the half-life of I 131, it can be said that the most degeneration occurred within 16 hours, and then the activation mechanism of the p53 gene and the repair mechanisms was acted in the cell. It is thought that P53 genes reduce degenerative effects of radiation agents at the least.

Keywords: I-131, p53, thyroid, stomach, radioactive iodine treatment real time PCR



TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezimin başında sonuna kadar her zaman yanımda desteğini esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi F. Azize BUDAK YILDIRAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Ankara Hastanesi Nükleer Tıp Kliniği İdari ve Eğitim Birim Sorumlusu olan hocam Prof. Dr. Meliha KORKMAZ'a her zaman yanımda olduğu ve verdiği desteklerde dolayı teşekkür ederim. Biricik ailem canım anne, babam abim, yengem ve yeğenim Yağmur'umuza ayrı ayrı verdikleri manevi destekler ve yanımda oldukları için teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>SAYFA NO</u>
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMLAR.....	4
2.1. Radyoaktif iyot	4
2.1.1. Beta Partikülleri	4
2.1.2. Gama Işını	5
2.2. Radyoaktif İyot Tedavisi (RIT)	5
2.2.1. İyot 131 Dozunun Hesaplanması	5
2.3. Radyoaktif İyot Tedavi Sonrası Oluşan Komplikasyonlar.....	7
2.4. Onkogenler ve Epigenetik Değişiklikler	9
2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar	9
2.4.1.1. Erken K-ras mutasyonları	10
2.4.1.2. LOH (Heterozigotluk Kaybı).....	10
2.4.1.3. APC (Adenomatöz polipozis koli) Mutasyonları	10
2.4.1.4. Hücre Siklus Düzenleyici Moleküller.....	11
2.4.1.5. miRNA (micro RNA)	11
2.4.2. Tümör Süpresör Genler.....	11
2.4.2.1. TP53 Geni	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Örneklerin Elde Edilmesi	18
3.2. Örneklerin Histopatolojik Analizi	18
3.2.1. Örneklerin Histopatolojik İncelemeler İçin Hazırlanması	18
3.2.2. Örneklerin Histopatolojik İncelenmesi	18

3.3. Örneklerin Real Time PCR ile Analizi.....	20
3.3.1. Örneklerden mRNA İzolasyonu:	20
3.3.2. RNA örneklerinden cDNA sentezi:	21
3.3.4. Real Time PCR	22
3.3.5. Real Time PCR verilerinin İstatistiksel Analizi:.....	23
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	24
5. KAYNAKLAR	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
2.1: Radyoaktif iyot (I-131) molekülünün bozunumu.....	4
2.2: Oluşan DNA hasarı sonucu p53'ün aktive edilmesi ile meydana gelen durumlar belirtilmektedir. [76-78]	16
2.3: Hücre içerisinde apoptozis düreci (Ulukaya., 2003)	17
4.4: Mide dokusu, Kontrol Grubu (Grup1), Hematoksilen eozin boyama,	24
4.5: Mide submukozasında yaygın ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu, Grup 2, Hematoksilen eozin boyama, x120.	25
4.6: Mide propriya mukoza katında yangısal hücre infiltrasyonu ve submukozal ödem, Grup 2, Hematoksilen eozin boyama, x80	25
4.7: Lamina epitelyaliste dejenerasyon ve nekrotik değişiklikler, propriyal bezlerde hiperplazi ve rejeneratif faaliyet. Grup 4 Hematoksilen eozin boyama, x80	26
4.8: Mide mukozası propriyal bezlerde dejenerasyon ve bez epitellerinde yer yer nekrotik değişiklikler gözlenmekte. Grup5, Hematoksilen eozin boyama,x240. 26	
4.9: Mukoza yüzey epiteli ve propriyal bezlere kadar uzanan epitel hücrelerinde nekroz. Grup4, Hematoksilen eozin boyama, x240	27
4.10: Propriyal bezler arasına yayılım gösteren çoğunlukla mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ödem. Grup 6, Hematoksilen eozin boyama, x240	27
4.11: Histopatoloji analiz grafiği	29
4.12: p53 geni için relative value değerleri bakımından grupların karşılaştırmalı grafiği	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Mide bulgularının histopatolojik skrolama kriterleri	19
Çizelge 2: Örneklerden cDNA sentezi için kullanılan bileşenlerin miktarları	21
Çizelge 3: Real Time PCR cihazında uygulanan program koşulları	23
Çizelge 4: Histopatolojik Değerlendirme ve Semikantitatif Skrolama Sonuçları	28
Çizelge 5: p53 geni için Mann Whitney U test ile grupların karşılaştırmalı matriks değerleri.....	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Hbp	: Helikobakter pilori
CDKN1B	: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B
CagA	: 125-145 kDa büyüklüğünde protein
APC	: Adenomatöz polipozis koli
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
I-131	: İyot 131
RIT	: Radyoaktif İyot Tedavisi
miRNA	: Mikro RNA
μCi	: Microcurie

1. GİRİŞ

Radyoaktif iyot (I-131), besinlerle alınan iyodun radyoaktif şeklidir. Sodyum iyodür (I-131) oral çözelti teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan radyofarmasötik bir ilaçtır. Sodyum İyodür vücutta tiroit tarafından tutulur, beta ve gama ışınları yayar. Bu özelliklerinden dolayı nükleer tıpta tiroid bezinin çeşitli hastalıklarının tanısında kullanılırken, tiroid kanseri, toksik nodüler guatr ve toksik diffüz guatr için de tedavi amacı ile kullanılmaktadır. (1,2)

İyot-131 molekülünün fiziksel yarılanma ömrü 8,04 gündür. Beta partikülleri ve gama radyasyonu olarak parçalanır ve parçalanma sırasında ortaya 971 keV enerji açığa çıkar. Bu enerjinin 607 keV'u beta ışıması yapar, geriye kalan enerji (364 keV) ise uyarılmış X-131 çekirdeğinin bazal enerji seviyesine yönelirken gama ışıması olarak salınım gösterir. (3)

Tedavide ağız yolundan kapsül ya da sıvı olarak verilen radyoaktif iyot, sindirim sisteminden emilerek tiroid bezi (guatr) hücrelerinde toplanır ve beta partikülleri aracılığı ile folikül hücrelerini tahrip ederek yaydığı radyasyon ile tiroid hücrelerinin büyümesini ve faaliyetini durdurur. Bu tedavi de amaç, hedef hücrelerde radyasyon etkisine bağlı sitotoksik etki (hücre ölümü) oluşturulurken, hedef hücreleri çevreleyen dokularda hücre hasarını mümkün olan en az seviyede tutmak ve vücudun geri kalan kısımlarını radyasyonun zararlı etkilerinden korumaktır. Fakat, normal biyodağılımı tükürük bezlerine, mideye ve üriner sisteminde etkili olduğundan dolayı tedavi sırasında bu organlar da radyasyon almaktadırlar. (4, 5)

Radyasyonun normal dokuyla etkileşme süresine ve maruz kalınan doza bağlı olarak erken ve geç dönem yan etkiler oluşmaktadır. Bu yan etkilerden en sık gözlenen etki mide doku hasarına bağlı gelişen yan etkilerdir. Nadalud ve ark. yaptığı bir çalışmada 0.5 Gy'lik X-ışınına maruz bırakılan sıçanlara ait mide dokuları incelendiğinde; mide epitel hücrelerinin dejenere olduğu, epitel bütünlüğünde bozulmaların meydana geldiği, yüzey örtü epitel hücrelerinde kayıplar olduğu, mukozanın altında yerleşim gösteren mide bezlerinin dilatasyona uğradığı, bez hücrelerinin düzensiz yerleşim

gösterdikleri, aralarında hemorajik odakların bulunduğu, submukozada yer yer hemorajik alanlar, lamina propriada ise hücre infiltrasyon alanları gözlemlendiği bildirilmiştir. (6)

Midede akut dönemde meydana gelen radyasyonik hasarın; ülserasyon, atrofik gastritis, mide asit sekresyonunda azalma ile karakterize olduğunu ifade edilmektedir. Kronik dönemde oluşan radyasyon hasarı ise dispepsi, gastrit ve ülserasyon ile karakterize edildiği, yüksek dozda X ışını verildiğinde, sıçanların mide yüzeyinin tümünün fibrin tabaka ile kaplandığı bildirilmektedir. Ayrıca submukozada ödem, lamina propriada inflamasyon, keratinleşmede artış, epitelde erozyon, yüzey ve boyun mukus hücrelerinde bozulmalar, pariyetal ve esas hücrelerde dejenerasyon belirlenmiştir. (7, 8, 9, 10)

Yüksek doza maruz kalındığında, DNA zinciri üzerinde onarılması mümkün olmayan kırıklar oluşturarak hücre ölümüne yol açarken düşük dozajda hücre bölünmesini duraklatır. Doz arttıkça bölünmenin başlama zamanı uzar, mitoz sayısı azalır, anormal mitoz şekilleri ve dejenere hücreler ortaya çıktığı belirtilmektedir. Gama radyasyonu gibi iyonize radyasyon formlarının DNA' da çeşitli hasarlar meydana getirdiği bilinmektedir ve bu hasarlara karşı öncül yanıtın p53 aracılı yollarla verildiği bilinmektedir. (11, 12)

Gama radyasyonunun dozuna bağlı olarak p53 aktivitelerindeki değişikliklerin yanında hücre döngüsü kontrol noktalarında da farklı dozlarda farklı yanıtlar oluşmaktadır. Hücreler radyasyona maruz kaldıklarında öncelikle G1/S safhasında engellenirler ve radyasyon dozuna ve hasar miktarına göre bu safhadan sonra hücrenin ne yapacağına karar verilir. Eğer radyasyon dozu düşük ve hasar tamir edilebilecek düzeydeyse hasarın tipine göre ilgili tamir mekanizmaları devreye girer ve DNA' daki hasar tamir edildikten sonra hücrenin tekrar döngüye girmesi sağlanır. Bunun tersine hücre yüksek doz bir radyasyon dozuna maruz kaldıysa, G1 engelinde bekledikten sonra genellikle bu safhada kalıcı bir hücre siklus engeline girer ve senesensi takiben apoptozis gerçekleştirilir ya da hasarlı hücrenin direk eliminasyonu için programlı hücre ölümü ile ilgili yollar uyarılarak hücrenin ölümü hızlı bir şekilde gerçekleştirilir. Hücrelerde ve özellikle DNA' daki hasarlar karşısında

hücrede, yanıtta sorumlu olan başlıca molekülün p53 olduğu bilinmektedir ancak yeni çalışmalarla birlikte yukarıda bahsedilen yolların p53' den bağımsız olarak da uyarıldığını belirten çalışmalar bulunmaktadır. (13, 14, 15, 16, 17)

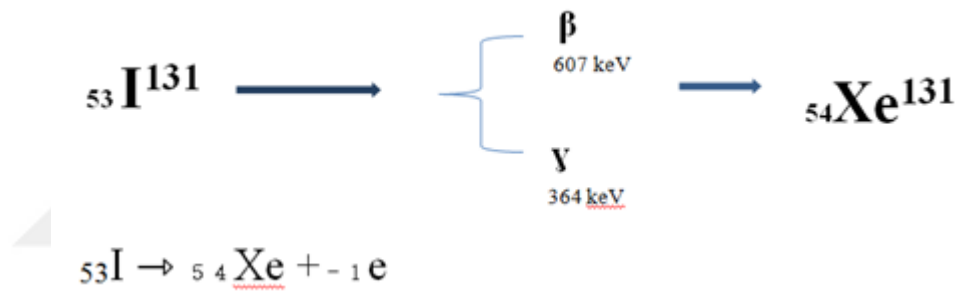
Tedavide kullanılan iyot-131 maddesi vücuda alınırken belirli yollardan geçerek alınır. Oral yolla vücuda giren madde ilk olarak midede toplanır. Bu çalışmada iyot-131 maddesinin midede DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını tümör süpresör protein olan p53 'ün aktivitesinin artarak, hücreyi apoptoza götürüp götürmediği moleküler ve histokimyasal olarak incelemeler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAVRAMLAR

2.1. Radyoaktif iyot

Radyoaktif iyot, sağlıkta başlıca hipertiroidizimin ve tiroid kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. İyot 131, bilim adamları Glenn T. Seaborg ve John Livingood tarafından 1938’ de Kaliforniya Üniversitesinde keşfedildi. 1946’ da ilk kez tiroid kanseri tedavisinde kullanıldı. I-131, iyotun bilinen 37 izotopu bulunmaktadır. Bu izotopların kütle numaraları 108 - 144 arasında değişmekte olup yalnızca I-127 izotopu radyoaktif değildir. Yarılanma süresi 8,040 gündür. I-131 beta partikülleri ve gama radyasyonu olarak bozunuma uğrar [18].



2.1: Radyoaktif iyot (I-131) molekülünün bozunumu

2.1.1. Beta Partikülleri

I-131 ve izotopları pozitif ya da negatif beta bozunumuna uğrarlar.

- Negatif beta bozunum (β^-): $n \rightarrow p + e$
- Pozitif beta bozunum (β^+): $p \rightarrow n + e$

Bozunum sonrası açığa çıkan elektron β parçacığı olarak bilinir. I-131 β^- bozunumu yapar. Bozunumundan açığa çıkan enerji 610 keV’dir. β partikülünün ortalama enerjisi yaklaşık 192 keV’dir. Dokuda aldığı yol 0,8 mm’dir. I-131 in bozunumu ile meydana gelen beta partikülleri tedavi amaçlı kullanılmaktadır [19].

2.1.2. Gama Işını

Gama ışınları yüksek enerji ve kısa dalga boylarına sahiptir. X-ışınlarına çok benzerdirler. I-131 izotopunun vücutta metabolize olması sonucu 364 keV enerjili gama ışıması meydana gelir. Bu enerji görüntüleme amaçlı kullanılmaktadır [19].

2.2. Radyoaktif İyot Tedavisi (RIT)

Radyoaktif iyot kapsül veya sıvı formunda oral olarak uygulanır. Gastrointestinal sistemde tamamen emilir. Plazmadaki iyotun çoğu tiroid bezi tarafından hızla yakalanır ve böbrekler yolu ile atılır. Bir kısmı ise tükürük bezleri ve bağırsakta tutulur. Tiroid dokusunda radyoiyot tiroglobulin içinde depolanır [20, 21].

Radyoaktif iyot tedavisinin esası, I-131'in fonksiyone tiroit dokusuna yerleşerek beta partikülleri aracılığı ile folikül hücrelerini tahrip etmesine dayanır. Tedavinin amacı yeterli oranda tiroid dokusunu tahrip ederek hastayı hormonal açıdan normal duruma getirmektir. Tek doz radyoiyot uygulamasından sonra hastalar hormonal açıdan normal hale gelebileceği gibi hipotiroidik veya hipertiroidik olarak da kalabilir. Radyoaktif iyot tedavi endikasyonları diferansiye tiroit kanserleri, Graves ve Plummer hastalığı nedeniyle hipertiroidi gelişen vakalar, tiroititler, ameliyat (tiroidektomi) sonrası geride kalan bakiye tiroit dokusunun ortadan kaldırılması (ablasyon) ve iyota aç metastazların tedavisi olarak sıralanabilir. Dıştan radyoterapiye göre avantajı, radyasyonun, tümör spesifik radyofarmasötikler aracılığı ile selektif olarak tümör dokusuna verilmesi ve diğer normal organların radyasyondan korunmasıdır. [21].

2.2.1. İyot 131 Dozunun Hesaplanması

Tedavide hastalara uygulanacak olan radyoaktif iyot dozunu belirlemek için uygulanan pek çok yöntem vardır. Genellikle kullanılan metodlar:

- a. **Düşük doz kullanıp gerektiğinde dozu tekrar uygulama yöntemi:** Hastalarda düşük doz olarak 2 mCi iyot-131 kullanılmaktadır. Bu yöntemde hiçbir kritere bakılmazsınız tüm hastalara aynı dozda radyoaktif iyot verilmektedir. Bu yöntemle hastalara verilen düşük radyasyon dozu ile hipotiroidizm insidansı azaltılmaktadır. Ancak hastalarda tedavinin başarılı olabilmesi, hastaların genelde birden fazla doz almaları gerekebilmektedir ve hipertiroidinin kontrolü de uzun süre alabilir [22].
- b. **Tiroid büyüklüğüne göre saptanan "değişken skala metodu" uygulaması:** Bu yöntem de tiroid gland büyüklüğü ve hastanın semptomları dikkate alınarak radyoaktif iyot-131 verilmektedir. Tiroid bezi (gland) küçük ve tirotoksikozu hafif olan hastalar da 3-5 mCi, bez tirotoksikozu ve büyüklüğü orta derece olan hastalar için 7-12mCi., bez büyük ve tehlikeli tirotoksikoz bulguları olan hastalara ise 20-30 mCi verilir. Bu yöntemle, verilebilecek en uygun doz verilerek hipertiroidiyi tedavi etmek ve yan etkilerini en aza indirmeyi amaçlanmaktadır [23].
- c. **Yüksek doz verilerek ablasyon sağlanması metodu:** Uygulanan yüksek dozu için 29-30 mCi iyot-131 verilmektedir. Bu metod ile bezin büyüklüğü, uptake ve hastalığın şiddeti dikkate alınmadan bütün hastalara aynı miktarda doz uygulanmaktadır. Radyoiyot tedavisi sonucu hipertiroidizm hızlı bir şekilde kontrol altına alınabilir, fakat hipotiroidi insidansında artış görülebilir [23].
- d. **Tiroid bezinin büyüklüğüne göre dozun ayarlanması için doz hesabı:** Tiroid bez hacmi; palpasyon, ultrasonografi veya sintigrafi ile saptanmaktadır. Belirlenen tiroid bez ağırlığına göre gram başına sabit bir aktivite yoğunluğu verilmektedir. Bezin I-131 uptake'i ve ağırlığına göre verilecek doz aşağıda belirtilen formülle hesaplanmaktadır:

$$\text{Doz } (\mu\text{Ci}) = \frac{\text{İstenen } \mu\text{Ci/gr} \times \text{bezin ağırlığı} \times 100}{24 \text{ saatlik uptake}}$$

Tiroid bezinin gramı başına verilecek olan dozaj 40-200 mCi arasında belirlenmiştir. Mümkün olan tek dozla hasta bireyler de normale ve sağlıklı

duruma dönmesini sağlayıp hipotiroidi oluşma hızını azaltmak amaçlanmaktadır. Bu yöntemde dikkate alınması gereken hususlar; hastanın yaşı, sistemik hastalıklarının olup olmaması, antitiroid ilaç kullanıp kullanmadığı gibi faktörlerdir. Bunların dışında tiroid patolojisi (toksik adenom veya toksik multinodüler guatr) gibi etmenler de göz ardı edilmemelidir [23].

e. Uygulanan uygun dozun dozimetri aracılığıyla saptanması uygulanması:

I-131 dozu aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmaktadır.

$$\text{Doz } (\mu\text{Ci}) = \frac{\text{İstenen rad miktarı} \times \text{bezin ağırlığı}}{24 \text{ saatlik uptake} \times 90}$$

$$24 \text{ saatlik uptake} \times 90$$

Belirtmiş olduğumuz yöntemlerin her birinin kendilerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Farklı merkezlerde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Hastalara radyoaktif iyot verildikten sonraki 8 günü takiben çocuklar ve hamile bayanlardan uzak tutulması, toplu taşıma araçları ile seyahat etmemesi, evdeki bireylerden farklı bir odada yatırılması ve ayrı bir tuvaletin bol su ile temizlenerek kullanılması sağlanmalıdır [23].

2.3. Radyoaktif İyot Tedavi Sonrası Oluşan Komplikasyonlar

Radyoaktif iyot tedavi genellikle güvenli olmasına rağmen bazı sınıflandırılmış erken ve geç komplikasyonlara sahiptir. Erken komplikasyonlar, mide-bağırsak semptomları, radyasyon tiroidit, tükürük bezi iltihabı, ağız ve göz kuruluğu, kemik iliği baskılanması, nazolakrimal kanal tıkanıklıklarını içerir. Geç komplikasyonlar, ikincil kanserleri, radyasyon akciğer fibrozisi, kalıcı kemik iliği baskılanmasını, kronik göz kuruluğu ve genetik etkileri içerir. Bu komplikasyonlardan literatürde bildirilenlerden bazıları şunlardır:

Tedaviden 4 -12 saat sonra yaygın olarak gastrit, mide bulantısı ve kusma görülebilir ve genellikle 32 saat içinde giderilir [24].

Mide-bağırsak yan etkileri çoğunlukla metastatik hastalıklar için belirlenen ≥ 150 mCi dozlarda görülmektedir [25-27].

Radyasyon tiroiditinde geçici boyun ağrıları ve ödem sık sık meydana gelmektedir. Bu semptomlar ablasyon tedavisi sonrası ilk 10 gün içinde görülmektedir. Radyasyon tiroiditi, geçici olarak tiroid hormonu seviyesinin artması ile atlatılmaktadır [28, 29].

Tükürük bezi iltihabı yaygın komplikasyonlardan biridir ve sonrasında ağız kuruluğu ile sonuçlanabilmektedir [29].

Kemik iliği baskılanması çoğunlukla geçicidir. Lökositlerin ve trombositin azalması ile sonuçlanır. Bazen de kemik iliği dozu 2 Sv'yi aşmışsa, kanmaya ve enfeksiyona yatkınlık artışı ile sonuçlanabilir. Genellikle bir terapi olmadan çözülür [30].

Bir diğer komplikasyon olan göz kuruluğu da genellikle geçicidir [31, 32].

Nazolakrimal tıkanıklık, I-131'in bölgesel toksisitesinden kaynaklanarak oluşan geçici bir inflamasyondur [33, 34].

Akciğer metastazı olan tiroid kanserli hastalarda, kısa zaman aralıkları ile I-131 tedavisinin tekrarlanması sonucu akciğer fibrozisi oluşabilmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda, akciğer fibrozisinin radyoaktif iyot tedavisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı kesin olarak belirlenememiştir [35-37].

Kalıcı kemik iliği baskılanması nadir görülen geç komplikasyonlardandır. Ancak radyoaktif iyot tedavisini alan hastalarda lökositlerin ve trombositlerin azalması yaygın olarak görülmektedir [30].

Kronik veya tekrarlayan konjonktivit ve kuru göz sendromu, radyoaktif iyot tedavisi sonrası gözyaşı bezlerinin fonksiyonlarının tamir edilmemesiyle ve nazolakrimal çıkış darlığına bağlı meydana gelebilir [38].

I -131'in nadir görülen komplikasyonlarından biri lösemi bir diğeri de ikincil kanserlerdir. Löseminin meydana gelme riskini çok az bir oranda artırabilir. Genellikle bu durum yüksek birikmiş doz (>500-600mCi) alımından sonra gelişmektedir [25, 39, 40].

2.4. Onkogenler ve Epigenetik Değişiklikler

Kanser patogeneğinde oluşan genetik değişikler; onkogenlerde, tümör supresör genlerinde, hücre siklus regülatörlerinde, DNA tamir genlerinde ve sinyal moleküllerde çoklu genetik ve epigenetik değişiklikler şeklinde olmaktadır [41,42].

2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar

DNA ve histon metilasyonu ve histon asetilasyonu ile oluşturulmaktadır. Onkogenlerin aktivasyonu ve genomik instabiliteye hipometilasyon neden olurken, tümör süpresör genlerin ve transkripsiyonel DNA yanlış eşleşme tamir genlerin bastırılmasına promotor hipometilasyonu sebep olmaktadır.

İntestinal tip kanserde, Hp ile ilişkili kanserde, gen promotorlarının DNA metilasyonu gibi epigenetik değişiklikler sık görölmektedir. Erken mide kanserinde ise reprimu genin metilasyonu görölmektedir. İnvaziv mide kanserinde ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPAR) bir biomarkerdir. Mide kanserine neden olan ve en sık rastlanan beta catenin mutasyonu Wnt yolu aktivasyonunu aktive eder [43,45].

2.4.1.1. Erken K-ras mutasyonları

RAS proteini, normal dokuda proliferasyon, diferensiyasyon sinyallerinde önemli bir role sahiptir. Mutant genin oluşturduğu RAS proteini ise birçok kanser tipinde etkili onkojenik bir proteindir. RAS onkogeni tek aminoasit değişimi ile oluşan nokta mutasyonlar sonucu protoonkogenden oluşur. Bu onkogende 12. 13. ve 61. kodonlarda gelişen aminoasit değişiklikleri sık görülür (46,58, 59).

Displazi ve invaziv mide kanserlerinde görülür. CagA, c-met reseptör signal transdüksiyonunu aktive ederek mide kanserinin başlamasına ve tümörün gelişmesine neden olur. K-ras onkogen, intestinal mide kanserlerinde, intestinal metaplazide ve adenoma da görülmektedir. Diffüz mide kanserinde rastlanmamıştır.

2.4.1.2. LOH (Heterozigotluk Kaybı)

Transkripsiyon faktörüdür ve tümör süpresör geni gibi işlev görmektedir, gastrik karsinomalarda rastlanmaktadır. EBV-ilişkili gastrik karsinomalarda promotor metilasyon kaybı gösterilmiştir. Gastroepitelyal kanserlerde p73 ün aşırı ekspresyonu ile apoptotik aktivite baskılanır ve böylece, intrasellüler beta-catenin seviyesi yükselir.[47]

2.4.1.3. APC (Adenomatöz polipozis koli) Mutasyonları

Genellikle p53 gen bölgesinde heterozigotluk kaybına sahiptir bu nedenle p53 gen aktivasyonu yoktur. Bir diğer mutasyon oluşumu da Wnt/catenin sinyal yolunun modüle edilmesi sonucu oluşur. Bu farklılaşmalar intestinal tip mide kanserlerinde daha yüksek oranlarda görülmektedir [48]

2.4.1.4. Hücre Siklus Düzenleyici Moleküller

Hücre döngüsü regülatörleri olan Siklin E ve siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B (CDKN1B, p27), displazinin, maligniteye dönüşümünde ve invaziv kanserde tümör agresifliğinde bir indikatör olarak görev yapmaktadır. CDKN1B ifadesinin artan kaybı, Hp ile enfekte olmuş farelerde gastrik kanserin oluşmasında da artış olduğunu belirlenmiştir. Siklin E ve CDK aşırı ekspresyonu, p53 ün hatalı ifadesi ve p27 downregulasyonu (aşağı doğru düzenleme), mide kanserinde sıkça görülmektedir. [48]

2.4.1.5. miRNA (micro RNA)

Birçok kanserin gelişiminde rol oynadığı, son zamanlarda ki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

miRNAların; - poliferasyon

- apoptozis

- differansiasyon

- anjiogenezis

- metastaz ve

- immün cevapta rol oynadığı bilinmektedir [49].

2.4.2. Tümör Süpresör Genler

İntestinal tip mide kanserlerin yarısında, TP53, TP73, adenomatöz polipozis koli (APC), trefoil faktör ailesi (TFF), kolorektal kanserde silinen bölge geni (Deleted in Colorectal Cancer = DCC), kırılğan histidin triadı (FHIT) gibi tümör süpresör genlerin de farklılaşma saptanmıştır. TP53, hücre siklusunda önemli bir regulator faktördür. TP53 ifadesinin kaybı veya mutasyonel inaktivasyonu, mide kanserinde görülen en sık genetik farklılaşmalardandır. İnvaziv tümörlerin yaklaşık yüzde atmışın da görülmektedir. Benzer şekilde, Hp ile ilişkili kronik gastrit ve displazide de anormallikler bulunur. p53'un, Hp ile ne gibi bir etkileşime girdikleri

bilinmemektedir. Bazı araştırmalar sonucu göstermiştir ki; gastrik epitelyal hücrelerde p53 geninin inaktive olması, Hp kaynaklı hasara cevapta apoptozise gidişi azaltmaktadır. Özellikle intestinal tip mide kanserinde, vakaların % 50'sin de, TSG'de değişiklikler saptanmıştır [44,50]. Mide kanserinde p53 geni inaktiftir. p53 gendeki GC-AT transizyonu, heterozigotluk kaybı (LOH), yanlış anlamlı mutasyonlar, frameshift delesyonlar, diffuz kanser tipinde sık görölmekte ve karsinogenik N-nitrozaminler (diyetteki nitrit ve aminler) ile indüklenmektedir.

2.4.2.1. TP53 Geni

Tümör baskılayıcı genler, dolaylı olarak ya da doğrudan hücre bölünmesini denetlerler; mutasyonlar neticesinde bu etkilerini kaybettikleri takdirde aşırı hücre proliferasyonu ortaya çıkabilir. Ancak bu durumun ortaya çıkabilmesi için bir tümör baskılayıcı genin her iki allelinin de etkilenmesi gerekir. Bu durum Knudson'm 1971 yılında hereditör retinoblastoma'ya ilişkin ortaya attığı "iki vuruş hipotezi" ile açıklanır. Sonraki yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda gösterildiği üzere onkogenezi sırasında bir tümör baskılayıcı genin önce bir, daha sonra da ikinci alleli nokta mutasyonu, gen delesyonu ya da genomik baskılama gibi mekanizmalarla inaktive olmaktadır. Tümör baskılayıcı genleri arasında en çok incelenmiş gen, p53 tümör baskılayıcı genidir [51].

1979 yılında yapılan bir çalışmada, simian virüs (SV40) ile transforme edilmiş hücrelerde viral bir antijenle birlikte çökelen bir protein keşfedilmiştir [52]. Daha sonra p53 olarak adlandırılan bu proteinin, ilk çalışmalarda hücre kültürlerinde hücreleri transforme edebilmesi onun da bir onkogen ürünü olduğunu düşündürmüştür. Ancak sonraki yıllarda, proteinin yalnızca mutant şeklinin bu özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Kanser dokusunda p53 mutasyonları ilk kez kolon tümörlerinde saptanmıştır [53]. Kolon tümörlerinde, hem p53 geninin bulunduğu kromozom 17p13'deki allelik delesyon ve nokta mutasyonlarının Knudson'ın iki vuruş modeli ile uyumlu olması, hem de proteinin normal şeklinin hücre kültürlerinde transformasyonu baskılaması p53'ün başlangıçta sanıldığının aksine tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğunu düşündürmüştür. İlerleyen

yıllarda yapılan pek çok çalışmada p53 geninin insan tümörlerinin yarısından fazlasında (kolon, karaciğer, kemik, beyin, özefagus kanserleri) mutasyona uğradığı anlaşılmıştır. Dahası p53 geninin insan tümörlerinde en sık mutasyona uğrayan gen olduğu saptanmıştır [54-56]. Mamafih bazı tümörlerde p53 mutasyonu saptanamamaktadır. Örneğin malign melanomda p53 mutasyonu ya yoktur ya da oldukça nadirdir. Yakın zamanda, malign melanomada p53 ile aynı apoptotik mekanizmada rol alan Apaf-1 geninin mutasyona uğradığı anlaşılmıştır [57]. Benzer şekilde, p53 geninin "intakt" görüldüğü kimi tümörlerde, aynı sinyal iletim yolunda yer alan başka moleküllerdeki defektlerin p53 işlevini ortadan kaldırması söz konusu olabilir. p53 geninin etkilenme mekanizmasının her zaman Knudson'm "iki vuruş hipotezi" ile açıklanamayacağı, genin yalnızca tek bir kopyasının delesyona uğramasının da tümör gelişiminde rol oynayabileceği bildirilmiştir. Bu durum, gen yükündeki azalmanın da tümör gelişimini kolaylaştırabileceği şeklinde yorumlanmaktadır (haplo-insufficiency; haplo-yetersizlik kavramı)[58, 59]. Diğer yandan, mutant p53 allelinin, etkilenmemiş diğer allel tarafından kodlanan sağlam p53 proteininin de işlevini engelleyebileceği bildirilmektedir (dominant-negatif etki) [60].

Kolon tümörlerinde yapılan çalışmalarda p53 mutasyonlarının büyük çoğunluğunun yanlış anlamlı mutasyon olduğun ve proteinin DNA'ya bağlanma bölgesini etkilediği gösterilmiştir. Bu durum, daha çok erken stop kodon oluşmasına yol açan çerçeve kayması tipinde mutasyonların görüldüğü retinoblastoma, APC (Adenomatous Polyposis Coli) geni gibi diğer tümör baskılayıcı genlerden farklılık göstermektedir [61]. Bazı mutajenlerin p53 geninde kendilerine özgü mutasyonlar oluşturdukları gözlenmiştir, örnek olarak aflatoksinin karaciğer tümörlerinde saptanan kodon 249 mutasyonunu oluşturması verilebilir [62].

p53 genindeki germline (hücre hattı) mutasyonları sonucunda; meme ve yumuşak doku sarkomları, lösemi, osteosarkom, beyin kanseri gibi pek çok kanser türünün birlikteliği ile karakterize ailevi kanser sendromu olan Li-Fraumeni sendromu meydana gelir. Sendromdaki p53 mutasyonu büyük ölçüde sporadik kanserdekilere benzer biçimde gelişmektedir. DNA bağlanma bölgelerinde nokta mutasyonlar oluşmakta olup özellikle 175., 245., 248., ve 282. kodonlar etkilenmektedir. Li-

Fraumeni sendromlu bazı ailelerde ise p53 geninde mutasyon saptanmamış ve Chk2 geninde mutasyon bulunmuştur [63-66].

2.4.2.1.1. TP53 Geninin Yapı ve Fonksiyonu

p53 geninin kromozomu 17p13 bölgesinde lokalize olup 11 ekson içermekte, 53 kDa ağırlığındaki 393 aminoasitlik nükleer fosfoproteini kodlamaktadır. Hücre içinde tetramer formunda bulunmaktadır. 91. İle 301. aminoasitler arasındaki kısmı prolince zengindir ve p53 ün DNA' ya bağlanma bölgesidir. p53 molekülü normal şartlarda inaktif, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömürlü olarak bulunur [67].

Stabilizasyonunun düzenlenmesinde MDM2 proteini rol almaktadır. MDM2, p53'ün amino ucuna bağlanarak hem onun transkripsiyonel etkinliğini baskılamakta hem de proteazom adlı komplekslere yönlendirerek burada degradasyonu (proteoliz) sağlamaktadır. İlginç olarak p53, MDM2 geninin de transkripsiyonunu aktive etmektedir [68].

DNA transkripsiyonu üzerinde etkileri bulunan birçok genin ekspresyonu, p53 tarafından düzenlenir. Yani p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür. p21, MDM2, GADD45, siklin G, Bax gibi birçok genin transkripsiyonunda ya da baskılanmasında rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak etkinlik gösterebilmesi için spesifik DNA dizilerine bağlanır. Proteinin DNA ya bağlanan bu bölgeleri 4-8. eksonları tarafından kodlanmaktadır. Bununla birlikte tümörlerde görülen mutasyonlar da özellikle bu bölgelerde yoğunlaşmaktadır [69].

Birçok "stres" faktörleri p53'ün hücre içi yoğunluğunu arttırarak ve üç boyutlu yapısını değiştirerek onu aktive etmektedir. Bu stres faktörleri başlıca iki grupta toplanmaktadır:

DNA hasarı: İyonizan radyasyonun ve ultraviyolenin yol açtığı DNA hasarı bazı kinazları (Chk1 ve Chk2) uyarmakta ve bunlar da p53'ün amino ucunu fosforilleyerek onun MDM2 ile etkileşimini engellemektedir. DNA hasarının tanınmasında ataksi-

telenjiektazi hastalığından sorumlu genin kodladığı ATM proteini de rol oynamaktadır. ATM'nin de p53'ü fosforilleyebilme özelliği vardır. Bu gözlemler, fosforilasyonun p53 aktivasyonunda önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir [68,70].

Genotoksisite göstermeyen etkiler: Hipoksi: Bir tümörün büyümesi ile damarlanması (anjioenez) aynı hızda olmadığından, çoğu kez tümörün orta bölgesinde iyi kanlanamayan hipoksik bir bölge ortaya çıkmaktadır. Hipoksinin uyardığı p53 aktivitesinin ise tümör hücrelerini apoptozise yönlendirdiği gösterilmiştir [69]. Ribonükleotid depleasyonu: DNA sentezi için ribonükleosit trifosfatlar gerekli olduğundan bunların azalması halinde, p53 aktive olmakta ve hücre siklusu durdurulmaktadır [71].

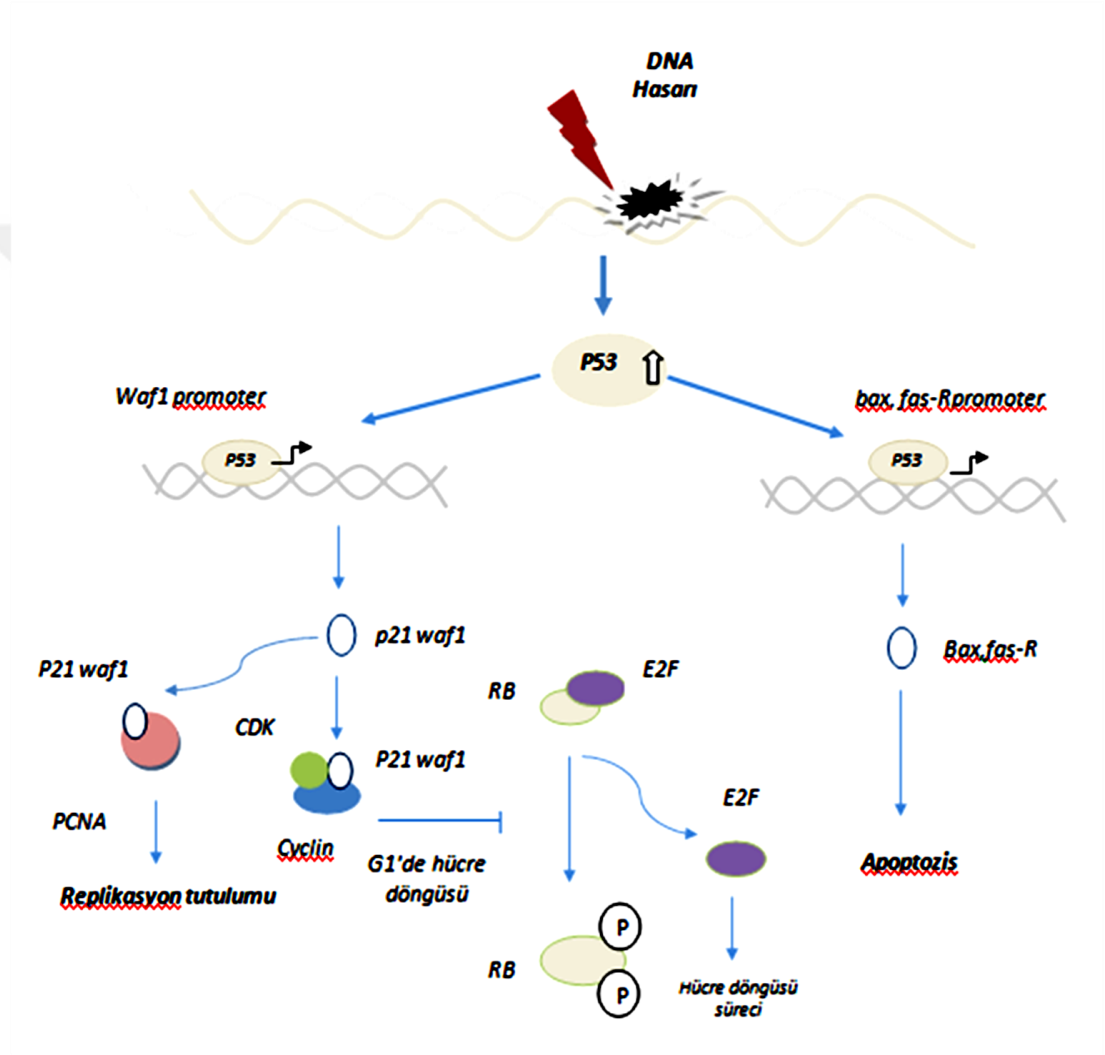
Viral proteinler: Adenovirus E1A ve papillomavirus E7 proteinlerinin p53 üzerinden apoptosisi başlattığı gösterilmiştir. Ebstein-Barr virusu genomu tarafından kodlanan "ZEBRA" proteini de p53'ü aktive edebilmektedir. Bu etkinin onkojenik virusların replikasyonunu kontrol altında tuttuğu iddia edilmiştir [72].

Onkogen aktivitede artış: Artmış onkogenik aktivitenin uyardığı p14ARF adlı bir başka tümör baskılayıcı, MDM2'ye bağlanarak onu etkisizleştirmekte ve dolayısı ile p53'ü aktive etmektedir [73].

2.4.2.1.2. TP53 ve Hücre Siklusu

DNA üzerinde meydana gelebilecek hasara karşı P53 proteinini iki yoldan fonksiyonunu gerçekleştirir. DNA hasarının uyardığı p53, p21 (diğer adlan: Waf1, Cip-1) adlı bir proteini aktive etmekte, bu da siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak siklusu G1 evresinde durdurmaktadır [74]. p53, DNA tamirini başlatan bir protein olan GADD45'in de transkripsiyonunu uyarmaktadır [75].

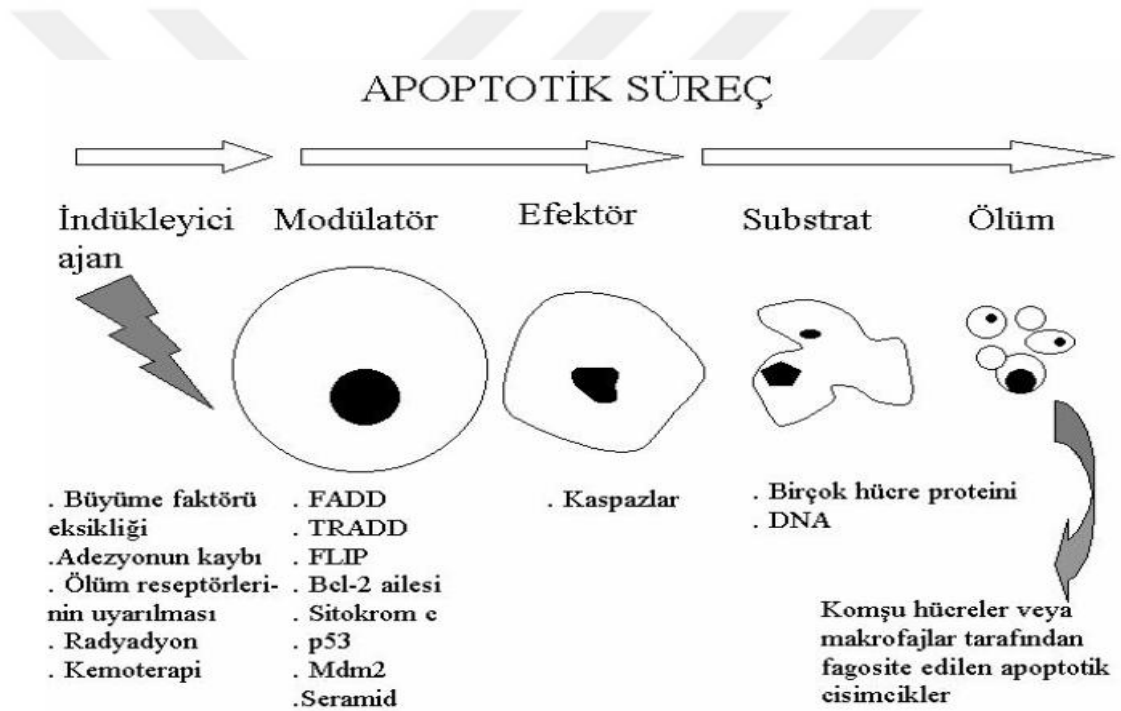
Sonuç olarak p53 bir yandan p21 vasıtasıyla hücre siklusunu duraklatırken, diğer yandan da GADD45 aracılığıyla DNA tamirini sağlamaktadır. P14ARF geninin inaktivasyona uğraması, P14ARF'nin MDM2 üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması ve p53 yıkımının artması ile sonuçlanabilir. Bu da hücre siklusu üzerindeki kontrolün kaybolması anlamına gelmektedir [76].



2.2: Oluşan DNA hasarı sonucu p53'ün aktive edilmesi ile meydana gelen durumlar belirtilmektedir. [76-78]

2.4.2.1.3. TP53 ve Apoptosis

Apoptosis kelimesi Yunan dilindeki apo(ayrı), ptozis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmakta ve sonbahardaki yaprak dökümünü tanımlamaktadır [79]. Apoptozis terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Kerr ve arkadaşları, kromatin parçalarının yoğunlaşmasını fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde gözlemlemiş ve organellerin iyi bir şekilde korunduğunu fark ederek bu mekanizmayı büzüşme nekrozu olarak tanımlamışlardır [80]. Organizmalarda gelişim, doku homeostazisi ve onkogenetik sürecin engellenmesi açısından apoptosis büyük önem taşır [81,82].



2.3: Hücre içerisinde apoptozis düreci (Ulukaya., 2003)

Organizmaların bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak apoptotik hücreler oluşmaktadırlar ve bu oluşum hayat boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde devam eder [83].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Elde Edilmesi

Çalışmada, 24 adet erkek wistar türü ratlardan (ortalama ağırlığı 285 ± 55 gr, 6-8 aylık) kontrol grubu dahil olmak üzere dört birey içeren gruplar oluşturuldu. 4. saat, 24. saat ve 48. saatlerde ratlara 3 mci iyot-131 maddesi uygulandı. Daha sonra mide dokuları çıkarılıp, histopatolojik inceleme ve Real-Time PCR için uygun koşullarda saklandı.

3.2. Örneklerin Histopatolojik Analizi

3.2.1. Örneklerin Histopatolojik İncelemeler İçin Hazırlanması

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2015/111 no'lu “Radyoaktif I-131 Uygulama sonrası radyasyonla indüklenmiş mide doku hasarında p53 tümör supressör geni rolünün Real-Time PCR ve histopatolojik analizi” adlı proje kapsamında elde edilen 24 adet mide dokusu histopatolojik hazırlandı. Her bir olguya ait mide örnekleri %10 luk tamponlu formalinde 48-72 saat boyunca tespit edildikten sonra örnekler 1 gece boyunca akan çeşme suyu altında yıkamaya alındı. Sonrasında, rutin doku takibi amacıyla sırasıyla 70o, 80o, 90o, 96o ve mutlak alkol serilerinde 2 şer saat süreyle dehidrasyon gerçekleştirildi. Sonrasında üç seri ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı ve sırasıyla %50 ksilen %50 parafin, iki seri 56-58 oC’de eritilmiş parafinde bekletildikten sonra yine parafin içerisinde bloklandı.

3.2.2. Örneklerin Histopatolojik İncelenmesi

Mide kurvatura majör boyunca longitudinal olarak trimlenen ve parafine gömülen mide dokularından 4-5 µm kalınlığında kesitler 3-aminopropyl triethoxysilane kaplı

lamalara alındı, hematoksilen ve eozin (HE) ile boyanan kesitler aşağıda Çizelge 1’de açıklanan kriterler göz önüne alınarak trinoküler ışık mikroskopunda (Olympus BX51) değerlendirildi ve fotomikrografları çekildi. Çizelge 1’de verilen histopatolojik kriterlerin şiddeti ve yaygınlığına göre 0 ile 3 puan arasında semikantitatif olarak skorlandı. Buna göre; her bir olgu aldığı toplam puan üzerinden mide dokusunda şekillenen patolojik değişiklikler yönünden aşağıdaki şekilde skorlandı; 0 puan: lezyon yok, 1-5 puan: hafif, 6-10 puan: orta ve 11-15 puan: şiddetli.

Çizelge 1: Mide bulgularının histopatolojik skorlama kriterleri

Dikkate alınan kriter			
Mide mukozasında Değerlendirilen Histopatolojik Kriterler	Yüzey Epitel Nekrozu		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Propriya/Submukoza Enflamasyon		+1
		Şiddetine göre	+2
			+3
	Hiperemi		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Ödem		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Propriyal Bez Dejenerasyonu		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Nekroz		+1
		Şiddetine göre	+2
			+3
	Epitelyal Hiperplazi		+1
		Şiddetine göre	+2
			+3

3.3. Örneklerin Real Time PCR ile Analizi

3.3.1. Örneklerden mRNA İzolasyonu:

- 20° C'de muhafaza edilen doku örneklerinden mRNA izolasyonu şu aşamalarda gerçekleştirildi:
 1. Örnekler sıvı azot ile parçalandı ve homojenizatörde homojen hale getirildi.
 2. 400 µl lysis/binding buffer eklendi.
15 saniye vortexlenir,
 3. Karışım filtre-koleksiyon tüpünün üst kısmına konuldu. Maximum 700 µl olacak şekilde konuldu. 15 saniye 8.000 xg de santrifüj yapıldı.
 4. Alt rezervuara çöken sıvı dökülür. Filtre tekrar tüpe konuldu.
 5. Her bir örnek için; 90µl DNase incubation buffer , 10µl Dnase I karıştırıldı. Rezervuarın üst kısmına her bir örneğe 100µl konuldu.
 6. 15 dakika inkübasyona bırakıldı. (+15°-+25°)
 7. 500 µl yıkama solüsyonu I üst rezervuara eklendi. 8000 xg de 15 saniye santrifüj yapıldı.
 8. Alt rezervuara çöken sıvı dökülür. Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu. 500 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklendi. 8000 xg de 15 saniye santrifüj yapıldı. Alt rezervuara çöken sıvı dökülür. Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu.
 9. 200 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklendi. 2 dakika maksimum hızda santrifüj yapıldı. Alt rezervuara çöken sıvı dökülür. Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve max hızda (13000 xg) 2 dakika boş santrifüj yapıldı.
 10. Yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması sağlanır. Filtre tüpü 1.5 ml'lik ependorflara konuldu. 50-100 µl elution solüsyonu (örneğe göre kitin içinde değişir.) üst rezervuara eklendi. 8000 xg de 1 dak. santrifüj yapıldı.
 11. Filtre tüpü atılır. Çöken kısım RNA'nın olduğu kısımdır. Örnekler cDNA'ya çevirme işlemine kadar -20 °C'de saklandı.

3.3.2. RNA örneklerinden cDNA sentezi:

DNA örnekleri izolasyondan sonra gerçek zamanlı pıra konulurken RNA cDNA çevrilir. Çevrilme işlemi, Qubit cihazında RNA miktarına bakıldıktan sonra, kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Primerler 1 µl olarak konuldu.

Total RNA miktarı gerçek zamanlı pıra konulurken her bir örnek için 50-100 ng mRNA düşecek şekilde hesaplandı ve cDNaya çevrilirken değişken olarak RNA maksimum 11µl olacak şekilde konuldu. Daha düşük miktarlar kitin içinden çıkan su ile toplamı 13µl olacak şekilde tamamlandı. Oluşan 13 µl'lik karışım opsiyonel olarak; 65 °C 10 dakika PCR'a konuldu.

3.2: Örneklerden cDNA sentezi için kullanılan bileşenlerin miktarları

Kimyasallar	Vol.	Son konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase	4µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Reaction buffer		
Deoksinükleotit mix	2µl	1 mM (her biri)
RNAse Inhibitor	0.5µl	20 U
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5µl	10 U

Toplamda her bir örnek için 7 µl olacak şekilde karışım hazırlanır, vorteks yapılmadan iyice pipetaj yapıldı. PCR'dan çıkan örneklerin üzerine 7 µl konuldu. Örnek toplamda 20 µl'lik bir karışım halinde PCR cihazına tekrar konuldu;

Anchored-oligo(dt) primer veya spesifik primer için hedef mRNA uzunluğuna göre;

4 kb	30 dakika 55°C
>4 kb	60 dakika 50°C

Random primer için,

4 kb	10 dakika 25°C
	30 dakika 55°C
>4 kb	10 dakika 25°C
	60 dakika 50°C

Daha sonra örnekler 5 dakika 85° bekletildi. Çıkan cDNA'lar buz üstüne alındı veya -20 °C'de saklandı.

3.3.4. Real Time PCR

Çalışmada Hidroliz prob kullanılarak oluşturulan 6 grupta p53 geninin ifadesi incelendi. Hidroliz prob master PCR' mix'in hazırlanması:

PCR mix hazırlanırken her bir örnek için su (4µl), LightCycler 480 Probes Master (10µl), Real Time Ready Assay (1µl) toplam hacim 15 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan mix vortex kullanılmadan pipetle yukarı aşağı yapılarak karıştırıldı. LightCycler 480 multiwell plate in her kuyucuğuna p53 miksten 15 µl, üzerine 5µl cDNA eklendi. Kuyucuklardaki hacim 20 µl olur. Multiwell Plate 2 dk 1500 x g santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirilip kullanılacak olan MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe programı seçildi. UPL Probe için gerekli protokoller cihazda seçildikten sonra LightCycler 480 PCR başlatıldı.

Çizelge 3: Real Time PCR cihazında uygulanan program koşulları

Set up			
Detection format		BlockType	Reaction Volume
MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe		96	20µl
Filtercombination: dynamicMode FAM483–533or465–510respectively,forLightCycler®480InstrumentVersionIorII			
Programs			
ProgramName		Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation		1	None
Amplification		45	Quantification
Cooling		1	None
TemperatureTargets			
Target (°C)	AcquisitionMode	Hold(hh:mm:ss)	RampRate(°C/s)
Pre-Incubation			
95	None	00:10:00	4.4
Amplification			
95	None	00:00:10	4.4
60	None	00:00:30	2.2
72	Single	00:00:01	4.4
Cooling			
40	None	00:00:30	2.2

3.3.5. Real Time PCR verilerinin İstatistiksel Analizi:

Cihazdan alınan verilerin kantifikasyon analizi için; kontrolden oluşturulan standart eğri referans ve hedef genlerin analizinde kullanılarak, cihazdan otomatik olarak çıkan miktarlar göz önüne alınarak kontrol değerleri ile karşılaştırıldı.

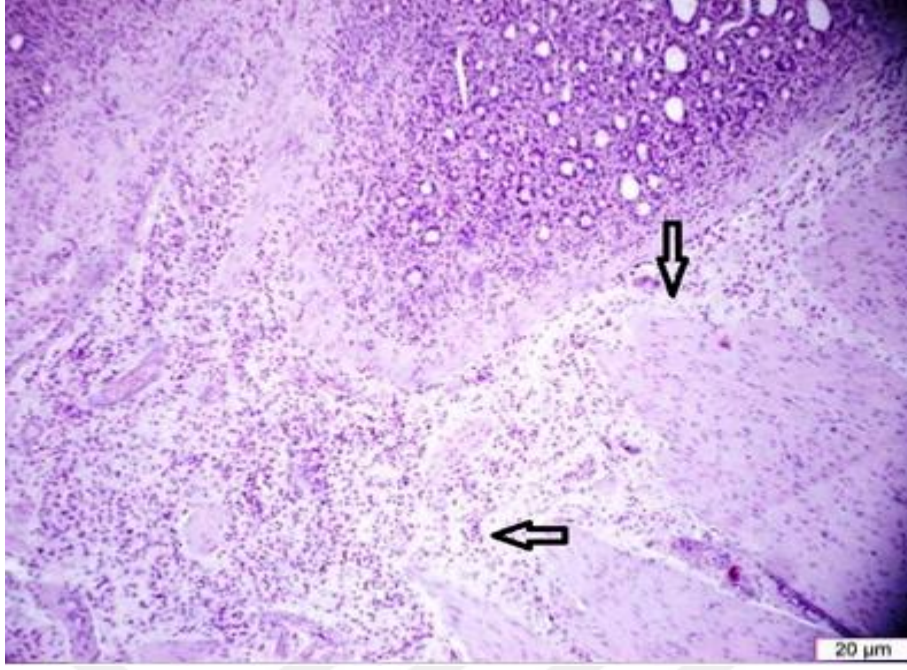
Her döngü, gerçek zamanlı PCR analizi LightCycler Yazılımı kullanılarak analiz edildi. Bağlı transkript seviyeleri housekeeping gene dayalı olarak hesaplandı. İstatistiksel analizler "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS / PC 23. 0) paket programı ile yapıldı. p53 geni için; Kruskal Wallis Testi ($p = 0.034 < p = 0.05$), daha sonra Mann Whitney U testi istatistiksel analizi yapıldı. 0.05'den daha düşük bir P seviyesinin Mann-Whitney U testi için önemli olduğu kabul edilir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

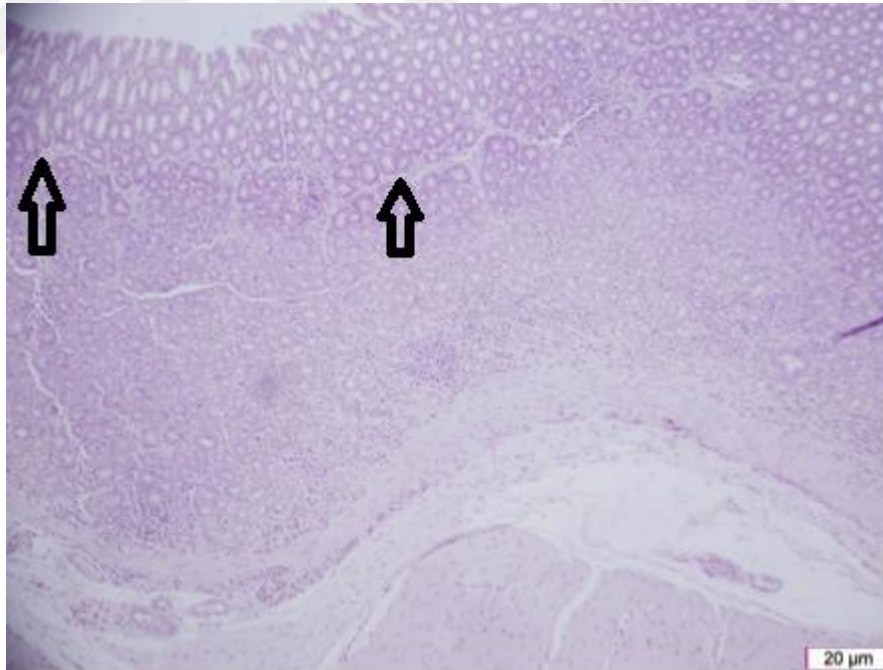
Çalışmada histopatolojik inceleme için hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanan örneklerin trinoküler ışık mikroskopunda (Olympus BX51) değerlendirildi ve fotomikrografları çekildi (Şekil 1-8). Örneklerin Çizelge 1’de verilen kriterlere göre histopatolojik değerlendirme ve semikantitatif skorlama sonuçları Çizelge 4’de verildi.



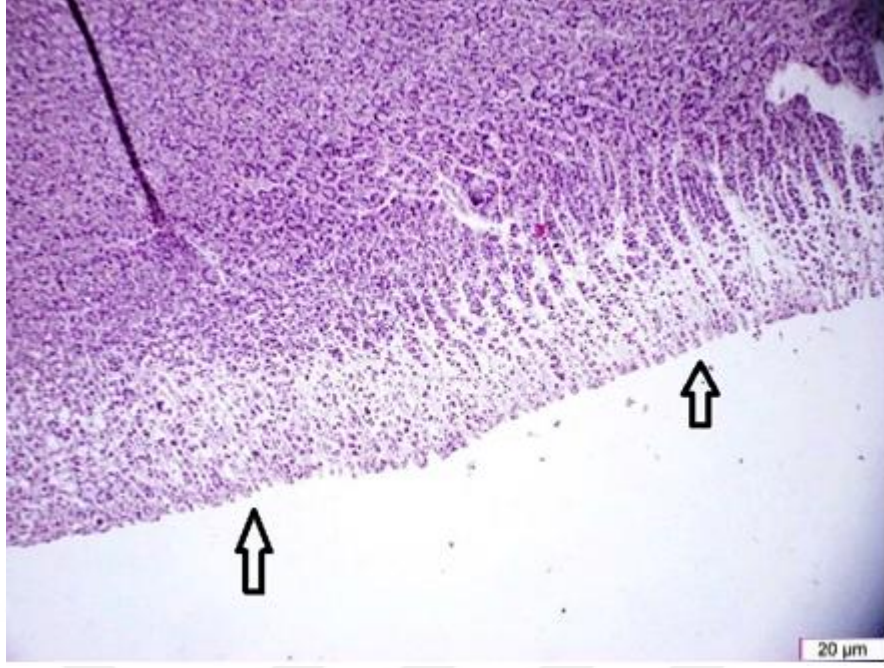
4.4: Mide dokusu, Kontrol Grubu (Grup1), Hematoksilin eozin boyama,



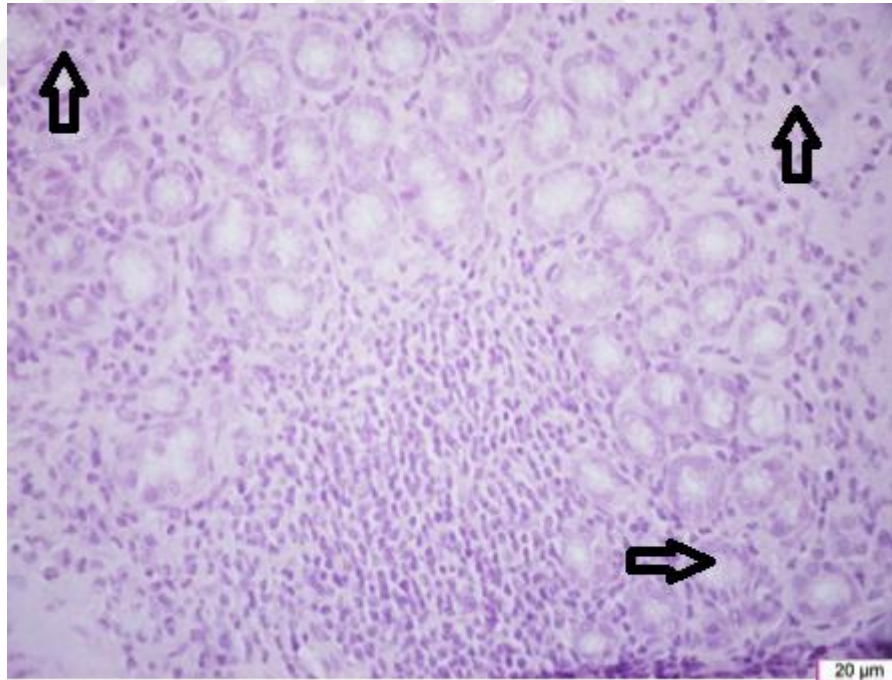
4.5: Mide submukozasında yaygın ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu, Grup 2, Hematoksilen eozin boyama, x120.



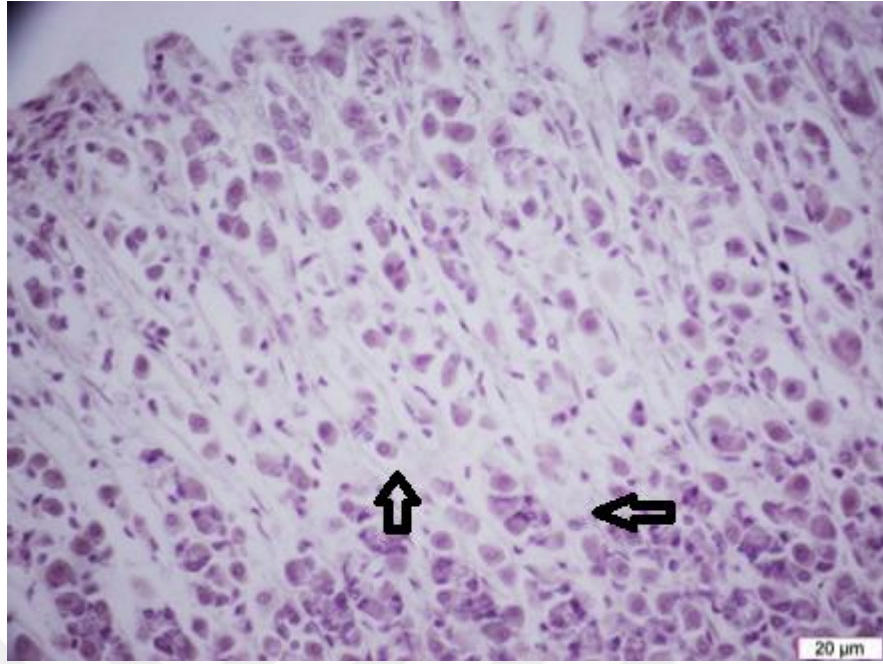
4.6: Mide propriya mukoza katında yangısal hücre infiltrasyonu ve submukozal ödem, Grup 2, Hematoksilen eozin boyama, x80



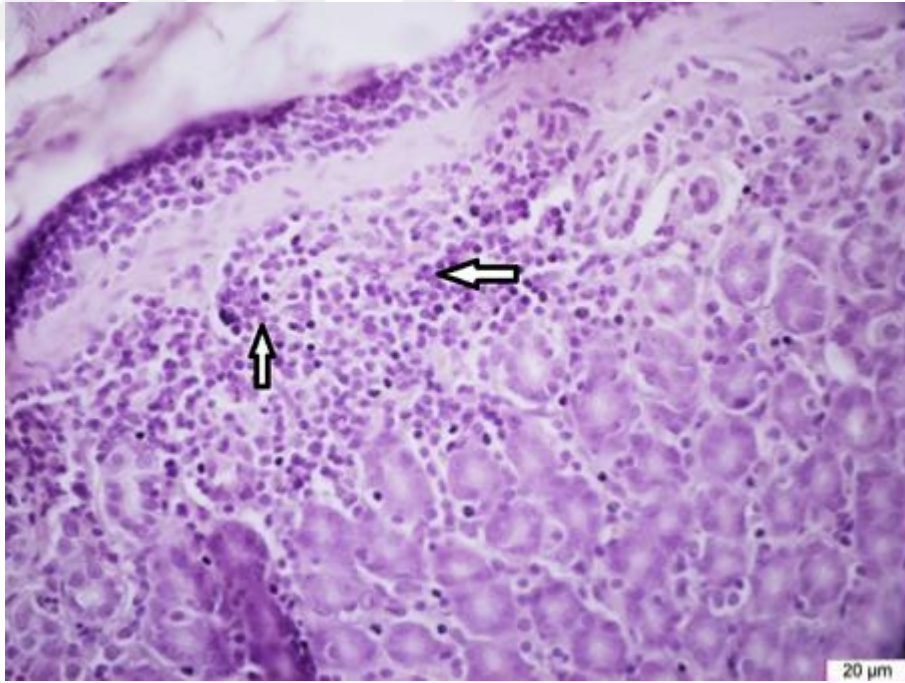
4.7: Lamina epitelyaliste dejenerasyon ve nekrotik değişiklikler, propriyal bezlerde hiperplazi ve rejeneratif faaliyet. Grup 4 Hematoksilen eozin boyama, x80



4.8: Mide mukozası propriyal bezlerde dejenerasyon ve bez epitellerinde yer yer nekrotik değişiklikler gözlenmekte. Grup5, Hematoksilen eozin boyama,x240



4.9: Mukoza yüzey epiteli ve propriyal bezlere kadar uzanan epitel hücrelerinde nekroz. Grup4, Hematoksilen eozin boyama, x240



4.10: Propriyal bezler arasına yayılım gösteren çoğunlukla mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ödem. Grup 6, Hematoksilen eozin boyama, x240

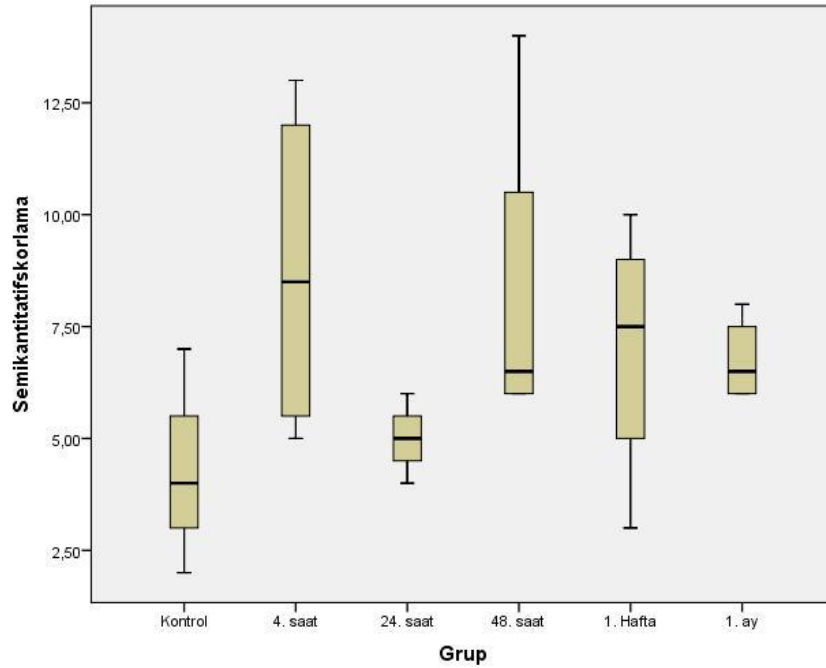
Çizelge 4: Histopatolojik Değerlendirme ve Semikantitatif Skorlama Sonuçları

No	Yüzey epiteli nekrozu	Propriya/ submukozal yangı	Hiperemi	Ödem	Propriyal bez durumu	Nekroz	Epitelyal hiperplazi
G1R3	–	2	1	–	1	–	–
G1R9	1	2	1	1	1	–	–
G1R10	–	2	2	1	1	–	–
G1R12	–	3	2	3	2	–	–
G2R1	1	4	3	3	2	3	1
G2R2	–	3	2	2	1	–	–
G2R4	1	1	2	1	2	–	–
G2R6	2	3	2	2	2	2	1
G3R2	2	2	2	1	1	–	–
G3R3	–	1	3	1	1	–	–
G3R5	1	1	2	1	1	–	–
G3R6	1	3	1	1	1	–	–
G4R3	–	1	2	2	2	–	–
G4R4	–	1	1	2	3	–	–
G4R5	3	4	2	3	4	2	1
G4R6	2	1	3	1	1	–	–
G5R2	–	1	1	–	2	–	–
G5R3	2	1	2	3	3	1	–
G5R4	1	2	2	2	3	–	–
G5R6	2	2	2	1	2	–	–
G6R1	–	2	3	1	2	–	–
G6R2	–	1	1	2	3	–	–
G6R4	–	4	2	2	3	–	–
G6R6	–	4	2	3	3	–	–

Akut (4.- 48. Saatler arası) dönemde;

- Yüzey epitel yangısı,
- Hiperemi ve
- Ödem oluşumunun yapılan *Mann Whitney u testi* sonuçlarına göre;
 - 4., 24. ve 48.saatlerde anlamlı düzeyde artış olduğu ve akut dönem diye tanımlanan bu süreçte yukarda belirtilen yangıların şiddetli olduğu gözlemlendi. Epitelyal hasarın 48. saatte maksimum düzeye ulaştığı gösterilmiştir.
- Mide mukoza dokusu trinoküler ışık mikroskobu ile incelendiğinde 4. ile 48. saatleri arasında yangı oluşumu belirlendi.
- Periferel bezlerde minimal düzeyde dejenaratif değişiklikler tespit edildi.

Bu dönemde oluşan inflamasyonlarla bağlantılı olarak;



4.11: Histopatoloji analiz grafiği

Subakut (1. Hafta) ve Kronik dönemlerde;

- Yüzey epitel yangısı,
- Hiperemi ve

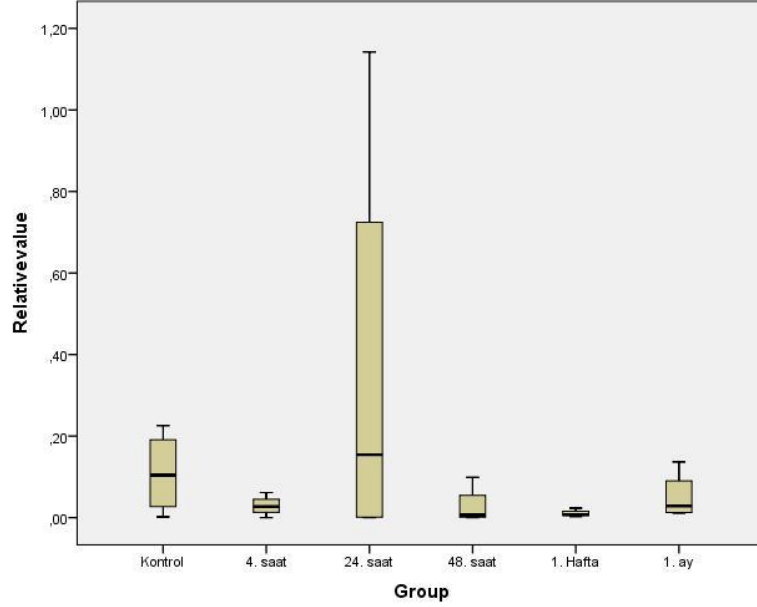
- Ödem akut dönem şiddetli yangılarının 1. haftanın (subakut dönem) bitiminde azaldığı gösterilmektedir. Bir aylık (kronik dönem) süreç sonucunda ise kontrole yakın düzeye ulaşmaktadır.
- Mide mukoza dokusunda oluşan akut dönem yangı oluşumunun uzun dönemde tolere edildiği gözlemlendi.
- Periferik bezlerdeki dejeneratif değişikliklerin akut dönemde minimum düzeyde seyir etmesine rağmen zaman içerisinde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5: p53 geni için Mann Whitney U test ile grupların karşılaştırmalı matriks değerleri

Grup	Mann whitney u	P değeri
1-2	4.000	0.248
1-3	8.000	0.000
1-4	4.000	0.248
1-5	4.000	0.248
1-6	5.000	0.386
2-3	6.500	0.663
2-4	6.500	0.663
2-5	4.000	0.248
2-6	7.000	0.773
3-4	6.500	0.663
3-5	8.000	1.000
3-6	8.000	1.000
4-5	7.000	0.773
4-6	3.000	0.149
5-6	2.000	0.083

Çalışmada Real-Time PCR analizinde her döngü, LightCycler Yazılımı kullanılarak analiz edildi. Bağlı transkript seviyeleri housekeeping gene dayalı olarak hesaplandı. Çalışmada p53 geni için SPSS/PC 23.0 ile istatistiksel analizi yapıldı. Kruskal Wallis Testi ($p = 0.034 < p = 0.05$), ve sonra Mann Whitney U testi istatistiksel analizi gerçekleştirildi. (0.05'den daha düşük bir P seviyesinin Mann-Whitney U testi için önemli olduğu kabul edildi). Grupların Mann Whitney U test ile grupların karşılaştırmalı matriks değerleri (* $p < 0.05$) Çizelge 5'te verildi. p53 geni için

relative value değerleri bakımından grupların karşılaştırmalı grafiği Şekil 7’de verildi.



4.12: p53 geni için relative value değerleri bakımından grupların karşılaştırmalı grafiği

Günümüzde yapılan kanser ile ilgili araştırmalarda epigenetic mekanizmaların etkili ve önemli olduğu anlaşılmıştır. Mekanizmaların anlaşılması ile bu hastalığın teşhis ve tedavisinde etkili sonuç alınması mümkün olacaktır. Çalışmada nükleer tıpta uygulanan radyafarmosötik ajanlardan I ¹³¹’in Wistar ratlarda 4. saat, 24. Saat, 48. Saat, 7. gün ve 30. gün için p53 gen ifadesini nasıl etkilediği ve bu süreçlerde meydana getirdiği histopatolojik dejenerasyonlar incelendi. histopatolojik değerlendirme ve Real-time PCR analizi sonuçları genel olarak uyumlu bulundu. DNA hasarlarında öncül yanıt mekanizması olarak işlev gören p53 geninin mekanizmasının kanser türlerinde tam olarak belirlenebilmesi ile bu hastalıkta etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında büyük önem taşımaktadır. I ¹³¹’ in mide dokusunda p53 geninin aktivitesine etkisi bakımından araştırılmasına dair bilinen bir çalışma yoktur. Bu ve benzeri çalışmalar radyafarmosötik ajanlara karşı p53 gen

ifadesinin anlaşılması açısından bilgi birikimine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Son on yılda yapılan çalışmalarda, hücre döngüsünü ve apoptozisi kontrol eden onkogenlerde, tümör supresör genlerde ve tamir genlerinde meydana gelen epigenetik ve çok faktörlü genetik değişikliklerin gastrik kanser oluşumunun mekanizmalarındaki etkileri gösterildi [84]. Sözü edilen gruplardaki değişikliklerin tümör hücrelerinin apoptozise uyarılmasına karşı hassasiyetinde farklılaşmaya neden olduğu bildirildi [85]. Bunlara ek olarak; tiroid hastalarında yaygın olarak kullanılan RAI tedavisi, oral yolla alındığında ilk olarak mideye ve daha sonra hedef bölge olan tiroid bezine etki etmekte, bunun sonucunda da midede tahribata neden olmaktadır. Oluşan tahribat mide mukoza hücrelerinde apoptozise gidişi artırmaktadır. Gastrik hücrelerde; DNA hasarı, apoptozis ve hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonu gibi çeşitli varyasyonlara bağlı olarak apoptozis meydana gelmektedir [86]. Daha önce bahsettiğimiz gibi gastrik hasar oluşumu çoklu genetik faktörlere bağlıdır ki p53 geninin ifadesi de bu süreçteki en önemli faktörlerden biridir. p53; hücre döngüsünü kontrol eder, DNA tamir mekanizması ile oluşan hasarı telafi etmeye çalışır ancak hasarlı hücre kurtarılamazsa hücreyi apoptozise yönlendirerek aktivasyon göstermektedir. p53 antitabileri, sağlıklı birey serumunda çok nadir olarak görülmektedir. Bir gende oluşan mutasyon sonucu, fonksiyonel olmayan proteinlerin uyarılması, anti-p53 antitabilerinin oluşmasına önderlik edebilmektedir [87].

Yaptığımız çalışma ile bu süreçten mide dokusunun nasıl etkilendiğini ve p53 aktivasyonu ile mide mukoza hasarı arasında nasıl bir bağlantı olduğunu incelemek üzere ratlara farklı dozlarda RAI tedavisi uygulaması ile farklı saatlerde alınan kesitler üzerinden karşılaştırmalı olarak histopatolojik ve fotomikrografik sonuçlar elde edildi.

5. KAYNAKLAR

1. Samuel, A. M, Rajashekharrao B.,. “Radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer” World J Nucl Med 5: 166-180, 2006.
2. Meier D. A, Brill D. R, Becker D. V, Clarke SEM, Silberstein E. B, Royal H. D, Balon H.R. “Procedure guideline for therapy of thyroid disease with (131) Iodine” J Nucl Med 43: 856–861, 2002.
3. Amdur R. J, Mazzaferri E. L., “Half-life and emission products of I-131. Essentials of Thyroid Cancer Management” (Amdur RJ, Mazzaferri EL, ed). New York. Springer Science. 165-168, 2005.
4. Morgan C, Jenkins G. J, Ashton T.,” Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue” Br J Cancer; 89:1314, 2003.
5. Yokozaki H, Shitara Y, Fujimoto J., “Alterations of p73 preferentially occur in gastric adenocarcinomas with foveolar epithelial phenotype” Int J Cancer, 83:192, 1999.
6. Nadalud LD, Ford J.M., “Molecular profiling of gastric cancer: toward personalized cancer medicine” J Clin Oncol, 1;31(7):838-9, 2013.
7. Abdel-Salam O. M, Hadajat I, Bayomy A. R, El-Shinawy S, Arbid M. S. Acute effect of gamma irradiation on gastric acid secretion and gastric mucosal integrity in the rat. Scientific World Journal. 5:195-204, 2005.
8. Dubois A, Walker R. I. Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome. Gastroenterology.; 95(2):500-7, 1988.
9. Breiter N, Trott K. R, Sassy T. Effect of X-irradiation on the stomach of the rat. Int J Radiat Oncol Biol Phys.; 17(4):779-84, 1989.

10. Dubois A, Danquechin D. E, Wood LR, Rogers J. E, O'Connell L, Durakovic A, et al. Effect of gamma-irradiation on the healing of gastric biopsy sites in monkeys. An experimental model for peptic ulcer disease and gastric protection. *Gastroenterology.*; 88:375-81, 1985.
11. UNSCEAR, 2000b. "Sources and Effects of Ionizing Radiation, Report to the General Assembly with Scientific Annexes, Volume II: Effects" New York, 2000.
12. Cui, Q., Yu, J., Wu, J., Tashiro, S., Onodera, S., Minami, M., & Ikejima, T., "P53-mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Through a Caspase-3-independent" *Pharmacol Sin.*, 28 (7): 1057–1066, 2007.
13. Khalilia, W M. H. "Hücre Kültüründe Apoptozun Moleküler Mekanizmaları Üzerine Gama Radyasyonunun Etkileri", İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2015.
14. Cabadak H., "Hücre siklüsü ve kanser". *Malatya ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3): 51-61, 2008.
15. Sherr C, McCormick F., "The Rb and p53 pathways in cancer" *Cancer Cell*, 2, 103-12, 2002.
16. Muller P. A., Vousden K. H., "Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities". *Cancer Cell*, 25 (3): 304-17, 2014.
17. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A., Wahl G.M., Izpisua Belmonte J.C., "Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming". *Nature*, 460: 1140–1144, 2009.
18. Yüksek Doz Radyoaktif İyot Tedavisine Bağlı Tükruk Bezi Hasarının Önlenmesinde Amifostin, L-Karnitin ve E Vitamininin Radyoprotektif

Etkisinin Karşılaştırılması, Dr. Neşe TORUN, Uzmanlık Tezi, T.C.Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, 2009.

19. Radioisotope Brief Iodine-131(I-131) Radiation Emergencies, Department of Health And Human Services Centers For Disease Control and Prevention Safer, Healthier People, 18 Ağustos 2004.
20. Zanzonico PB: Radiation dose to patients and relatives incident to 1-131 therapy. Thyroid: 7: 199-204, 1997.
21. Kibar M, Yapar Z. “Radyonuklid Tedavi”. Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, ADANA.
22. Harbert J: The Thyroid in: Textbook of nuclear medicine. Volume II: Clinical Applications. Lea&Febiger, 1984: p.81.
23. Erdoğan G: Graves Hastalığı: Klinik Tiroid. Kelebek Matbaacılık. İstanbul; S: 177-192, 2001.
24. Lin WY, Shen YY, Wang SJ. Short-term hazards of low-dose radioiodine ablation therapy in postsurgical thyroid cancer patients. Clin Nucl Med.; 21:780–782, 1996.
25. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid; 19:1167–1214, 2009.
26. Kita T, Yokoyama K, Higuchi T, Kinuya S, Taki J, Nakajima K, et al. Multifactorial analysis on the short-term side effects occurring within 96 hours after radioiodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma. Ann Nucl Med; 18:345–349, 2004.

27. Silberstein EB. The treatment of thyroid malignant neoplasms. In: Henkin RE, Bova D, Dillehay GL, Halama JR, Karesh SM, Wagner RH, Zimmer AM, editors. Nuclear medicine. Philadelphia: Mosby Elsevier; pp. 1576–1588, 2006.
28. Jarzab B, Handkiewicz-Junak D, Wloch J. Juvenile differentiated thyroid carcinoma and the role of radioiodine in its treatment: a qualitative review. *Endocr Relat Cancer*; 12:773–803, 2005.
29. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, Oyen WJ, et al. European Association of Nuclear Medicine (EANM). Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 35:1941–1959, 2008.
30. Silberstein EB, Alavi A, Balon HR, Clarke SE, Divgi C, Gelfand MJ, et al. The SNMMI practice guideline for therapy of thyroid disease with ¹³¹I 3.0. *J Nucl Med*; 53:1633–1651, 2012.
31. Solans R, Bosch JA, Galofré P, Porta F, Roselló J, Selva-O’Callagan A, Vilardell M. Salivary and lacrimal gland dysfunction (sicca syndrome) after radioiodine therapy. *J Nucl Med*; 42:738–743, 2001.
32. Zettinig G, Hanselmayer G, Fueger BJ, Hofmann A, Pirich C, Nepp J, Dudczak R. Long-term impairment of the lacrimal glands after radioiodine therapy: a cross-sectional study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 29:1428–1432, 2002.
33. Lang BH, Wong IO, Wong KP, Cowling BJ, Wan KY. Risk of second primary malignancy in differentiated thyroid carcinoma treated withn radioactive iodine therapy. *Surgery*; 151:844–850, 2012.
34. Schlumberger M, De Vathaire F. ¹³¹iodine: medical use. Carcinogenic and genetic effects. *Ann Endocrinol (Paris)*; 57:166–176, 1996.

35. Haghpanah V. Incidence of second primary malignancies during a longterm surveillance of patients with differentiated thyroid carcinoma in relation to radioiodine treatment. *Clin Nucl Med*; 36:277–282, 2011.
36. Glanzmann C. Subsequent malignancies in patients treated with 131-iodine for thyroid cancer. *Strahlenther Onkol*; 168:337–343, 1992.
37. de Vathaire F, Schlumberger M, Delisle MJ, Francese C, Challeton C, de la Genardi re E, et al. Leukaemias and cancers following iodine-131 administration for thyroid cancer. *Br J Cancer*; 75:734–739, 1997.
38. Morgenstern KE, Vadysirisack DD, Zhang Z, Cahill KV, Foster JA, Burns JA, et al. Expression of sodium iodide symporter in the lacrimal drainage system: implication for the mechanism underlying nasolacrimal duct obstruction in I(131)-treated patients. *Ophthal Plast Reconstr Surg*; 21:337–344, 2005.
39. Bitton R, Sachmechi I, Benegalrao Y, Schneider BS. Leukemia after a small dose of radioiodine for metastatic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*; 77:1423–1426, 1993.
40. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smith JV, Wiersinga W, European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*; 154:787–803. 2006.
41. Jiang HB, Yang TJ, Lu P, Ma YJ. Gene expression profiling of gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*;18(15):2109-15. 2014.
42. Gomceli I, Demiriz B, Tez M. Gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 7;18(37):5164-70. doi: 10.3748/wjg.v18.i37.5164. PMID: 23066309. 2012.

43. McLean MH, El-Omar EM. Genetic of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19. doi: 10.1038/nrgastro.2014.143. [Epub ahead of print] Review. PMID: 25134511 Aug 2014.
44. Gomceli I, Demiriz B, Tez M. Gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* Oct 7;18(37):5164-70. doi: 10.3748/wjg.v18.i37.5164. PMID: 23066309. 2012.
45. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* Jul 15;4(7):156-69. doi: 10.4251/wjgo.v4.i7.156. PMID: 22844547, 2012.
46. Castaginola P, And W. Giaretti. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1756: 115-125, 2005.
47. http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/9.pdf (Erişim tarihi:02.07.2018)
48. <http://www.guncel.tgv.org.tr/journal/61/pdf/100394.pdf> (Erişim tarihi:02.07.2018)
49. Zabaleta J. MicroRNA: A Bridge from H. pylori Infection to Gastritis and Gastric Cancer Development. *Front Genet* 2012 Dec 14;3:294. doi: 10.3389/fgene.2012.00294. eCollection 2012
50. McLean MH, El-Omar EM. Genetic of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*19. doi: 10.1038/nrgastro.2014.143. [Epub ahead of print] Review. PMID: 25134511 Aug 2014
51. Ktudson AGJR: Mutation and cancer: Statistieal study of relinoblastorna. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820 1971.

52. Linzer DJ, Maltzman W, Levine AJ: The SV40 A gene is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. Virology 98: 308, 1979.
53. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 244:217 1989.
54. Hainaut P: Tumor-specific mutations in p53: the acid test. NatMed 8:21 2002.
55. Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>): TUMOR PROTEIN p53; TP53 (191170). (Erişim tarihi:02.07.2018)
56. Malkin D: The Li-Fraumeni Syndrome, "The Genetic Basis of Human Cancer, editörler: Vogelstein B, Kinzler KW, McGraw Hill, New York, sayfa: 393. 1998.
57. Soengas MA, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Estetler M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SC: Inactivation of the apoptosis effector *Bcl-2* in malignant melanoma. Nature 409:207 2001.
58. Fodde R, Smits R: A matter of dosage. Science 298: 761 2002.
59. Venkatesh S, Tyner SD, Pickering CR, Boiey S, Rocco L, French JE, Donehower LA: Is p53 haploinsufficient for tumor suppression? Implications for the p53^{+/−} mouse model in carcinogen testing. Toxicol Pathol 29 Suppl:147 2001.
60. Blagosklonny MV: p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain of function, and dominant-negative effect. FASEB J 14:1901 2000.

61. Harris CC, Holialcin M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressorgcne. N Engl i Med 329:1318 1993.
62. Ozlurk M: p53 mutation in hepatocellular caremoma af-tar af!atoxin cxposure. Lancet 338:1356 1991.
63. Li FP, Fraumcui Jf J: Soft lissue sarcommas, bj'cast cancer and other neoplasms: A familial cancer syndrome? Ann Intcrn Med 71:747 1969.
64. Bell, DW, Varley JM, Szydlo TE. Kang DH, Wahrer DCR, Shannon KE, Lubratovich M, Verseüs SJ, Issei-bachcr KJ, Franmeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA. Helerozygous germ line hCHK2 mulations in Li-Fraumeni syndrome. Science 286: 2528 1999.
65. IARC TP53 Database (hltn://www.iarc.fr/p53) sep;37(9):865-76 2016. (Erişim tarihi:02.07.2018)
66. Andersson S, Rylander E, Strand A, Sallstrom J, Wilan-der E: The significance of p53 codon 72 polymorphism for the devclopment of cervical adenocarcİnomas. Br J Cancer 85:1153 2001.
67. Arnold J. Levine, Jamil Momand, Cathy A. Finlay. The p53 tumour suppressor gene. Nature; 351:453-6 1991.
68. Giaccia AJ, Kastan MB: The complexity of p53 modula-tion: emerging patterns from divergent signals. Gene Dev 12:2973 1998.
69. Levine AJ. P53: The cellular gatekeeper for growth and division. Celi 88:323 1997.
70. Canman CE, Lira DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD: Acti-vation of the ATM kinase by ionizing radiation antl phosphorylation of p53. Science 281:1677 1998.

71. Linke SP, Clai-kin KC, DiLeonardo A, Tsou A, Wahl GM: A revcrsible, p53-dependent GÜ/G1 celi-cyclc ar-rest induced by ribonuclootide depîetîon in the absenee of detecteabîe DNA damage. *Genes Dev* 10: 934 1996.
72. Dreyfus DH, Nagasawa M, Kelleher CA, Gelfand **EW**: Stabte expression of Epstein-Bair virüs BZLF-İ-encoded ZEBRA protein aclivaies p53-dcpndent transcription in human Jurkat T-lymphobiastoid celis. *Blood* 96:625 2000.
73. Kamtjo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ: Functioial and physical interactions of the ARF tumor supprcssor with p53 AND Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8292 1998.
74. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu PE, Lcvy DB, Par-sons, R, Trent JM, Lin D, Mercewr WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAFI, a potentia! mediator of p53 lumor suppression. *Celi* 75:817 1993.
75. Chin PL, Moraand J, Pfcifer GP: in vivo evidencce for binding of p53 lo consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Onco-gcnc* 15:87 1997.
76. Rocco JW, Sidransky D: p(6(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Celi Rcs* 264:42 2001.
77. RudÎn CM, Thompson CB: Apoptosis and cancer: "The Genetic Basis of Human Cancer, editörler: Vogelstein B, Kinzier KW, McGraw Hill. New York", sayfa: 193. 1998.
78. Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 funetion. *Exp Celi Res* 264:56 2001.
79. Özvaran M K (2004): Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi*, 5 (2): 110-115. Ağustos 2004.

80. Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul. 2005.
81. Erdoğan B B : Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 4: 165-174. 18 ocak 2008.
82. Hıkım A P S, Wang C, Leung A R, Swerdloff S : Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology, 136 (6): 2770-2775. 1995.
83. Wright S C, Wei Q S, Kinder D H, Larrick J W : Biochemical pathways of apoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation. J. Exp. Med., 183: 463-471. 1996.
84. Smith L, Berrieman HK, O'Kane SL, Campbell A, Maraveyas A, Cawkwell L. (2006): Immunohistochemical detection of apoptotic markers in gastric cancer. Oncol Res.;15(9):441-4, 2006.
85. De Luca A, Iaquinto G. (2004): Helicobacter pylori and gastric diseases: a dangerous association. Cancer Lett. Sep 15;213(1):1-10, 2004.
86. Targa AC, César AC, Cury PM, Silva AE. (2007): Apoptosis in different gastric lesions and gastric cancer: relationship with Helicobacter pylori, overexpression of p53 and aneuploidy. Genet Mol Res. Sep 30;6(3):554-65, 2007.
87. Hasbek Z, Turgut B, Erselcan T.: p53 antibody: is it an indicator of dedifferentiated thyroid cancer? Ann Nucl Med. 2014 Jan;28(1):42-6, 2014.