

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN VİTRO ORTAMDA MDA-MB-231
KANSERLİ HÜCRE HATTINA AKTARILARAK BCL-2 GENİNİN
SESSİZLEŞTİRİLMESİ

CANAN ÇAKIR ÇOBAN

AĞUSTOS, 2014

Biyoloji Anabilim Dalında Canan ÇAKIR ÇOBAN tarafından hazırlanan siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN VİTRO ORTAMDA MDA-MB-231 KANSERLİ HÜCRE HATTINA AKTARILARAK BCL-2 GENİNİN SESSİZLEŞTİRİLMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
(Anabilim Dalı Başkanı)

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

Doç. Dr. Mustafa TÜRK
(Ortak Danışman)

Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN
(Danışman)

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Üye : Prof. Dr. Siyami KARAHAN

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

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

Doç Dr. Erdem Kamil YILDIRIM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN-VİTRO ORTAMDA MDA-MB-231 KANSERLİ HÜCRE HATTINA AKTARILARAK BCL-2 GENİNİN SESSİZLEŞTİRİLMESİ

ÇAKIR ÇOBAN, Canan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Ortak Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ağustos 2014, 111 sayfa

Kanser tedavisinde halen uygulanmakta olana kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavi uygulamalarındaki yeni gelişmelere rağmen bu tedavilerin hastaların yaşam süresine olumlu katkıda bulunduğu dair hâlâ genel kabuller oluşmamıştır. Şimdiye kadar uygulanan kemoterapi protokollerinde objektif cevap oranı %20 civarında olup, tüm kemoterapi alan grupta ortalama yaşam süresi destek tedavisi alan gruplarla benzer olmaktadır. Ancak kemoterapiye cevap veren %20'lik grupta yaşam süresi ortalama 20-24 aya kadar uzamaktadır. Kemoterapinin yüksek doz verilmesinin ve intraplevral kullanılmasının ek bir tedavi katkısı sağlamadığı da bilinmektedir.

Yeni bir teknoloji olan gen tedavisi, genel çerçevede “mevcut hastalığa neden olan gen bozukluğunun tedavisi amaçlanarak belli bir DNA'nın diğer bir hücreye isteyerek taşınması” şeklinde tanımlanabilir.

Yeni ribonükleik asit (RNA)'lerin bulunması ve işlevlerinin tanımlanmasıyla, RNA'ların canlı yaşamı için çok önemli süreçlerde rol oynadıkları belirlenmiştir. Özellikle insan genomunun %62'sini (ENCODE Consortium) kapsayan ncRNA (kodlamayan RNA)'ların hücresel savunmada, gelişimsel süreçlerde, farklılaşmada, DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve post-

transkripsiyonel susturumda görev aldıkları gösterilmiştir. ncRNA'larda meydana gelen bozukluklar birçok hastalığa yol açmaktadır. İlişkili oldukları hastalıklardan bazıları kanserler, nörodejeneratif hastalıklar, immün yetmezlik hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardır. Hastalıklardan sorumlu oldukları düşünülen ncRNA'lar, yeni tedavi yaklaşımlarında hem hedef hem de araç olarak görülmektedirler. İnsan genomundaki tüm ncRNA'ların işlevlerinin aydınlatılmasıyla yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilecektir.

Bu çalışmanın amacı meme kanseri tedavisi için zararlı proteinlerin sentezinin ilgili genin sessizleştirilmesi ile önlenmesidir. Histidinle pozitif yük kazandırılmış hema bazlı nanopartikül (PHEMAH; poli (hidroksietil metakrilat-N-metakrilol-(L)-histidin) ile siRNA'nın MDA-MB-231 meme kanser hücre hattına aktarılarak Bcl-2 geninin ekspresyonunu önleyerek apoptozu artırmaktır. Çalışmanın ilk bölümünde Histidinle pozitif yük kazandırılmış hema bazlı nanopartiküllerin zeta-sizer'da boyutları ve yükleri ölçülmüş daha sonra siRNA'ya bağlanan nanopartiküllerin elektroforezi yapılmış, bu değerlendirmeler sonucunda nanopartikül ile siRNA'ların tutunup tutunmadığı kontrol edilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise; meme kanseri hücre hattı olan MDA MB-231 üzerine siRNA yüklü PHEMAH nanopartiküller eklenmiş ve nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. RTCA ile hücrelerin hücre yaşam indeksleri belirlenmeye çalışılmıştır. MTT testi yapılarak hücre ölümüne bakılmıştır. Ölen hücrelerin apoptotik-nekrotik yollardan hangisini seçtiğinin belirlenmesi için hücreler boyanarak floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, siRNA yüklü PHEMAH nanopartiküllerinin Bcl-2 genini inhibe ederek meme kanseri hücrelerinde etkin bir şekilde proliferasyonu durdurduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bcl-2 geni, gen sessizleştirilmesi, hema nanopartiküller, kanser tedavisi, MDA MB-231 kanserli hücre hattı, PHEMAH nanopartikülü, siRNA

ABSTRACT

SILENCING OF BCL-2 GENE IN-VITRO ENVIRONMENT BY TRANSFERRING siRNA-LOADED NANOPARTICLES TO BREAST CANCER CELL LINE MDA-MB-231

ÇAKIR ÇOBAN, Canan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

August 2014, 111 pages

Despite the new approach of the chemotherapy, radiotherapy and surgical treatment which are still applied on cancer therapy, there is no evidence about that these treatments contribute to the lifespan of patients positively. Until now, the objective response rate is around 20% in chemotherapy protocols, and the lifespan of a group of patients who take chemotherapy is similar to the group of patients who take a support treatment. However, the lifespan of the 20 percent of people who respond to chemotherapy is extended to approximately 20-24 months. It is also known that high doses of chemotherapy and its intrapleural use do not contribute to treatments.

Gene therapy, which is a new technology, can be described as programmed transmission of specific DNA to other cells with the targeting of the gene disorder treatment which causes existing disease.

Discovering the new RNA's and identifying their functions, it is determined that RNA plays an important role for life. It is shown that especially ncRNA (non-coding RNA) which covers 62% of the human genome (ENCODE consortium) takes a role in cellular defence, developmental process, differentiation, DNA replication, transcription and post-transcriptional

silencing. Many disorders occurring in ncRNAs lead to many diseases. Some of the diseases that are associated with cancer, neurodegenerative diseases, immune deficiency diseases and cardiovascular diseases. ncRNA believed to be responsible for diseases are seen as new treatment approaches both target and tools. New treatment approaches can be developed with the lightening of all functions of ncRNAs in human genome.

The aim of this study is preventing of synthesise of harmful proteins for breast cancer treatment with silencing of the related gene. Increasing the apoptosis with preventing the expression of Bcl-2 gene with transmissing of siRNA to breast cancer cell line MDA-MB-231 with Hema-based nanoparticules which have gained positively charge with histidine (PHEMAH; poly (hydroxyetil metacrylate-N- metacrylole-(L)-histidine). At the first part of the study, the size and charge of Hema-based nanoparticules which have gained positively charge with histidine was measured with zeta sizer and then electrophoresis of siRNA loaded nanoparticules which are bounded siRNA was done. As a result of this assesments, wheather nanoparticules and siRNA are bounded was controlled. At the second part of the study, siRNA loaded PHEMAH nanoparticules were added on MDA-MB-231, which is breast cancer cell line, and the effect of the nanoparticules on cancer cells was observed. Cell viability index was identified with Real Time Cell Analysis (RTCA). Cell death was observed with MTT test. For determine the Apopototic-necrotic pathway of died cells, staining was done and analyzed by fluorescence microscopy. Obtained results showed that, proliferation of Bcl-2 gene at breast cancer cells was hindered effectively with inhibition of Bcl-2 gene with siRNA loaded nanoparticules.

Key words: Bcl-2 gene, gene silencing, hema nanoparticules, cancer therapy, MDA MB-231 carsinoma cell line, PHEMAH nanoparticle, siRNA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışmanın fikir sahibi olan; günlerce, yaptığım çalışmaların tüm aşamalarını bizzat kontrol edip, görüşlerini benimle paylaşarak her defasında daha iyi sonuçları almama yardımcı olan; bilgisini, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; Tez Danışmanlarımdan Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Yüksek lisansımın başladığı günden bu tezin yazımının bittiği güne kadar tüm tecrübelerini benimle paylaşan; tüm çalışmalarım boyunca benim için değerli zamanından vakit ayırıp, bu çalışmanın ortaya çıkmasında bana yardımcı olan; Tez Danışmanlarımdan Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e,

Deneyletimde kullandığım PHEMAH nanopartikülünü benimle paylaşan, Nigerian Nile University'den Sayın Dr. Veyis KARAKOÇ'a,

Hücre Kültürü Laboratuvarında yaptığım tüm çalışmalarım ve deneyletimde bana bilgi ve birikimleriyle yardımcı olan; en buhranlı anları, neşe kaynağına çevirmeyi bilen değerli arkadaşlarım Rümeyya AKÇAPINAR'a, Esra ARAT'a, Selçuk TOKLUCU'ya,

İki yıl boyunca yaptığım yazınsal ve deneysel çalışmalarım beni yalnız bırakmayan; her defasında iyi niyetli telkinleri ve bana gülen gözleriyle, moral ve motivasyonumu canlı tutan değerli arkadaşlarım Sema TUNCER'e, Gamze TURALI'ya ve Aslı AĞAR'a,

Her zaman moralimi düzelten iyi dilekleriyle beni yüreklendiren çok sevgili komşum Fatma BUDAK'a

Okul ve özel hayatımda her zaman ayrı bir yeri olan lise arkadaşım, lisans arkadaşım, yurt ve ev arkadaşım, nikah şahidim, kıymetli sırdaşım, sevgili Hilal SÜER'e,

Beni bugünlere getiren; sevgilerini, hoşgörülerini, güvenlerini, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen kıymetli annem Zarife ÇAKIR'a, babam Bayram ÇAKIR'a ve canım kardeşlerim, Çağla ve Şaban ÇAKIR'a

Yüksek lisans eğitimimi yapmam için beni teşvik eden; eğitimim boyunca her durumda maddi ve manevi desteğini yanı başımda hissettiren hayat arkadaşım ve değerli eşim Mahmut ÇOBAN'a

Sonsuz teşekkür ediyorum, saygı ve sevgilerimi yolluyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser Nedir?	4
2.1.1. Meme Kanseri	5
2.1.2. Apoptoz Önleyici Gen Bcl-2	6
2.1.3. Kanser Tedavisinde Geleneksel Yöntemler	8
2.1.3.1. Cerrahi Tedavi	8
2.1.3.2. Kemoterapi	9
2.1.3.3. Radyoterapi	10
2.1.3.4. İmmünoterapi	10
2.1.3.5. Gen Terapi	11
2.2. Gen Susturma Stratejileri	12
2.2.1. Antises Teknolojileri	13

2.2.1.1. RNA İnterferans Teknolojileri	14
2.2.1.1.1. RNA İnterferansın Mekanizması	15
2.2.1.1.1.1. RNA'ya Dayalı Gen	
Baskılamanın Merkezi.....	16
2.2.1.2. RNA İnterferansın Terapötik Uygulama Alanları	19
2.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları	20
2.3.1. PHEMAH Nanopartiküller	22
2.4. Real Time PCR	23
2.4.1. DNA bağlayıcı boya SYBR Green I	24
2.4.2. TaqMan Probe (Hidroliz Probları)	25
2.4.3. Housekeeping Genler	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Çözeltiler	30
3.3. Yöntemler	32
3.3.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
3.3.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	33
3.3.3. Agaroz - Jel Elektroforezi	33
3.3.4. İn vitro PHEMAH Nanopartiküller ile siRNA	
Hücre Etkileşimleri	34
3.3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması	35

3.3.4.2. PHEMAH Nanopartiküllerinin, siRNA'nın ve siRNA Yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB 231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	36
3.3.4.3. siRNA yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB 231 Hücrelerinde İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	39
3.3.4.4. xCELLigence RTCA ile MDA-MB 231 Kanser Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun Belirlenmesi	40
3.3.4.5. Real Time PCR Çalışmaları	42
3.3.4.5.1. Total RNA İzolasyonu	43
3.3.4.5.2. cDNA Sentezi	45
3.3.4.5.3. RT-PCR Primer Analizi.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1. PHEMAH Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	48
4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi	48
4.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Jel Elektrofrezisi Sonuçları	48
4.3. siRNA ve Nanopartiküllerin Hücre Etkileşimi Sonuçları	50
4.3.1. Kontrol siRNA ile Kontrol Nanopartikül Grubunun MDA-MB 231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi	50
4.3.2. Apoptoz/Nekroz İkili Boyama Sonuçları	53
4.3.2.1. İkili Boyama ile Elde Edilen Apoptotik İndeks Sonuçları	53
4.3.2.2. İkili Boyama ile Elde Edilen Nekrotik İndeks Sonuçları ..	59
4.3.3. Hücre Canlılık Testi Sonuçları	65
4.3.3.1. Kontrol PHEMAH grubu ve Kontrol siRNA grubunun RTCA Sonuçları	65

4.3.3.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin MDA-MB 231	
Hücreleri Üzerine Etkisi	67
4.3.4. Real Time PCR Sonuçları	72
4.3.4.1. RNA İzolasyonu	72
4.3.4.2. RT-PCR Primer Analizi	73
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	75
KAYNAKLAR	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Normal ve kanserli hücrelerde bölünme evreleri	5
2.2. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar	7
2.3. Gen Susturucu Ajanlarının Etkisi	12
2.4. RNAi Mekanizması	16
2.5. Dicer enziminin yapısı	17
2.6. siRNA'nın yapısı	19
2.7. Sybr Green I yöntemi şematik gösterimi	25
2.8. TaqMan hidroliz probunun çalışma prensibi	26
4.1. Nanopartikül boyutu sonucu	48
4.2. siRNA ve farklı konsantrasyonlara sahip PHEMAH nanopartikül lerinin birbirlerine bağlanması	49
4.3. PHEMAH nanopartiküllerinin farklı dozlardaki MDA-MB 231 hücre leri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi	51
4.4. PHEMAH nanopartiküllerinin farklı dozlarının 25 nM siRNA ile etkileşimi sonucu oluşan komplekslerin, MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi	52
4.5. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyama dan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	55
4.6. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyama dan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	56
4.7. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	57
4.8. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan	

elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	58
4.9. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekro tik hücre fotoğrafları	61
4.10. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekro tik hücre fotoğrafları	62
4.11. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekro tik hücre fotoğrafları	63
4.12. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekro tik hücre fotoğrafları	64
4.13. PHEMAH Nanopartiküllerinin hücre çoğalması üzerine etkileri	65
4.14. 25 nM kontrol siRNA'nın MDA-MB 231 hücreleri üzerinde çoğalma ya etkisi	67
4.15. Kontrol (Besiyeri), Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi	68
4.16. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi	69
4.17. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi	70
4.18. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi	71
4.19. 25 nM Bcl-2 siRNA yüklü, 0,005, 0,015, 0,020 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücrelerindeki mRNA düzeylerine etkisi	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

	<u>Sayfa</u>
3.1. MDA-MB-231 hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması için gerekli şartlar	36
3.2. MTT Testi için, 48 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğuna ayrı ayrı ekilen 10×10^3 hücre/ml MDA-MB 231 meme kanser hücreleri üzerine eklenen gruplar	38
3.3. Altı kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna ayrı ayrı ekilen 10×10^6 hücre/ml MDA-MB 231 meme kanser hücreleri üzerine eklenen gruplar	43
3.4. RNA'nın denatürasyonunu sağlamak için kullanılan RNA, primer, su miktarları gösterilmiştir	45
3.5. Her bir örnek için cDNA PCR Mix karışımı oranları	46
3.6. Her bir örnek için, hydrolysis probes master PCR karışımı'nın hazırlanması	46
3.7. Roche LightCycler 480 koşulları	47
4.1 PHEMAH Nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonları ile 25 nM siRNA'nın MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi	50
4.2. 25 nM siRNA yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi	52
4.3. siRNA'nın, kontrol nanopartiküllerin ve siRNA yüklü nanopartiküllerin ayrı ayrı meme kanseri hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksler	54
4.4. siRNA'nın, kontrol nanopartiküllerin ve siRNA yüklü nanopartikül	

lerin ayrı ayrı meme kanseri hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksler	60
4.5. MDA-MB 231 hücrelerine uygulanan siRNA yüklü nanopartiküllerin RNA derişimleri	72

KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	ATP Bağlayıcı Kaset
Bcl-2	B-Hücreli Lenfoma 2
cDNA	Komplementer DNA
chs	Chalcon (Şalkon) Sentaz Enzimi
CI	Elektrot empedansı hücre indeksi
CO ₂	Karbondioksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DsRNA	Çift sarmallı RNA
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELİSA	Enzim bağlantılı immün analiz
FBS	Fetal sığır serum
FITC	Yeşil floresan
IC50	İnhibisyon Konsantrasyonu
MDA-MB 231	İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaOH	Sodyum hidroksit
PI	Propidium İyodit
PHEMAH	poli (hidroksietil metakrilat-N-metakrilol-(L)-histidin)
RISC	RNA-indüklü susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
RNAz	Ribonükleaz
RPMI 1640	Besiyeri
RTCA	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
siRNA	Küçük müdahale edici RNA
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit

1. GİRİŞ

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üremeleri ile meydana gelen bir hastalıktır. Hücreler henüz tam bilinmeyen bir nedenle, kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar. Bu yüzden bedende hızlı hücre çoğalmasından oluşan kötü urlar oluşur ve bunlara kanser denir. Kanser, kan ve lenf sistemi yoluyla civarlarındaki dokulara ulaşarak vücudun diğer taraflarına yayılırlar. Buna metastaz denir [1]. Meme kanseri meme hücrelerinde başlayan ve akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür [2].

Her sekiz kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanacağı bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından 100 kat daha fazladır [3].

Kanser tedavilerini, klasik kanser tedavisi ve alternatif kanser tedavisi olarak iki ayrı guruba ayırmak mümkündür. Klasik kanser tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasından dolayı dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de kanser hastalarının çoğu alternatif kanser tedavisi metotlarına başvurumaktadırlar. Günümüzde kanser tedavisinde klasik yöntemler olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır [4]. Ancak bu yöntemlerin her zaman başarı göstermemesi ve yan etkilerinin bulunması araştırmacıları yeni tedavi yöntemlerine yöneltmiştir [5]. Bunlardan biri de RNAi mekanizması yolundaki artan araştırmalar sonucu siRNA (küçük müdahale edici RNA)'nın keşfidir. siRNA gen tedavisinde büyük bir devrim yaratmıştır ve gen susturulmasında yeni fırsatlar sunmaktadır. Kanser genetik temelindeki artan bilgiler siRNA gibi yeni nesil tedavilerin uygulanmasını hızlandırmıştır. Etkili, güvenilir, bir kanser tedavisi büyük ölçüde hala karşılanmamış klinik bir ihtiyaçtır; son on yıl içerisinde ilke ve amacı çok iyi tanımlanan gen tedavisinin asıl hedefi hatalı genin yerine normal genin yerleştirilmesidir [6]. Gen tedavisi, günümüzde asıl amacının yanı sıra hastalığa neden olan gen veya proteinleri baskılayacak veya

istenilen fonksiyonel protein üretimini olumlu etkileyecek, gen modifikasyonlarının aktarımı olarak da tanımlanmaktadır [7].

Gen tedavisinde istenilenler, karar verilen genin etkili ve yeterli olarak hücre içine taşınması, taşınan genin etkinliğini tedavi boyunca sürdürmesi, bu gene konakçı hücrenin cevabının uygun şekilde olması ve ayrıca bu genin diğer bir hastalığa yol açmamasıdır. Bütün bu beklentiler çerçevesinde gen tedavisinde günümüzdeki ana problem tedavi geninin kanser hücresine uygun şekilde nasıl transfer edilebileceği noktasındadır. Çünkü bu tam olarak başırlamadığı takdirde kanser hücresi dirençli klon olarak kalmaya devam edecektir. Bu noktada siRNA'nın nanopartiküllerle taşınması önem kazanmaktadır. Gen tedavisi çalışmalarının kanser üzerinde uygulanması 1992'den sonra yoğunlaşmıştır. O tarihten bu yana çok çalışma yapılmış olmasına karşın konuyla ilgili olarak sadece birkaç ilaç hasta kullanımına sunulabilmiştir [7, 8, 9, 10].

Nanopartiküller kullanılarak yapılan bu tedavideki amaç, geleneksel tedavilerdeki olumsuzlukları en aza indirmek, etken maddenin hücresel yüzeylere etkin bir şekilde taşınımını sağlamak, ilaçtan kaynaklanabilecek toksisiteyi minimuma indirmek, vücudun herhangi bir bölgesine zarar vermeden sadece tümörlü dokuya ulaştırmak ve ilacın çözünürlüğünü artırmaktır [11].

Birçok anti-kanser maddesi suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle yeni taşınma sistemlerinin geliştirilmesi açısından büyük ilgi çekmektedir. Nano taşıyıcılar, son zamanlarda kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Hedef organ ya da hücrelere tedavi edici ajanların alımını sağlamada büyük bir potansiyel gösterirler. PHEMAH (poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-histidine; poli (hidroksietil metakrilat-N-metakrilol-(L)-histidin) nanopartikülleri, bir çok yararlı özelliği ile yüksek su içeriği, düşük toksisitesi ve biyoyumluluğu gibi biyomedikal uygulamalarda geniş bir yelpazede çalışma imkanı sunarlar. PHEMAH,

yumuşak kontakt lensler, ilaç taşıyıcı sistemleri, böbrek diyaliz membranları, yapay karaciğer destek sistemleri gibi uygulamalarda kullanılmaktadır [12].

Bcl-2 (B- hücreli lenfoma 2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün önemli düzenleyicilerindendir. Bu ailede hem apoptotik hem antiapoptotik üyeler bulunmaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotik proteindir ve mitokondrinin dış membranda, nükleus membranda ve endoplazmik retikulum membranında yerleşmişlerdir. Aşırı sentezi apoptosisi engelleyerek lenfomaya neden olmaktadır. Lenfoma ve lösemiler yanında barsak, meme, akciğer ve deri kanserinde de aşırı sentezi gösterilmiştir [13].

Bu çalışmanın amacı; meme kanseri tedavisi için zararlı proteinlerin sentezinin ilgili genin sessizleştirilmesi ile önlenmesi ve Histidinle pozitif yük kazandırılmış hema bazlı bir nanopartikül olan PHEMAH nanopartikülü ile siRNA'nın MDA-MB-231 meme kanser hücre hattına aktarılarak Bcl-2 genini apoptoza yönlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

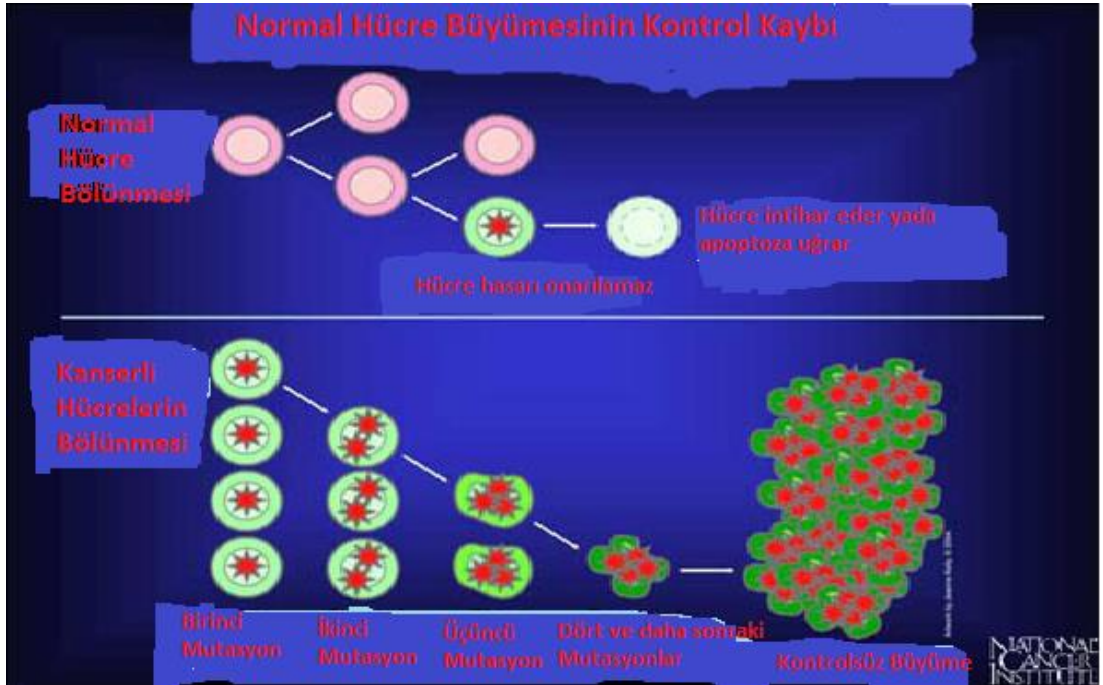
2.1. Kanser Nedir?

Hücrenin yapı ve fonksiyon bakımından normalden sapması, anormal şekilde ve gerçekte kendisinin bir yapı taşı olduğu canlının aleyhine olacak biçimde çoğalma göstermesi ve kendisi ile hiçbir ilişkisi olmayan diğer doku ve organları işgal ederek o doku ve organların görevlerinin engellemesidir [1].

Günümüzde kanserin oluş mekanizması hala tamamen anlaşılmış değildir. Ancak bilimsel bulgular kanserleşmenin tek bir hücreden başladığı ve zamanla yaygınlaştığını göstermektedir. Tek bir hücrenin kanserleşmesinden, hastalığın belirti verecek duruma gelmesine kadar geçen süre ve olaylar da tam olarak bilinmemektedir [14].

İnsan vücudu çok çeşitli hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler vücudu sağlıklı tutabilmek için gerekli olduğunda daha fazla hücre oluşturmak için büyür ve bölünürler. Hücreler yaşlandığında ya da hasarlı hale geldiğinde ölürler ve yerlerini yeni hücreler ile değiştirirler. Ancak, bu düzenli süreç bazen bozulabilir. Bir hücrenin genetik materyali (DNA), hasara ya da değişime uğrayabilir, normal hücre büyümesini ve bölünmesini etkileyen mutasyonlar oluşabilir. Bu durumda eğer vücut hücreleri ölmez ve dokularda birikirse tümör adı verilen yapıları oluşturabilirler. Tümör, genellikle köken aldıkları dokuya ve karakterine bakılmasızın vücutta oluşan anormal doku ve kitlelerdir [15]. Genel olarak kanser, vücuttaki her cins hücre veya dokudan köken alabilir. Ancak en sık deri, meme, akciğer ve sindirim sistemi dokuları kansere yol açar [15].

Kanser, hücrelerin normal büyüme kontrolünü kaybetmesi sonucu ortaya çıkar. Normal dokularda, yeni hücre büyümesi ve eski hücre ölümünün oranları dengede tutulur. Kanserli hücrelerde, bu denge bozulur. Hücre "apoptoz" adı verilen bir işlem ile intihara geçecekken bu yeteneğini kaybeder, böylece kontrolsüz hücre büyümesine neden olabilir. Apoptozis veya "hücre intiharı" eski ya da hasarlı hücrelerin normalde kendi kendini imha mekanizmadır (Şekil 2.1.) [16].



Şekil 2.1. Normal ve kanserli hücrelerde bölünme evreleri [16].

2.1.1. Meme Kanseri

Kadınlar arasında en çok görülen kanser türü olan meme kanseri, meme doku hücrelerinin kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelmektedir [17]. Hastalığın görülme sıklığı her yıl bir önceki yıla oranla dünya genelinde artmaktadır. Yapılan araştırmalar, kadınlarda meme kanseri görülme

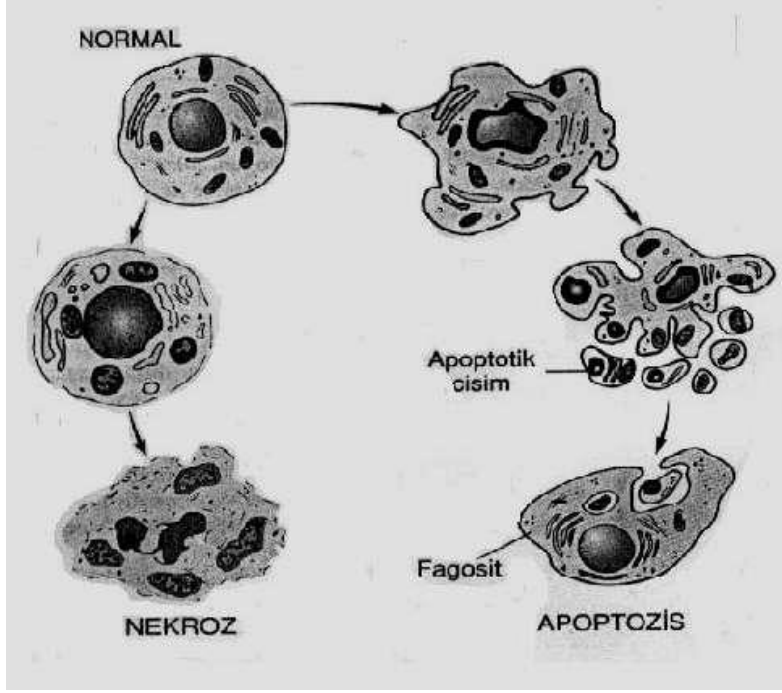
oranının; kentli kadınlarda kırsal kesimlerde yaşayan kadınlardan daha fazla olduğunu göstermiştir [18]. Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır, ancak artışının eğimi menopoza sonra azalmaktadır. Erken yaşta ergenliğe girme, geç yaşta menopoza girme, menopoza sonrası dönemde kadınlarda obezite gibi faktörler östrojen hormonunu artırmaktadır. Böylece meme kanseri riski artırmaktadır, ancak çocuk doğurmak bu riski azaltmaktadır [19].

Birçok faktör meme kanseri riskini artırmaktadır; aile hikayesi, yoğun hayat koşulları, stres, diyet, hormon kullanımı, radyasyon gibi risk faktörleri tanımlanmasına rağmen meme kanseri görülen kadınların % 70'inde hiçbir risk faktörü tanımlanamamaktadır [20].

2.1.2. Apoptoz Önleyici Gen Bcl-2

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Yunanca bir kelime olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terim kullanılmaktadır ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü ifade etmektedir [21]. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir [21, 22].

Apoptoz programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken, nekroz hasar yolu ile ölüm anlamını taşımaktadır. Hücrenin kendi içinde gerçekleşen olaylardan ziyade dış faktörler sonucu ortaya çıkar (Şekil 2.2) [23].



Şekil 2.2. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar [24].

Apoptozis, Bcl-2 ailesi üyeleri aracılığı ile gerçekleşir. Bcl-2 aile üyeleri proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere ikiye ayrılır. Proapoptotik gruba Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir. Antiapoptotik bcl-2 aile üyeleri ise bcl-2, bcl-xl, bcl-w ve mcl-1'dir [25]. Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir [26].

Bcl-2 apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspasların öncü formlarını durdurarak ya da kaspas akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C'nin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir [27].

Apoptoz bazı hastalıkların gelişiminde önemli rol oynar. Apoptoz engellendiği zaman kanser oluşumuna sebep olma ihtimali bulunan hücreler elimine edilemez. Viral enfeksiyonlar artar ve otoimmün reaksiyonlar baskılanamaz. Aksine, apoptoz arttığı zaman Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan ülseratif kolitler, AIDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklar gelişebilir [28].

2.1.3. Kanser Tedavisinde Geleneksel Yöntemler

Kanser tedavisinde seçilen yöntem büyük ölçüde tümörün evresine bağlıdır, Uygulanan tedavide tümörün yanıtı genellikle, hastanın yaşına, cinsiyetine, genel durumuna, artan yaşla birlikte azalan yaşam beklentisine ve yaşam kalitesine göre değişmektedir [29]. Başlıca kullanılan tedaviler arasında; cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapi sayılabilir [30]. Şu anda hala araştırılmakta olan yeni kanser yöntemleri arasında ise, hormonal tedavi, immünoterapi ve gen terapi sayılabilir. Her tedavinin kendi içinde farklı uygulamaları, riskleri ve yan etkileri bulunmaktadır [29].

2.1.3.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi kanser tedavisinde ana prensip, kitlesel oluşumdaki kanserli dokunun, cerrahi yöntemlerle çıkarılıp, kanserli bölgenin temizlenmesidir. Kanserli organın ya da dokunun tümü ya da bir kısmı ameliyatla alınabilir. Bazı ameliyatlarda, ufak cilt kanserlerini almak veya biyopsi gibi hafif cerrahi işlemlerdir. Diğerleri ise, kanserli dokunun vücutta bir organdan çıkarılması gibi büyük ameliyatlara kapsamaktadır. Ameliyatlarda ayrıca, vücudun bir bölümünü onarmak ya da yenilemek amacıyla da yapılabilmektedir [31].

Cerrahi yöntemler, kanserli dokunun çıkarılmasından ibarettir. Organ kaybı, kanserin tekrarlama riski ve tüm kanser tiplerine uygulanamaması bu yöntemlerin dezavantajlarındandır [32].

2.1.3.2. Kemoterapi

Kemoterapi tüm vücudu etkileyen sistemik ilaç tedavisidir. Günümüzde çok çeşitli kemoterapi ilaçları bulunmaktadır ve temel prensibi normal vücut hücrelerinden daha hızlı bölünen kanser hücrelerini yok etmek veya büyümelerini önlemektir [33]. Kemoterapinin yan etkilerinin olma nedeni vücutta hızlı bölünen hücrelerin sadece kanser hücreleri olmamasıdır. Normal kan hücreleri, gastrointestinal sistem, ağız, burun, vajen florası, saç ve tırnak gibi hızlı hücre bölünmesi gösteren normal dokular da kemoterapiden etkilenirler.

Kullanılan her kemoterapi ilaç türü kendine özgü hastadan hastaya farklılık gösterebilen yan etkiler yaratabilir. Günümüzde kemoterapi yan etkileri minimuma indirgenmiş ve bir çoğu kontrol edilebilir hale getirilmiştir. Klasik kemoterapi ilaçları vücutta hedefe yönelik hareket etmemektedir. Kullanılan ilaçlar kanserli hücrelere etki ettiği gibi sağlıklı hücrelere de etki etmektedir. Ayrıca kanserli hücrelere, tedavi için gereken dozlara da ulaşmamaktadır [34]. Kemoterapi, hastanın bağışıklık sistemini zayıflatmakta ve hasta, diğer hastalıklara daha duyarlı hale gelmektedir. Karşılaşılan bir diğer sorun da, antikanser bileşenlerine karşı gelişen Çoklu İlaça Dirençlilik (MDR; Multi Drug Resistance) durumudur. Kemoterapi ilaçlarının, dokuya özgü etki etmemesinin nedeni bu yan etkilerden kaynaklanmaktadır [35].

2.1.3.3. Radyoterapi

Radyoterapi ışınla tedavi yöntemidir. Radyasyon bir tür enerji olup, kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilir. Radyoterapi ayrıca, normal hücreleri de etkileyebilir, ancak bu hücreler daha sonra iyileşebilirler. Radyoterapi, vücudun içinden veya dışından olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Dıştan tedavide, radyasyon bir makineden doğrudan kanserli organa ve çevresindeki dokuya yönlendirilir. İçten tedavide ise, içine radyoaktif madde konulan kapsüller (tüpler) kişinin vücut boşluğuna, tümörün üzerine ya da çevresine yerleştirilir. Bu yöntem, birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılmakla birlikte cerrahi, kemoterapi veya immünoterapiyle birlikte yapılan tedavilerin bir parçası da olabilmektedir [36].

Radyoterapide kanserli hücreler, spesifik frekans bandında ve spesifik şiddette radyasyon ile yakılmaktadır. Kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerin de zarar görmesi, radyasyon dağılımının tüm kanser hücrelerine eşit yoğunlukta olmaması ve radyasyona maruz kalan dokuda fonksiyon kaybı oluşması bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır [35].

2.1.3.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi bağışıklık sisteminin tedavi edilmesi demektir. Tümör hücreleri bazı spesifik moleküllerle büyürler ve kemoterapi hücrelerdeki hücre bölünmesini engellerken antikolar da bu spesifik moleküllere engel olarak kanser hücrelerinin yayılmasını engellerler [29]. Kanserle mücadele etmesi gereken akyuvarlar dediğimiz hücrelerimiz yani lökositlerimiz ve bunların en iyi bilinenleri dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve diğerleri bu darbeleyici ve seçici olmayan tedaviler ile yok edilmekte olup kanserle baş etmesi gereken ana hücreler baştan öldürülmektedir. Tam tersi olarak da kanser kök hücreleri kemoterapi ve radyoterapinin etkisi ile giderek güçlenmekte ve hastalık daha agresif olarak artıp çoğalıp, daha yayılımcı (metastaz) bir seyir arz etmektedir [37].

2.1.3.5. Gen Terapi

Kromozomların üzerinde bulunan genler, hücre için hayati öneme sahip proteinlerin üretilmesinden sorumlu en küçük genetik birimdir. Gen tedavisi, genetik defektlerin düzeltilmesi amacıyla somatik hücelere nükleotid dizilerinin aktarımı olarak tanımlanmaktadır, bu tanıma göre gen tedavisi; eksik genlerin yerine konması, yanlış veya fazla çalışan genlerin susturulması ve bazı genlerin işlevlerinin değiştirilmesini kapsamaktadır [38].

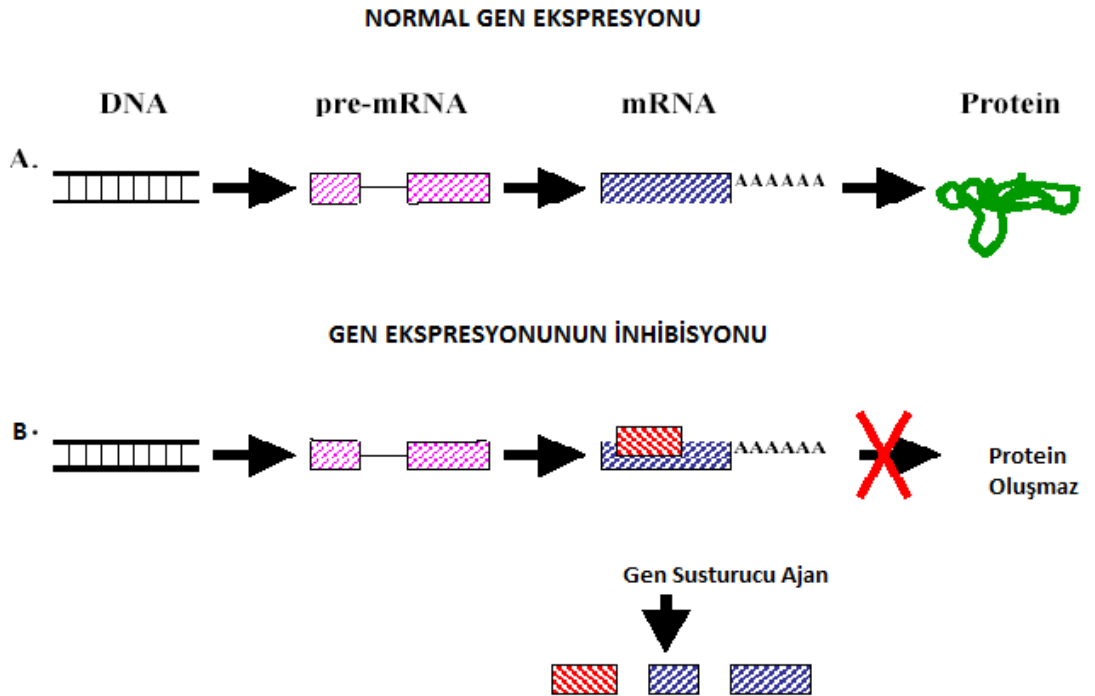
Gen tedavisi; hedef genler ve hedef hücelere kısa nükleik asit dizilerinin teslimi için kontrollü bir çözüm sunmaktadır. Ancak vektör sistemlerinin dezavantajı henüz bilinmeyen yan etkileri ile hasta ölümü gibi talihsiz olaylara yol açmakta ve kontrol edilememektedir [39, 40].

Genlerin aktarımı, iki farklı ilaç verme sistemi olan viral aracılı vektörler veya viral olmayan vektörler olarak uygulanmaktadır. Viral aracılı vektörler gen tedavisinde, bir konakçı hücreye, tedavi amaçlı genleri taşıyan genetik olarak değiştirilmiş virüsler aracılığıyla aktarılarak uygulanır. Vektör olarak kullanılan virüslere, retrovirüsler, adenovirüsler, lentivirüsler ve herpes virüsleri örnek verilebilir [41]. Bir diğer yol olan viral olmayan vektörler ise konak için daha az risk oluşturması, tekrar tekrar kullanılabilir olması, dayanıklı olması ve uygulama kolaylığı ile her geçen gün daha çekici hale gelmektedir. Viral olmayan vektörler; polimer, seramik ve metaller gibi çeşitli malzemeler kullanılarak yapılmış lipozomlar, katyonik polimerler ve doğal polimerlerdir [42]. Viral olmayan taşıma sistemlerinde, hücreler tarafından alımın yüksek düzeyde olması ve kanda hemen parçalanmaması, güvenilir olması, uygulama kolaylığı sağlaması, büyük DNA parçalarının taşınmasına izin vermesi, maliyetinin uygun olması gibi avantajlara sahipken, bununla birlikte lipozomlar yüksek düzeyde toksisiteye sahiptir; katyonik polimerler yüklerinden dolayı sitotoksite oluştururlar ve doğal polimerlerin de hücre içinde endozomal kaçışının çok düşük olması, gibi dezavantajlara da sahiptirler [6, 43, 44].

Kanser, ölüm nedenlerinin baş sıralarında yer alan karmaşık ve önemli bir hastalıktır. Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin yan etkileri, tedavinin başarısını ve etkinliğini azaltmaktadır. Günümüzde geleneksel tedaviler haricinde birçok yeni tedavi yaklaşımlarda ortaya konulmuştur.

2.2. Gen Susturma Stratejileri

Gen susturma mekanizması temel olarak genlerin kendisini veya onların kodladığı mRNA'ları hedef almaktadır. Doğrudan geni hedef alan bazı istisnai teknikler geliştirilmiş olmakla beraber, mRNA hedefli tekniklerde artış olduğu bu tekniklerle doğrudan bağlantılı olan çoğu tedavi amaçlı çabalardan anlaşılmaktadır (Şekil 2.3) [45].



Şekil 2.3. Gen Susturucu Ajanlarının Etkisi [6].

Günümüzde gen fonksiyonu araştırmalarında en etkili yöntem olan Gen Susturma stratejileri; transkripsiyonel gen susuturucuları (TGS; Transcriptional Gene Silencing) seviyesinde ve transkripsiyonel sonrası gen susturucuları (PTGS; Post-transcriptional Gene Silencing) seviyesinde olmak üzere iki farklı şekilde mümkündür [46].

Transkripsiyonel gen susturma mekanizmasında (TGS), istenilen genin ekspresyonu, protein sentezinin transkripsiyon aşamasında baskılanır. Transkripsiyonel baskılanma kromatin modifikasyonundan veya DNA metilasyonundan kaynaklanabilir [47].

Post-transkripsiyonel gen susturulması mekanizmasında (PTGS) ise, bir genden transkripte olan mRNA molekülünün diziye özgü şekilde yıkıma uğramasına veya translasyona girememesine dayanır. Böylece mRNA üzerinden protein sentezinin engellenmesi sağlanmış olur. Bu esnada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı veya şeklinde bir değişiklik olmamakta, sentezlenmiş olan mRNA'ya kodlamayan bir nükleotid zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. Bu mekanizmaya da RNA interferansı (RNAi) denir (Şekil 2.3) [48].

2.2.1. Antisens Teknolojileri

Antisens stratejileri, tamamen hedef alınan proteini kodlayan mRNA'ya ters tamamlayıcı (revers komplementer) olan bir DNA veya RNA nükleik asit zincirini hücrelere aktarmaya dayanır [49]. Antisens oligonükleotidler, hücre içinde, nükleus ve protein üretim bölgeleri arasındaki genetik bilginin iletimini baskılamaktadır [50]. İlaçların çoğu proteine bağlanarak onların fonksiyonlarını değiştirirken tek zincirli DNA veya RNA antisense oligonükleotidler, komplementer hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu engelleyebilir veya RNAz H gibi endojenik nükleazlar ya da ribozimler, DNA enzimleri gibi katalitik olarak aktif oligonükleotidler hedef mRNA'nın parçalanmasına yol açabilirler [51].

2.2.1.1. RNA İnterferans Teknolojisi

Diğer bir önemli antisens teknolojisi ise "RNA interferans" olarak adlandırılır. RNA interferans, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girdiğinde komplementer mRNA dizisine bağlanarak parçalanmasına yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır [52].

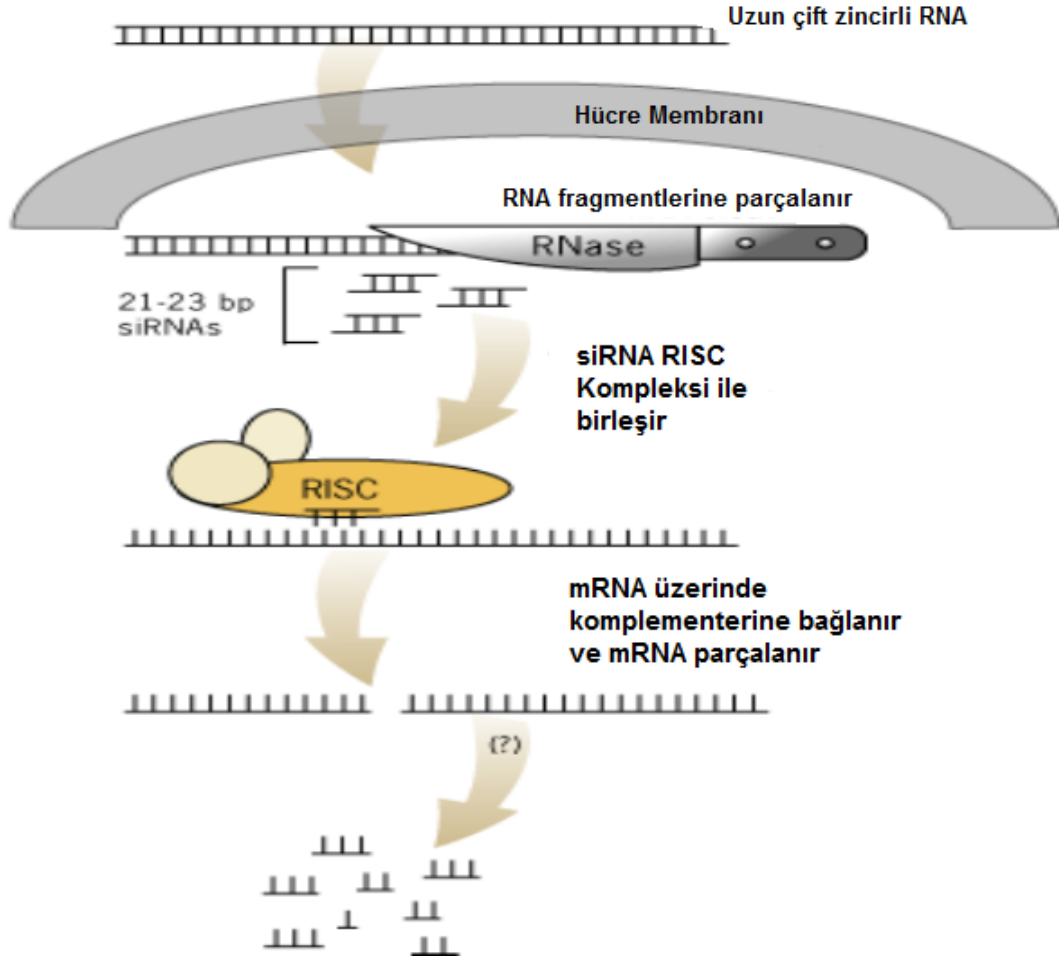
Bu konudaki ilk gözlemler 1990'ların başında transgenik bitkilerde başlamıştır. Araştırmacılar, boru çiçeklerinde daha canlı renkler elde etmek için, pempe-mor pigment yapımını sağlayan şalkon sentaz (chalcone synthase; chs) enzim geninin çok sayıda kopyasını hücrelere yerleştirmişlerdir. Çiçeklerde rengin artacağı beklenirken, renksiz bölgelerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Yapılan incelemelerde, pigment RNA'sının hücrede yapıldığı ancak proteine dönüşmeden hızla parçalandığı saptanmıştır. Bunun sebebinin şalkon sentaz geni içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonunun bir sonucu olduğunu ve bunun bir PTGC (yazılım sonrası gen sessizleştirilmesi) ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir [48]. Daha sonra bitki virologları, antiviral proteinler ile çalışırken, proteine dönüşmeyen küçük RNA parçalarının da antiviral etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Viruslara bitki genlerinin küçük bir kısmı klonlanıp, bitki bu virus ile enfekte edildiğinde, ilgili genin susturulduğu görülmüştür. Buna virusla indüklenen gen susturulması (VIGS) adı verilmiştir [53, 54, 55].

Ribonükleik asitin işlevi, Nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis elegans*'da çift-sarmallı RNA'nın (dsRNA) homolog mRNA'ları parçalanmaya sevk ettiğinin bulunmasıyla genişlemiştir [56]. 1995'de Guo ve Kempheus, *Caenorhabditis elegans*'da gen ekspresyonunu baskılamak için sense RNA'nın da antisense RNA kadar etkili olduğunu tespit etmişlerdir. 1998'de bu araştırmacılar sense ve antisense RNA'nın ortak görevini test etmek için yaptıkları çalışmada *C. elegans*'a enjekte ettikleri dsRNA karışımının gen ekspresyonunu baskılamada sense ve antisense RNA'ların tek başına gösterdikleri etkinin on katından daha fazla bir potansiyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, *C. elegans*'a bir kas proteinini

kodlayan genin belli bir segmentine ait dsRNA enjekte etmişlerdir. Bu kas proteininden yoksun *C. elegans* solucanlarda fenotipik olarak görülen seğırtme fenotipi dsRNA enjekte edilen solucanlarda da gözlenmiştir [57]. Böylece araştırmacılar protozoa, meyve sineğı, nematod, böcek, parazit, bitki, insan ve fare hücre soylarını içeren hemen hemen bütün ökaryotlarda RNA interferans'ı gözlemişlerdir [58].

2.2.1.1.1 RNA İnterferansın Mekanizması

RNAi mekanizması, uzun dsRNA'ların RNA nükleazlar tarafından ~22 nükleotidlik RNA fragmentlerine (siRNA) parçalandığı bir başlangıç adımı ve multinükleaz RISC (RNA - İndükleyici Susturucu Kompleks) kompleksine katılan siRNA'nın rehberliğinde komplementer mRNA'nın parçalanmasının gerçekleştiğı iki adımlı bir modeldir (Şekil 2.4) [58].



Şekil. 2.4. RNAi Mekanizması [6].

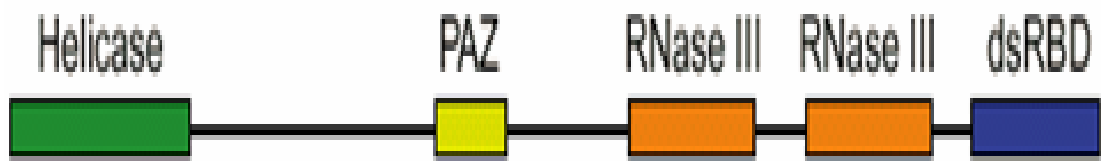
2.2.1.1.1. RNA'ya Dayalı Gen Baskılamanın Bileşenleri

RNAi, bitkilerde, solucanlarda, mayalarda ve insanlar arasında yüksek oranda korunmuş, doğal olarak oluşan biyolojik bir işlemdir. RNA'ya dayalı gen baskılama mekanizmasının bileşenlerinin bazıları başlatıcı (initiator) olarak rol alırken, bazıları etki edici (effector), çoğaltıcı (amplifier) ya da iletici (transmitter) olarak görev yapmaktadır [58].

Dicer Enzimi

İlk olarak *Drosophila melanogaster*'den izole edilen Dicer enzimi, RNase III ribonükleaz ailesinin bir üyesidir. RNase III ribonükleaz ailesine ait enzimler RNA interferansın ilk adımını başlatır. Bu nükleazlar sahip oldukları dsRNase aktivitesi ile dsRNA'ları siRNA (small interfering RNA) adı verilen 21- 23 nükleotid uzunluğunda küçük engelleyici RNA'lara parçalamaktadırlar [59, 60].

Dicer enzimi dört farklı bölgeye (domaine) sahiptir: Bir N-terminal helikaz bölgesi, bir PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille proteinleri) nükleik asit bağlama bölgesi, iki katalitik RNase III bölgesi ve C-terminalinde dsRNA bağlama bölgesi (dsRBD) bulunmaktadır (Şekil 2.5) [59]. Dicer enziminin kesim aktivitesinin arka arkaya sıralı olan iki katalitik RNase III bölgesi tarafından sağlandığı düşünülmektedir [61]. Dicer enziminin sahip olduğu helikaz bölgesi ise, bu kesim aşamasından ziyade siRNA zincirinin açılması ve tek zincirinin RISC kompleksine aktarılması sırasında rol almaktadır. PAZ bölgesi bir nükleik asit bağlama bölgesi olup, dsRNA'nın enzime bağlanmasında rol almaktadır [62].



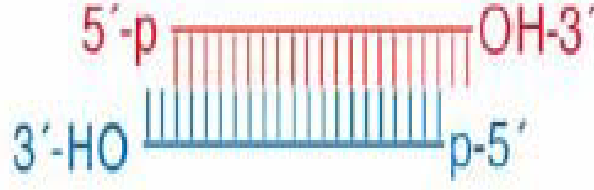
Şekil 2.5. Dicer enziminin yapısı [59].

Dicer enzimi RNA interferansın ilk adımı olan siRNA'ların elde edilmesi fonksiyonunun yanı sıra aynı zamanda daha sonraki adımda bu öncü moleküllerin RISC kompleksine yüklenmesinde de önemli rol oynamaktadır [61, 63].

RNA interferansın başlangıç adımı dicer enziminin ATP bağlı aktivitesinin olup olmadığına bağlı olarak organizmalarda farklılık göstermektedir. Drosophila gibi düşük ökaryotlarda dicer enziminin kesim aktivitesi ATP gerektirirken, memeli dicer enzimi ATP gerektirmez [61, 62]. ATP gereksinimi endonükleazlar arasında dicer enzime özgüdür. dsRNA'nın siRNA'lara parçalanması sırasında ATP'nin rolünün ne olduğu bilinmemektedir. Ancak ATP'nin siRNA'ların serbest kalabilmesi için gerekli olabileceği düşünülmektedir [64].

siRNA (Small Interfering RNA, Küçük Engelleyici RNA)

siRNA' lar, sekansa spesifik susturma ajanı olarak ortaya çıkan en son keşiflerden biridir. Uzun çift iplikli RNA (dsRNA) RNAaz pol III enzimi olan Dicer tarafından tanınır ve 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçlara sahip ve 3'- hidroksil uçlarında 2- 3 nükleotidlik çıkıntı bulunan 21- 23 nükleotid uzunluğundaki siRNA dublekslerine dönüştürülür. siRNA' lar multiprotein kompleksi olan RISC ile etkileşir. RISC kompleksindeki bir helikaz siRNA dubleksini açar ve tek iplikli siRNA'yı içeren RISC mRNA'ya komplementerize olur. RISC içinde identifiye olmamış bir RNAz (silecer) mRNA' yı degrades eder (Şekil 2.6) [6].



Şekil 2.6. siRNA'nın yapısı [65].

RISC (RNA- Induced Silencing Complex; RNA İndükleyici Baskılama Kompleksi)

RISC, nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi olup asimetric olarak siRNA'lara bağlanarak uygun siRNA zincirinin rehberliğinde komplementer hedef mRNA'yı parçalamaktadır [58]. RISC kompleks molekülleri yapılarında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içermektedirler [66].

Dicer aktivitesiyle oluşan siRNA, RISC ile etkileştiğinde siRNA'nın çift sarmalı açılır ve enzim kompleksinin aktivitesiyle hedef mRNA ile aynı baz dizisine sahip siRNA zinciri (sense dizi) uzaklaştırılır [67]. RISC; antisense diziye sahip siRNA zincirini, kendisine komplementer olan mRNA'yı Watson-Crick baz eşleşmesine göre bulması ve hibridleşmesi için rehber olarak kullanır ve bu enzim kompleksi hedef mRNA'nın 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağı endonükleaz aktivitesiyle keser [68].

2.2.1.2. RNA İnterferansın Terapötik Uygulama Alanları

RNAi, bitkilerde, solucanlarda, mayalarda ve insanlar arasında yüksek oranda korunmuş, doğal bir işlem olmakla birlikte aynı zamanda in vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak endojenik genlerin ekspresyonunu baskılamak için kullanılan biyolojik bir işlemdir. RNAi diğer tekniklere kıyasla daha hızlı ve ucuz bir metod olarak spesifik genlerin fonksiyon

araştırmalarında çok ideal bir teknik olarak etkin bir Şekilde kullanılmaktadır [69, 70].

RNAi tekniği sadece gen fonksiyonunu araştırmada değil aynı zamanda gen terapisinde de önemlidir [61, 70]. Hastalık normal bir proteinin fazla miktarda ekspresyonundan veya mutant bir proteinin ekspresyonundan kaynaklanıyor olabilir. Bu gibi durumlarda RNAi spesifik proteinin düzeyini veya onun zararlı etkilerini azaltmak için kullanılabilir [69].

RNAi' nin tedavi edici özelliği çok sayıda in vitro çalışmada gösterilmiştir. Özellikle gen sessizleştirmesi viral hastalıklarda uygulanmaktadır (HIV/AIDS, influenza, insan papillomavirus infeksiyonu, hepatit, SARS gibi), nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer gibi) ve diğer yandan da kanser, romatizma, grip, astım, hepatit-C, kas distrofileri, moleküler dejenerasyonlar, iek, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar, malaria ve romatoid arthritisi gibi hastalıklarda hayvan deneylerinde ve insanlara uygulamalarda mit veren gelişmeler bulunmaktadır [66, 71].

RNAi mekanizması, sahip olduğu spesifik olma özelliğiyle son yıllarda kansere karşı özellikle onkogenез yolağına, apoptoza, hücre döngüsü regülasyonuna, hücre yaşlanmasına, tümör-hücre etkileşimine ve geleneksel tedavilere direnç mekanizmasına ait olan genleri hedef alan potansiyel terapötik strateji olarak görülmektedir [72].

2.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları

Partikül büyüklükleri 10-1000 nm arasında değisen, doğal ya da sentetik yapıda polimerlerle hazırlanan katı kolloidal polimerik partiküler sistemlere "nanopartiküller" denilmektedir. Nanopartiküller metrenin milyarda biri kadar yani hcrenden daha küçük boyuttadırlar ve bu küçük boyutlarından dolayı gerek hücrenin yüzeyindeki gerekse hücre içindeki biyomoleküllerle kolayca etkileşebilmektedirler [73]. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, uygulanan hazırlama yöntemine bağlı olarak kendi içinde "nanoküreler" ve

“nanokapsüller” olarak ikiye ayrılırlar. Nanoküreler, etkin maddenin polimerik matriks yapı içinde çözündüğü, dağıldığı ya da kısmen adsorbe edildiği sistemler iken nanokapsüller etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek içinde bulunduğu veziküler sistemlerdir ve rezervuar sistem olarak da tanımlanmaktadır [74].

Nanoteknoloji kanser için iki genel yaklaşımda bulunmuştur; bunlardan ilki tümör hedeflemek amaçlı ilaç ve görüntüleme ajanı yüklenmiş nanopartikül gibi nano-vektörlerin geliştirilmesi diğeri de kansere dair biyolojik sinyallerin bulunabilmesi amacıyla geliştirilmiş yüksek işlem hacmine sahip nanosensörlerdir ve uygulamalar sayesinde kanserde erken teşhis ve daha iyi tedavi hedeflenmektedir [75].

Nathaniel L. Rosi ve ark. (2005) hücrelerdeki proteinin kontrolü için hücre içi gen ayarlama ajanı olarak oligonükleotid bazlı altın nanopartiküller sentezlemişlerdir. Son zamanlarda nanokristallerin protein moleküllerinin konjugasyonu üzerine çalışmalar yapılmış, bunun yanında oligonükleotitlerle ve nükleik asitlerle bağlanmasına yönelik uygulamalar da yaygın olarak çalışılmıştır. Bunun yanında CdS ve CdSe gibi nanopartiküllerinin yüzeyi immunoglobulin G (IgG) ve streptavidin ile konjuge edilmesi sonucunda canlı sisteminde kanserli hücrelerin görüntülenmesinde ve teşhisinde kullanılmıştır [76, 77].

Nanopartiküller, küçük parçacık boyutu, yüksek stabilite yeteneği, düşük toksisite, ayarlanabilir hidrofilik-hidrofobik dengesi, taşıdığı yüzey özelliği nedeniyle hedefe spesifik lokalizasyonu gibi özellikleri ile kanser tedavisinde ilgi çekmektedir. Bu nedenle polimer nanopartiküller, potansiyel olarak fizyolojik engellerin aşılması ve pasif ya da ligand aracılı hedefleme yaklaşımları ile belirli hücrelere ilaç taşıyabilir olması ile ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen örneğin proteinler, polisakkaritler gibi doğal polimerlerden oluşan nanopartiküller, ilaç dağıtımı ve kontrollü ilaç salınımı için denenmiştir. Daha sonra sentetik polimerler üzerine olan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır [12].

Kanser tedavisinde kullanılan, moleküler hedefli kanser ajanları sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerindeki molekülleri hedeflemiş ve kanser hücrelerinin direnç göstermeyeceği şekilde tasarlanmışlardır. Hücre döngüsünü, hücre ölümünü, protein sentezini, hücre büyümesini ve hücreSEL SAĞKALIMI kontrol eden genler, proteinler ve yollar kansere özgü yaklaşımda tercih edilmektedir [78].

2.3.1. PHEMAH (poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-histidine; poli (hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin) Nanopartiküller

Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca uygulanabilirler [79].

Hücre çekirdeği asıl hedeftir çünkü, hücre içinde genetik bilgi ve transkripsiyon mekanizması bulunmaktadır. Antisens tedavisi gibi yeni yöntemlerle potansiyel ilaçların hücreye taşınması ve verimi büyük ölçüde artmaktadır. Bir nükleer prob minimum seviyede şu özellikleri taşımalıdır: hücre içine girebilecek kadar küçük olmalıdır, endozomal ve lizozomal kaçışı sağlamalıdır, hücre çekirdeği gözenek kompleksi ile etkileşimi için bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) sahip olmalıdır [80].

Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır [79].

PHEMAH, yüksek su tutma kabiliyeti, düşük toksisitesi, doku uyumluluğu ile biyomedikal alanda geniş bir yelpazede yararlı özellikleri ile dikkat çekicidir. PHEMAH, yumuşak kontak lensler, böbrek diyaliz zarları, karaciğer destek sistemleri, yapay sinir kanalları, ilaç verme sistemleri gibi alanlarda hali hazırda kullanılmaktadır [12].

2.4. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu; RT-PCR)

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan güvenli, hassas, özgül in vitro DNA sentezi yöntemidir. Kısaca, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), özgül kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımıyla enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir [81].

PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur [82].

1. Denatürasyon (DNA çift zincirinin ayrılması; 90-95 °C)
2. Hibridizasyon (primerlerin bağlanması; 50-70 °C)
3. Polimerizasyon (DNA'nın sentezi; 70-75 °C)

Günümüzde PCR tekniğinin otomasyonu, her bir döngü esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılan program doğrultusunda yapan Thermalcycler adı verilen PCR otomoları yardımıyla yapılmaktadır [83].

Kısa ürünlerin elde edilmesi, kontaminasyona açık olması, Taq DNA polimerazın giderek inaktive olması ve bu nedenle PCR'ın sonlarına doğru olan döngülerde aktivitesinin sınırlanması, ortamda fenol kalıntılarının PCR'ı inhibe etmesi gibi etmenler PCR'ın kullanımını sınırlayan faktörlerdir [82].

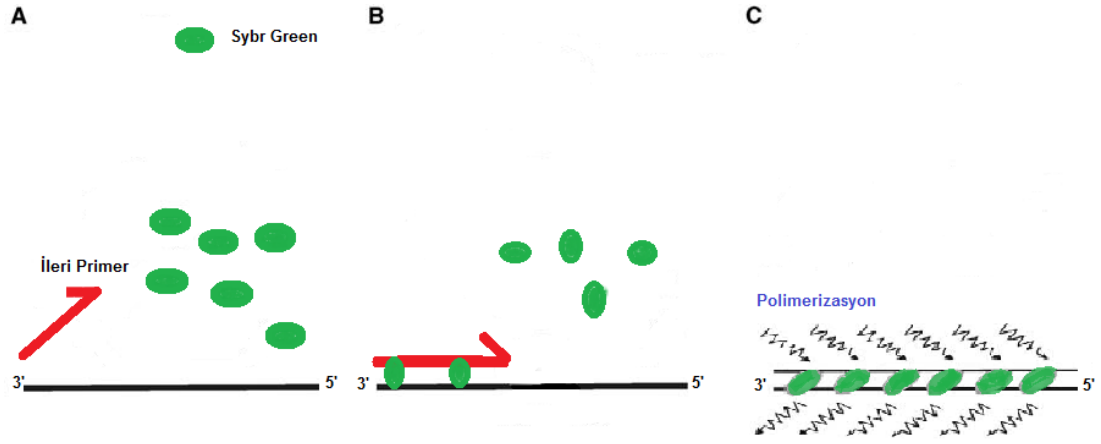
Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermalcycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur [84]. Real-time PCR teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottür. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür ve izlenebilir hale getiren floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir [85].

Bu teknikte floresan probalar kullanılarak hedef genin amplifikasyonu kantitatif olarak tayin edilir. RT-PCR'da kalıp olarak kullanılan RNA ilk olarak ters transkriptaz enzimiyle komplementer (tamamlayıcı) DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Daha sonra bu cDNA üzerinden, hedef gen primerleri, DNA'ya bağlanabilen floresan problemleri ve uygun denatürasyon, bağlanma ve uzama şartları eşliğinde hedef gen ekspresyonunun kantitatif analizi yapılır. Başarılı bir gen ekspresyon analizi için optimum primer dizaynı oldukça önemlidir. Elde edilen cDNA'da yüzlerce gen olduğu için optimize hazırlanmış primerler ilgili geni spesifik olarak amplifiye ederek spesifik olmayan amplifikasyonları da bertaraf etmiş olurlar [86].

RT-PCR tekniği, fluorensansa dayanan iki metodla gerçekleştirir:

2.4.1. DNA bağlayıcı boya SYBR Green I

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde 'sybr green', primerler ve denatüre edilmiş DNA ayrı ayrı bulunduğu için floresans yok denecek kadar azdır. Primerin hedef moleküle bağlanmasını takiben az miktarda 'sybr green' çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresans miktarı da az olmaktadır. Uzama aşamasında yeni sentezlenen çift sarmal DNA'nın yapısına gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içinde floresans derecesinde artışa neden olmaktadır [87]. Bu uygulamada floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonları göstermeyebilir. Nedeni çift sarmal DNA'ya entegre olan 'sybr green', ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedirler (Şekil 2.7) [88, 89].



Şekil 2.7. Sybr Green I yöntemi şematik gösterimi.

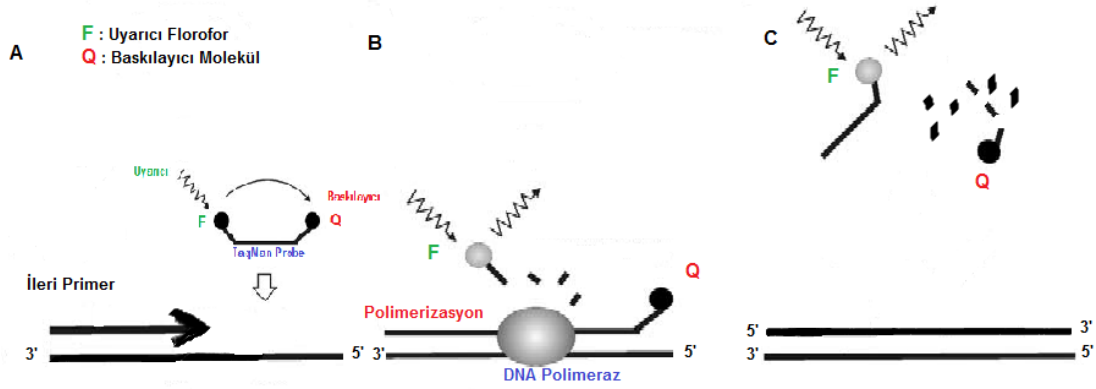
A) DNA denatüre halde ve SYBR Green molekülleri serbest durumdadır.

B) Primerler, çift zincirli DNA'ya Sybr Green moleküllerinin bağlanmasını tetikler.

C) DNA polimeraz ilerlerken daha fazla Sybr Green molekülü bağlanır ve floresans ışımaya katlanarak artmaktadır [88].

2.4.2. TaqMan Probe (Hidroliz Problemi)

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusa üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Şekil 2.8) [87, 90, 91]



Şekil 2.8. TaqMan hidroliz probunun çalışma prensibi.

- A) Hedef sekansa primerler ve prob bağlanır.
- B) DNA polimeraz, primerleri uzatır ve 5' ucundan florofor salan probu karşılaştır ve hidrolize edilir. Serbest kalan florofor ışığa yapar.
- C) DNA polimeraz, tüm probu hidrolizler ve iplik uzaması tamamlanır, şablondan ayrılır [88].

2.4.3. Housekeeping Genler

RT-PCR ve kantitatif PCR uygulamaları, hücre ve dokuların çevresel uyarılara verdikleri mRNA düzeyindeki cevabın incelenmesi için başvurulan yöntemlerdir. İki farklı örnek arasında PCR tekniği ile miktar karşılaştırması yaparken, deneysel ve örneklerin doğasından gelen farklılıklar olabilir. RT-PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için, farklı fizyolojik veya patolojik şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Normalizasyon amacıyla, çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren housekeeping genler kullanılmaktadır [92,93]. β -actin, β_2 -microglobulin, siklooksijenaz 1, gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), TBP(TATA-Bağlanma Proteini) ve HPRT(hipoksantin fosforibosil

transferaz) en yaygın olarak bilinen housekeeping genlere örnek verilebilir [94].

Real-time PCR'in Üstünlükleri

Real-time PCR'in esnekliği, hızlı PCR performansı, gün içerisinde daha fazla sonuç alma imkanı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, sonuçların bir zaman diliminde elde edilebilmesi, bilinen PCR metodlarının sınırlarını aşma olanağı, her tür laboratuvarında çalıştırılmak üzere tasarlanmış dizyanı, birçok hedefi aynı anda analiz etme gibi bir çok avantajı vardır [95].

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur [85].

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Koga ve arkadaşları [96] yapmış oldukları bir çalışmada apoptozun Bcl-2 gen seviyesiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir ve meduller tiroid karsinom TT hücrelerinin RET proto-onkogeni ile siRNA'nın transfekte edilmesiyle, tek başına siRNA'nın hücre canlılığını çok fazla etkilemediği, gen ekspresyonunu inhibe edemediği ve apoptozu çok fazla artıramadığı ancak RET ile kombinasyonunun gen ifadesini azalttığını ve hücre canlılığını azaltırken ölüm yollarından apoptozu seçtiğini göstermişlerdir.

Wang ve arkadaşları [97] başka bir çalışmada anti- apoptotik vazoaktif intestinal protein (VIP) miktarının kazın granüloza hücrelerindeki etki mekanizması değerlendirilmiştir. VIP tek başına hücrelere verildiğinde apoptozu baskıladığı, ancak Bcl-2'nin siRNA ile birlikte hücrelere verildiğinde

Bcl-2 siRNA'nın gen ekspresyonunun baskılanmış ve apoptoz miktarında artış gözlenmiştir.

Swapan ve arkadaşlarının [98] yaptıkları bir diğer çalışmada ise, insan glioblastoma hücrelerinde deri altı tümör büyümesinin engellenmesi amacıyla güçlü bir kemoretabölitik madde olan taksol ile Bcl-2 siRNA'nın birlikte apoptotik etkisi incelenmiş ve yaklaşık %70 oranında apoptozis görülmüştür.

Lima ve arkadaşları [99] ise, MCF-7 meme kanseri hücrelerine etoposid ve doksorubisin maddelerini Bcl-2 siRNA ile birlikte uygulayarak gen tedavisi yöntemini uygulamışlardır. Etoposid ve doksorubisinin tek başlarına hücrelere uygulandığında hücre sayısında önemli bir azalma olmadığını ve apoptozisi artırmadığını, Bcl-2 siRNA ile birlikte verildiklerinde ise hücre sayısında önemli bir azalma olduğunu ve apoptozisin arttığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

siRNA

RNA interferans çalışmalarında Bcl-2 genini baskılamak için kullanılan siRNA (Sens dizisi: 5'- CCGGGAGAUAGUGAUGAAGTT -3'; antisens dizisi: 3'- TTGGCCCUCUAUCACUACUUC- 5'). Biological Industries, İsrail firmasından temin edilmiştir.

PHEMAH Nanopartikül

Antikanser ilaçların kontrollü olarak taşınmasını sağlamak amacıyla polimerik nanopartikül olan, histidin yüklü PHEMAH kullanılmıştır. Nanopartikül Nigerian Turkish Nile Üniversitesi öğretim görevlisi Dr. Veyis KARAKOÇ tarafından sentezlemiş ve tarafımıza temin edilmiştir.

Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 (ATCC), besiyeri olarak RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640), (Biological Industries, İsrail) , tripsin-EDTA Solution C in PBS(Biological Industries,İsrail), Fetal Bovine Serumu (FBS; Biological Industries, İsrail), boya olarak tripan mavisi işaretlemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Çözeltiler

Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz: %1 'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Tris asetat (TAE) tamponu (x50) (pH 8): 242 g Tris base, 57,1 ml Glasiyal asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8), saf su.
- Yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0,025 bromofenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol.
- Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Sitotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Tetrazolyum Tuzu (MTT)

Sitotoksisite testinde kullanılan Standart MTT analiz kit, Biological Industries (İsrail) kullanılmıştır.

İkili Boyama (Apoptoz/ Nekroz) Solüsyonu

- Ribonükleaz A (Serva, İsrail) 1ml PBS'de 10 mg RNA
- Hoechst 33342 (Serva, İsrail) 1 ml PBS'de 200 µg
- Propidium İyodide (Serva, İsrail) 1ml PBS'de 100 µg olacak şekilde hazırlanır.

RNA İzolasyonu

RNA izole etmek için, High Pure RNA Isolation Kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Roche, Almanya) ile cDNA'lar elde edilmiştir.

Real Time PCR

Bcl-2 gen ekspresyonunun araştırılması için, LightCycler 480 Probes Master (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler, 121 °C'da 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Tüm çalışmalar süresince kullanılan bu kimyasallar, analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır. Hücre kültür çalışması, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) yapılmıştır. 48 kuyucuklu plate (BD, USA), 96 kuyucuklu plate (BD, USA), 25 cm²'lik hücre kültür flaskı (BD, USA), 0,2 µm filtre (Sartorius), 15 ml'lik santrifüj tüpü (Nunc, Almanya), mikropipet (20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya), 96 e-plate (RTCA Resistor plate 96, Roche, Almanya) tek kullanımlık pipetler (2ml, 5ml, 10ml), Etanol (Merck, Almanya), PBS (fosfat buffer saline; fosfat tamponu) (Sigma, ABD) ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İdam, Türkiye), soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya), inverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç), vorteks, elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2), karbondioksitli etüv (Binder CB150), hemositometri (İnvitrogen, Countess), xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemleri) (Roche, Almanya), hassas terazi (Mettler toledo

MS204), Qubit (İnvitrogen) cihazı, RT-PCR çalışmalarında LightCycler® 480 sistemi (Roche, Almanya) Termal Cycle Cihazı (Techne TC-Plus) kullanılmıştır.

3.3. Yöntemler

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölüm de Bcl-2 siRNA ile PHEMAH nanopartiküllerinin uygun dozlarda bir araya gelmesi sağlanmış; partikül ve siRNAların tutunduğunun gösterilmesi için elektroforez çalışması yapılmıştır. Daha sonra MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmış ve PHEMAH nanopartiküllerinin hücreye verilmesi planlanan dozların sitotoksitesinin belirlenmesi için MTT testi yapılmıştır. Belirlenen uygun siRNA ve nanopartikül derişimlerinin ardından; farklı konsantrasyonlardaki Bcl-2 siRNA'ların tümör hücreleri üzerindeki kombine etkisini görmek adına gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre sayımı yapılmış ve zamana bağlı hücre proliferasyonlarına bakılmıştır. Ayrıca kombine tedavi şeklinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi de incelenmiştir.

İkinci kısmında apoptoz/nekroz ikili boyaması yapılmış siRNA'nın, tümör hücreleri üzerindeki tekli ve ikili etkisini arttırıp arttırmadığını veya bu etkiyi nasıl devam ettirdiğini incelemek için hücrelerin ölüm yollarından hangisini seçtiği morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın son bölümünde siRNA ile baskılanan Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesini göstermek için RT-PCR uygulaması yapılmıştır. PHEMAH ve siRNA ile birlikte hazırlanan formlarının hücrelere uygulanmasından sonra Bcl-2 geninin de ekspresyon seviyelerini kontrol gruplarıyla karşılaştırmak için RT-PCR uygulanmıştır.

3.3.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan tüm nanopartiküllerin boy ve yük dağılımları Zeta-Sizer cihazında yapılmıştır. Sentez sonrası nanopartiküller 1 ml distile su (pH 5.5-6) içerisinde 0,5 mg partikül olacak şekilde yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözelti hazırlanmıştır. Polistiren küvet içerisine konulmuştur.

Sıcaklık kontrollü bir bölme içerisine yerleştirilen polistiren küvetin içindeki çözeltiden 633 nm'lik kırmızı lazer ışığı geçirilmiştir. Örnek içinden geçirilen lazer ışığından saçılan ışık 90°'ye yerleştirilen dedektör tarafından ölçülmüştür. Analiz edilen veriler direkt olarak ışık saçılmasına neden olan partiküllerin difüzyon katsayılarını vermektedir.

3.3.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

siRNA/Nanopartikül komplekslerinin hazırlanması için uygun miktarlarda siRNA ve nanopartikülün bir araya gelmesi gerekmektedir. Öncelikle farklı konsantrasyonlardaki siRNA'lar ile nanopartiküller etkileştirilerek tutunup tutunmadıkları jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir.

3.3.3. Agaroz - Jel Elektroforezi

Bu çalışmada; nanopartiküllerle farklı oranlarda etkileştirilmiş siRNA'ların partiküller tarafından tutulup tutulmadığı gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Agaroz jel %1'lik olarak hazırlanmıştır.

DNA'nın elektroforetik hareketliliği için elektroforez tamponu hazırlanmış ve etidyum bromid ile boyanmıştır. 25 nM siRNA ile 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,0375, 0,05 mg/ml dozlarda PHEMAH nanopartikülleri bir araya getirilerek 30 dakika oda sıcaklığında birbirlerine tutunmaları için inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 µl siRNA-NP karışımından, 2 µl bromofenol yürütme tamponundan alınarak, elektroforez kuyucuklarına hazırlanan örnekler yüklenmiş ve 90 Volt/Amper'de 30-40 dakika yürütülmüştür. Daha

sonra akım kapatılıp jel UV ışığı altında görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.3.4. İn vitro PHEMAH Nanopartiküller ile siRNA Hücre Etkileşimleri

Hücre kültürü, canlı doku veya organlardan izole edilen hücrelerin yapay besi ortamlarında üretilmesi ve üretilen hücrelerin de in vitro koşullarda büyütülmesi ve çoğaltılması esasına dayanır. Kültürü yapılan ökaryotik hücreler; fibroblast gibi bağ doku hücreleri, epitelyal hücreler, nöral hücreler, düz kas hücreleri, endokrin hücreler ve çeşitli tümör hücreleridir. Ökaryotik hayvan hücrelerinin dışında, bitki, fungi, virüs ve bakteri kültürü de yapılmaktadır [100].

Hayvansal hücre kültürleri için besi ortamını oluşturan bileşenler; esansiyel ve non-esansiyel aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikler, Fe, Zn, Se gibi iz elementler, Na, K, Ca, Mg, Cl, P, NaHCO₃, CO₂ gibi iyonlardır [101].

Hücre kültürü; çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, tümör tedavisi, kanser araştırmaları (in vitro toksikoloji), somatik gen tedavisi, kemik iliği nakli, hormon üretimi, yapay deri üretimi, doku ve deri mühendisliği, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalarda, aşı üretimi, kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavileri, farmasötik proteinlerin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

3.3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması

Dondurulmuş şekilde -80 °C de derin dondurucuda bulunan kriyotüplerdeki MDA-MB-231 hücreleri derin dondurucudan alınmış 37°C 'de kısa sürede çözündürülmüş ve steril laminar flow kabin içerisinde çözülen hücreler 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmış, üzerine 1ml %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren RPMI-1640 besiyeri ilave edilmiştir (Çizelge 3.1). 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş, santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve pellet 3'er ml besiyeri ile süspansiyon edilip 25cm² lik flasklara aktarılmıştır. Flaskların kapağı hafif gevşetilmiş ve 37 °C de %5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandığında kültürler tripsinize edilerek 1/4 pasaj yapılmış ve hücreler yeni flasklara aktarılmıştır.

Hücrelerin pasajlanması işleminde; flask inkübatörden alınmış ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki besiyeri atılmış ve 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilmiş, flask 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlenmiştir. Ardından flaskta besiyeri eklenmiş hücreler falkon tüpe aktarılmış 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspansiyon edilmiştir.

Çizelge 3.1. MDA-MB-231 hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması için gerekli şartlar.

Hücre Türü	Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231)
Kültür Kabı	25 cm ³ lük polistren flask, yüzeyi hücre tutunmasına uygun
Kültür Vasatı	%10 Fetal sığır serumu içeren RPMI-1640; %1 penisilin streptomisin
Rutin sub-kültür	¼
Kültür Özelliği	Tek tabaka
Toplam Hacim	3 ml
Ph	7,2-7,5
Sıcaklık	37±0,5°C
İnkübasyon Ortamı	% 5'lik CO ₂ etüvü

3.3.4.2. PHEMAH Nanopartiküllerinin, siRNA'nın ve siRNA Yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri flasklarda çoğaltılmış %70-80 oranında yüzeyi kapladıktan sonra hücre vasatı atılmış, 0,5 ml PBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra hücrelere 0,5 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve flask 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska 1 ml taze besiyeri ilave edilmiş, hücreler falkon tüpe aktarılmış 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiş ve süspanse edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için

hücreler tripan mavisi ile boyanmış, otomatik hücre sayım cihazı (Cell Counter) ile sayılmıştır. Bu sayımda mavi boyanmış hücreler ölü, parlak ve boyanmamış hücreler canlı hücreleri göstermektedir.

Çalışmanın bu kısmında; kontrol amaçlı tek başına nanopartiküller (PHEMAH) ile yine kontrol amaçlı tek başına siRNA örnekleri ve siRNA/Nanopartikül karışımları kullanılarak MDA-MB 231 kanser hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

PHEMAH nanopartiküllerinin ve siRNA yüklü nanopartiküllerin sitotoksitesini belirlemek amacıyla MDA-MB 231 hücreleri 48 kuyucuklu plaklara 10×10^3 hücre/ml konsantrasyonda ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra 48 kuyucuklu plaklardaki hücre vasatı atılmış ve hücre besiyeriyle dilue edilmiş ve ependorf tüplerine 1 ml distile suda 0,5 mg/ml nanopartikül bulunacak şekilde hazırlanan karşımdan farklı dozlardaki PHEMAH nanopartiküllerinin (0,005, 0,01, 0,015, 0,020 mg/ml) üzerlerine ayrı ayrı 25 nM siRNA ilave edilmiştir. Tutunmanın sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra üç tekrarlı olacak şekilde plate kuyucuklarına hücrelerin üzerine eklenmiştir. Kontrol grubu olarak farklı konsantrasyonlarda alınan nanopartiküller (0,005, 0,01, 0,015, 0,020, 0,025, 0,0375, 0,05 mg/ml) MDA-MB 231 hücrelerinin üzerine ilave edilmiştir. Plaklar 48 saat 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra plaktaki vasat atılmış ve kuyucuklara 100 µl taze besiyeri ve 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml, PBS ile seyreltilmiştir) eklenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklara 150 µl DMSO ilave edilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

Yapılan MTT testinde, 48 kuyucuklu plakların son sütunundaki altı kuyucuk kontrol çalışması olarak kullanılmıştır ve hücreler besiyerinin haricinde herhangi bir aktif madde ile muamele edilmemiştir. Farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküller üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hazırlanan siRNA/Nanopartikül karışımları da üç tekrarlı olarak çalışılmıştır (Çizelge 3.2). Kontrol plağından alınan absorbanların ortalaması %100 kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları

ile mukayese edilmiştir ve ilaçların sitotoksitesisi Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır [102].

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = ((\text{OD570(numune)}) / (\text{OD570(kontrol)})) \times 100 \quad (3.1)$$

Çizelge 3.2. MTT Testinde kullanılan 48 kuyucuklu plakaya ekilen 10×10^3 hücre/ml MDA-MB 231 meme kanser hücreleri üzerine eklenen gruplar.

	Konsantrasyonlar
1.Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA+ 0,005 mg/ml PHEMAH
2.Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA+ 0,010 mg/ml PHEMAH
3.Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA+ 0,015 mg/ml PHEMAH
4.Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA+ 0,020 mg/ml PHEMAH
5.Kuyucuk	Besiyeri 0,005 mg/ml PHEMAH
6.Kuyucuk	Besiyeri 0,010 mg/ml PHEMAH
7.Kuyucuk	Besiyeri 0,015 mg/ml PHEMAH
8.Kuyucuk	Besiyeri 0,020 mg/ml PHEMAH
9.Kuyucuk	Besiyeri 0,025 mg/ml PHEMAH
10.Kuyucuk	Besiyeri 0,0375 mg/ml PHEMAH

11.Kuyucuk	Besiyeri 0,05 mg/ml PHEMAH
12.Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA
13.Kuyucuk	Kontrol (Sadece Besiyeri)

3.3.4.3. siRNA yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB-231 Hücrelerinde İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında; kontrol grubu nanopartiküller (PHEMAH), kontrol grubu siRNA ve siRNA+Nanopartikül karışımları kullanılarak MDA-MB 231 kanser hücre kültürlerinde apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

MDA-MB-231 hücreleri 48 kuyucuklu plaklara 10×10^3 hücre/ml konsantrasyonda ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra 48 kuyucuklu plaklardaki hücre vasatı atılmış ve hücre besiyeriyle seyreltilmiş, ependorf tüplerine 1 ml distile suda 0,5 mg/ml PHEMAH nanopartikülü bulunacak şekilde hazırlanan karışımdan farklı dozlardaki nanopartiküllerin (0,005, 0,01, 0,015, 0,020, mg/ml) üzerine ayrı ayrı 25 nM siRNA eklenmiştir. Nanopartikül/siRNA bağlanmasının sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra üç tekrarlı olacak şekilde plak kuyucuklarında bulunan hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. Kontrol grubu olarak farklı konsantrasyonlarda alınan nanopartiküller (0,005, 0,01, 0,015, 0,020 mg/ml) MDA-MB 231 hücrelerinin üzerine eklenmiştir. Plaklar 48 saat 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra plaktaki vasat atılmış ve her kuyucuğa 70 µl ikili boyama solüsyonu (apoptoz/nekroz çalışma solüsyonu) eklenmiştir. 48 kuyucuklu plak hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. İkili boyama solüsyonu içerisinde Ribonükleaz A, Hoechst 33342 floresan boyası, Propidium Iodide kullanılmaktadır. Değerlendirmede normal, apoptotik olmayan hücreler, çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün değil ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir. İkili boyama sonucunda apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. Ribonükleaz A, RNA'yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. İkili boyamada kullanılan diğer boya PI ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere girememekte ve bu hücreler PI ile boyanmamaktadırlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girmekte ve çekirdeği kırmızıya boyamaktadır. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülmektedir.

3.3.4.4. xCELLigence RTCA ile MDA-MB 231 Kanser Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun Belirlenmesi

xCELLigence sistemi, etiketleme gerektirmeyen gerçek zamanlı hücre sayım cihazıdır. Sistem elektriksel empedansı ölçerek çalışmaktadır. Empedans ölçümü yaşayan hücre sayısı ve morfolojisi hakkında niceliksel bilgiler vermektedir.

Elektrotların üzerindeki hücrelerin varlığı, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki iyonik ortamı etkiler, bunun sonucunda da elektrot empedansı artar. Ne kadar çok hücre elektroda tutunursa, empedanstaki artışta o kadar çok olur. Elektrot empedansı hücre indeksi (CI) olarak adlandırılır. Eğer ortamda hücre

yoksa veya hücreler elektroda iyi tutunmadıysa CI değeri sıfır olur. Elektroda ne kadar çok hücre tutunursa, CI değeride o kadar çok büyür.

MDA-MB 231 kanser hücreleri normal flasklarda çoğaltılmış belli bir sayıya ulaşıldıktan sonra hücrelere 0,5 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve flask 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska besiyeri eklenmiş hücreler falkon tüpe aktararak 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 ml RPMI-1640 besiyeri eklenmiş süspanse edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA SP instrument, Roche, Almanya) ile hücre IC50 (inhibisyon konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir. Hücreler 5000 hücre/ml olacak şekilde altın kaplı 96 kuyucuklu plağa (E-plate) ekimi yapılarak hücrelerin bir gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilmiştir. E-plate'in her kuyucuğuna 100 µl besiyeri koyulmuştur. E-plate etüvde bulunan xCELLigence'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenmiştir. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarılmıştır. Her bir kuyucuğa 100'er µl içerisinde 5000 hücre olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Tekrar e-plate etüve yerleştirilmiş, 10 dakika beklendikten sonra okuma başlatılmıştır. Hücrelerin plağa tutunması ve çoğalması için 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda hücreler çoğalma fazına geçtiğinde E-plate etüvden çıkarılmış, kuyucuklardaki besiyeri atılmış ve farklı derişimlerdeki kontrol nanopartiküller, kontrol siRNA'lar, siRNA-Nanopartikül karışımları, hücreler üzerine ilave edilmiştir. 100 saat süre ile kültürü yapılmış ve 10 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alınmıştır. Böylece cihaz monitöründen zamana bağlı hücre proliferasyonu kayıt edilerek gözlenmiştir. Sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonu gösteren bir grafik ve yine zamana ve miktara bağlı IC50 değerlerini gösteren bir grafik elde edilmiştir.

3.3.4.5. Real Time PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında Bcl-2 geninin siRNA'lar ile mRNA seviyesinde inhibe edildiğini göstermek amacıyla Real Time PCR analizi yapılmıştır.

MDA-MB-231 kanser hücreleri 6 kuyucuklu plaklara 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Plaklarda tutunan hücrelerin üzerine üç tekrarlı olarak örnekler Çizelge 3.4' de gösterildiği gibi uygulanmıştır. Sadece siRNA ile etkileşecek hücrelerin üzerine son hacim 1,5 ml besiyerinin içinde 25 nM siRNA olacak şekilde uygulanmıştır. siRNA/Nanopartikül kompleksleri için son hacim 1,5 ml besiyerinin içinde konsantrasyonları 25 nM siRNA + 0,005 mg/ml PHEMAH, 25 nM siRNA + 0,015 mg/ml PHEMAH, 25 nM siRNA + 0,020 mg/ml PHEMAH olacak şekilde siRNA'lar 20 μ M stok siRNA'dan RNase-free water ve serumsuz besiyeri ile dilue edilerek hazırlanmıştır. PHEMAH stok 0,5 mg nanopartikülün 1 ml distile su (pH=5,5-6) içerisinde dağıtılması ile hazırlanan nanopartiküller; siRNA'lara sırasıyla 0,005, 0,015, 0,020 mg/ml olarak ilave edilip vortekslenmiş ve sonikatörde karıştırılmıştır. siRNA ve nanopartiküllerin birbirlerine tutunabilmesi için yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan alınan hücrelerin vasatı atılmış ve farklı derişimlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. 30 dakika etüvde bekletilen plaklar alınmış, son hacim 1350 μ l besiyeri olacak şekilde serumsuz besiyeri hücre gruplarının üzerine eklenmiş tekrar etüve alınmıştır. 4 saat sonra hücrelere 150 μ l serum eklenmiş son hacim 1,5 ml' ye tamamlanmıştır. Plaklar bu andan itibaren 48 saat 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. 6 kuyucuklu plakarın her bir kuyucuğuna ayrı ayrı ekilen 10×10^6 hücre/ml MDA-MB 231 meme kanser hücreleri üzerine eklenen gruplar.

	Konsantrasyonlar
1. Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA + 0,005 mg/ml PHEMAH
2. Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA + 0,015 mg/ml PHEMAH
3. Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA + 0,020 mg/ml PHEMAH
4. Kuyucuk	Besiyeri 25 nM siRNA
5. Kuyucuk	Kontrol (Sadece Besiyeri)

3.3.4.5.1. Total RNA İzolasyonu

Çizelge 3.4.'teki gruplarla 48 saat inkübe edilen hücrelerden, her bir örnekten RNA izolasyonu yapmak için aşağıdaki işlem takip edilmiştir (High Pure RNA Isolation Kit, Version 12).

- 1- Kuyucuklardan besiyeri atılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır.
- 2- % 0,25 tripsin ile hücreler kaldırılmıştır.
- 3- Falkon tüplerde 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- 4- Süpernatant atılmış ve 200 µl PBS ile hücrelerin pellet kısmı mikropipet ile çekme bırakma işlemi yapılarak homojen hale getirilmiştir.

- 5- Hücrelerin bulunduğu falkon tüplere 400 µl parçalama çözeltisi (Lizis-Buffer) ilave edilmiş ve 15 sn vortekslenmiştir.
- 6- Falkon tüp içerisindeki hücreler Max. 700 µl olacak şekilde kolona aktarılmıştır ve 15 sn 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
- 7- Kolonun altındaki sıvı atılmıştır. 90 µl DNase inkübasyon tamponu ve 10 µl DNase I karışımı eklenmiş mikropipetle karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.
- 8- 500 µl yıkama çözeltisi 1 (Wash Buffer I) ilave edilmiş ve 8 000 g de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- 9- 500 µl yıkama çözeltisi 2 (Wash Buffer II) ilave edilmiştir.
- 10- Daha sonra kolonun altındaki sıvı atılmış, ikinci kez 200 µl yıkama çözeltisi 2 (Wash Buffer II) ilave edilmiş ve 8 000 g de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- 11- Kolonun altındaki sıvı atılmış, altta bulunan tüpler temiz 1,5 ml'lik santrifüj tüpleri ile değiştirilmiştir.
- 12- 100 µl ayırma çözeltisi (Elution Buffer) eklenmiş, 8 000 g' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 13- Daha sonra kolonlar atılmış, tüplerin kapakları kapatılmıştır.

cDNA'ya dönüştürme reaksiyonundan önce elde edilen RNA'ların konsantrasyonları örneklerden 1'er µl alınarak Qubit (İnvitrogen) cihazı ile ölçülmüştür.

3.3.4.5.2. cDNA Sentezi

Her bir gruptan izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için aşağıdaki protokol takip edilmiştir (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti, Versiyon 08).

- 1- İlk olarak RNA'lardan cDNA sentezi için elde ettiğimiz her bir derişimdeki RNA örneklerine, primer ve su karışımını son hacim 13 µl olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). 65°C 'de 10 dakika Termal Cycle Cihazında (Techne TC-Plus) inkübe edilmiştir. Bu adım RNA'nın denatürasyonunu sağlamak için uygulanmıştır.

Çizelge 3.4. RNA'nın denatürasyonunu sağlamak için kullanılan koşullar.

Total RNA	RNA miktarına bağlı olarak su ve primer en az seviyede seçilerek son hacimden çıkarılarak belirlenir.
Primer	1 µl
Su	(son hacim 13'e tamamlanacak şekilde RNA miktarına göre değişebilir)
Son hacim	13 µl

- 2- Daha sonra PCR karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Her bir santrifüj tüpüne 7 µl PCR karışımından ilave edilmiş ve son hacim 20 µl olmuştur.

Çizelge 3.5. Her bir örnek için cDNA PCR karışımı oranları.

Transcription Reverse Buffer	4 µl
Protector RNase Inhibitör	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptaz	0,5 µl
Son hacim	7 µl

3- Isı döngüleyici kullanılarak önerilen geri transkripsiyon mekanizması koşulları uygulanmıştır. Termal Cycle Cihazında 55 °C de 30 dakika, 85 °C de 5 dakika inkübe edilmiştir. Böylece cDNA elde edilmiştir.

3.3.4.5.3. RT-PCR Primer Analizi

Gen ekspresyonu çalışmasında aşağıdaki işlemler takip edilmiştir (LightCycler 480 Hydrolysis Probes Master Kiti, Versiyon 9)

Çizelge 3.6. Her bir örnek için, hidroliz prob PCR karışımı.

Su	4 µl
LightCycler 480 Probes Master	10 µl
Real Time Ready Assay	1 µl
Son hacim	15 µl

Hazırlanan PCR karışımı vorteks kullanılmadan mikropipet ile çekme bırakma yapılarak karıştırılmıştır. LightCycler 480 multiwell plate'in her bir kuyucuğuna PCR karışımından 15 µl (Çizelge 3.6) ve üzerine 5µl cDNA örneklerinden eklenmiş olup kuyucuklardaki son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Multiwell Plate 1 dk 1000 g de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirilmiş kullanılacak olan MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe programı seçilmiştir. UPL Probe için gerekli protokoller cihazda seçildikten sonra LightCycler 480 PCR başlatılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Roche LightCycler 480 koşulları.

	Sıcaklık- Zaman	Döngüler
Ön İnkübasyon Evresi	95°C'de 10 dk	1
Büyüme Evresi	95°C'de 15 sn	45
Soğutma Evresi	72°C'de 1 sn	1

mRNA ifadenmesi rölatif ölçümü, hedef genler ve referans genler arasındaki Ct (Cycle threshold; ΔR_n de önemli artışın olduğu ilk döngü sayısını ifade eder) değerleri karşılaştırılarak gösterilmiştir. Kullanılan yöntem de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri her bir örnek için ayrı ayrı hesaplanmıştır [103].

$$\Delta\Delta Ct = ((C_{T,Target} - C_{T,Ref.}) - (C_{T,Target} - C_{T,Ref.}))$$

$$\text{Hedef genin ekspersyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.2)$$

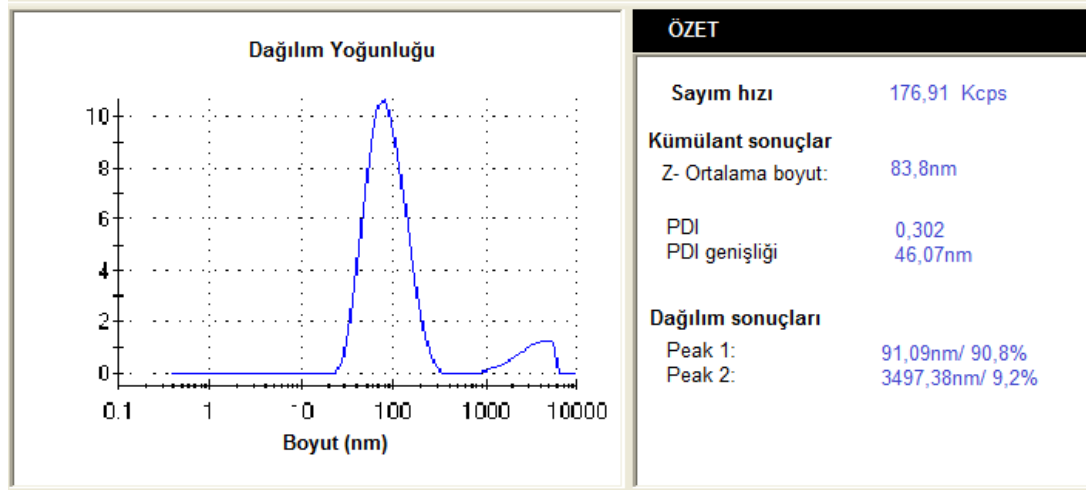
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. PHEMAH Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

PHEMAH partiküller boyut dağılımı, yüzey yükü özellikleri incelenerek karakterize edilmiştir.

4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi

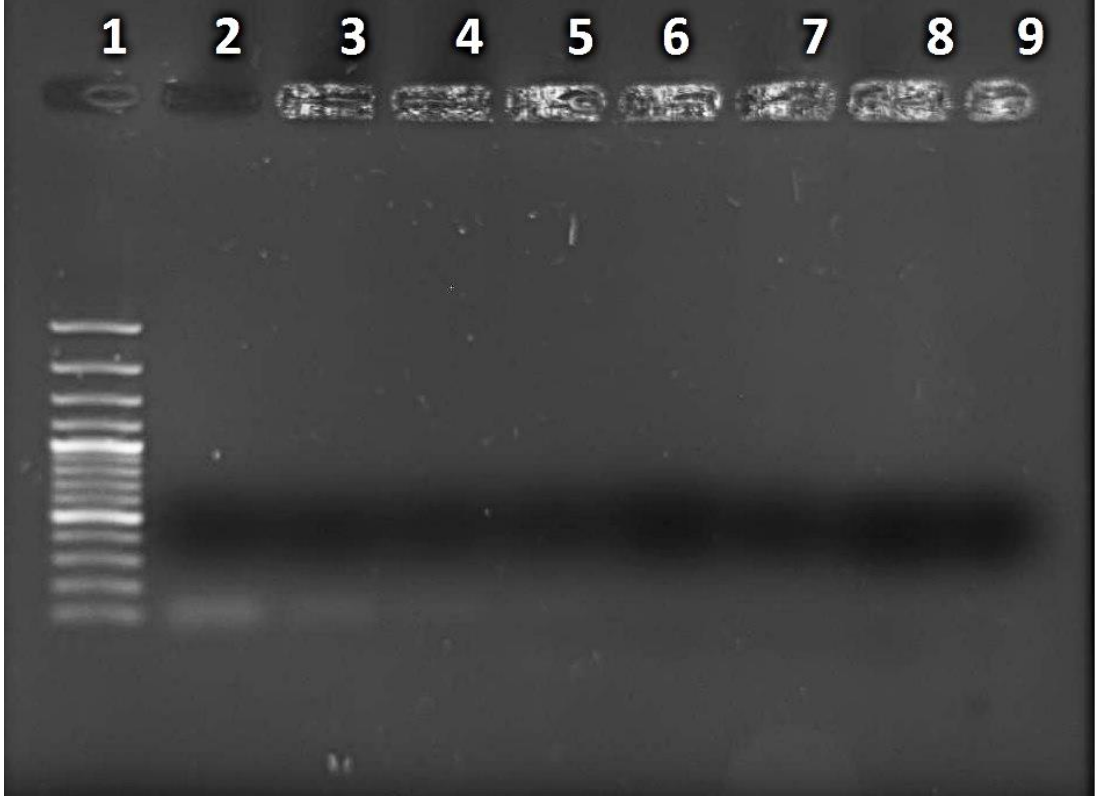
PHEMAH nanopartiküllerinin boyut dağılımları Zeta-Sizer cihazında yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PHEMAH nanopartiküllerinin boyut dağılımları.

4.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlara sahip nanopartiküllerin siRNA'lara bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için, örnekler %1'lik agaroz jel elektrofrezisinde yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. siRNA ve farklı konsantrasyonlara sahip PHEMAH nanopartiküllerinin birbirlerine bağlanması.

1- Marker (Fermentas 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp); **2-** siRNA (kontrol), **3-** 25 nM siRNA + 0,005 mg/ml; **4-** 25 nM siRNA + 0,01 mg/ml, **5.-** 25 nM siRNA + 0,015 mg/ml, **6-** 25 nM siRNA + 0,02 mg/ml, **7-** 25 nM siRNA + 0,025 mg/ml; **8-** 25 nM siRNA + 0,0375 mg/ml; **9-** 25 nM siRNA + 0,05 mg/ml

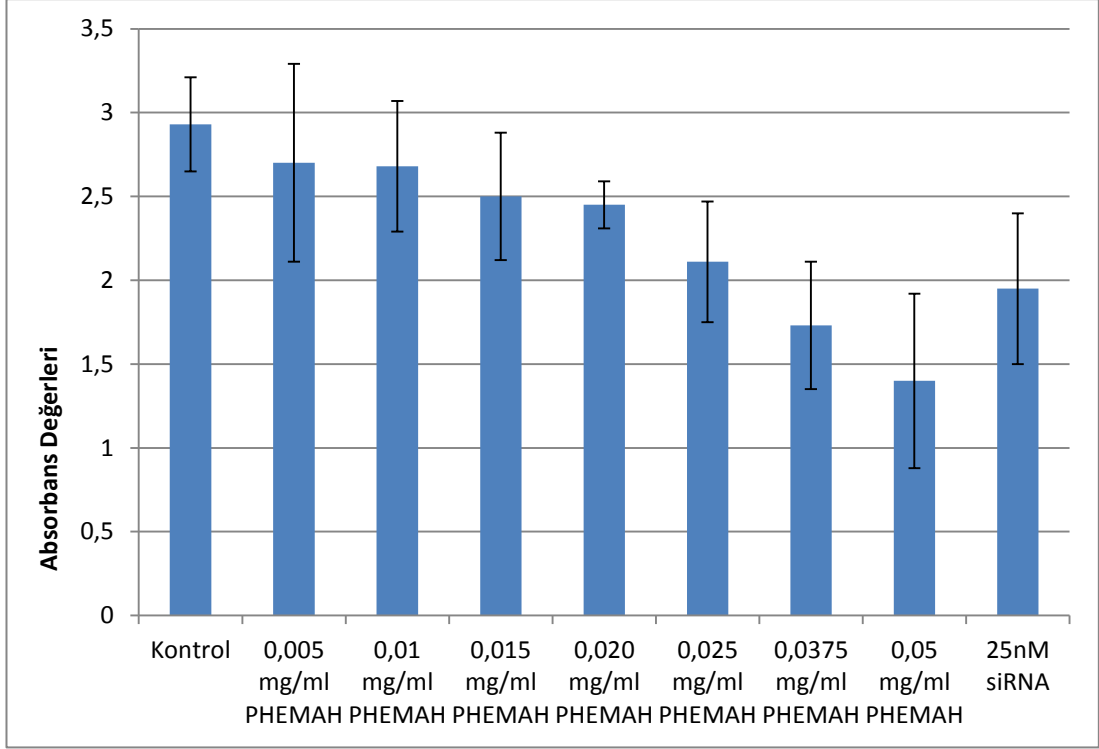
4.3. siRNA ve Nanopartiküllerin Hücre Etkileşimi Sonuçları

4.3.1. Kontrol siRNA ile Kontrol Nanopartikül Grubunun MDA MB-231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

Bu çalışmada 25 nM siRNA ve 0,05, 0,01, 0,015, 0,020, 0,025, 0,0375, 0,05 mg/ml derişimlerindeki nanopartiküllerin MDA MB-231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri MTT testiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. PHEMAH Nanopartiküllerinin farklı derişimleri ile 25 nM siRNA'nın MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi

Örneklerin Konsantrasyonları	MTT (Absorbans Değerleri)	% canlılık
Kontrol (0 mg/ml)	2,93 ±0,28	100
0,005 mg/ml PHEMAH	2,70 ±0,59	92,15
0,01 mg/ml PHEMAH	2,68 ±0,39	91,46
0,015 mg/ml PHEMAH	2,50 ±0,38	85,32
0,020 mg/ml PHEMAH	2,45 ±0,14	83,61
0,025 mg/ml PHEMAH	2,11 ±0,36	72,01
0,0375 mg/ml PHEMAH	1,73 ±0,38	59,04
0,05 mg/ml PHEMAH	1,40 ±0,52	47,78
25 nM siRNA	1,95±0,45	66,55



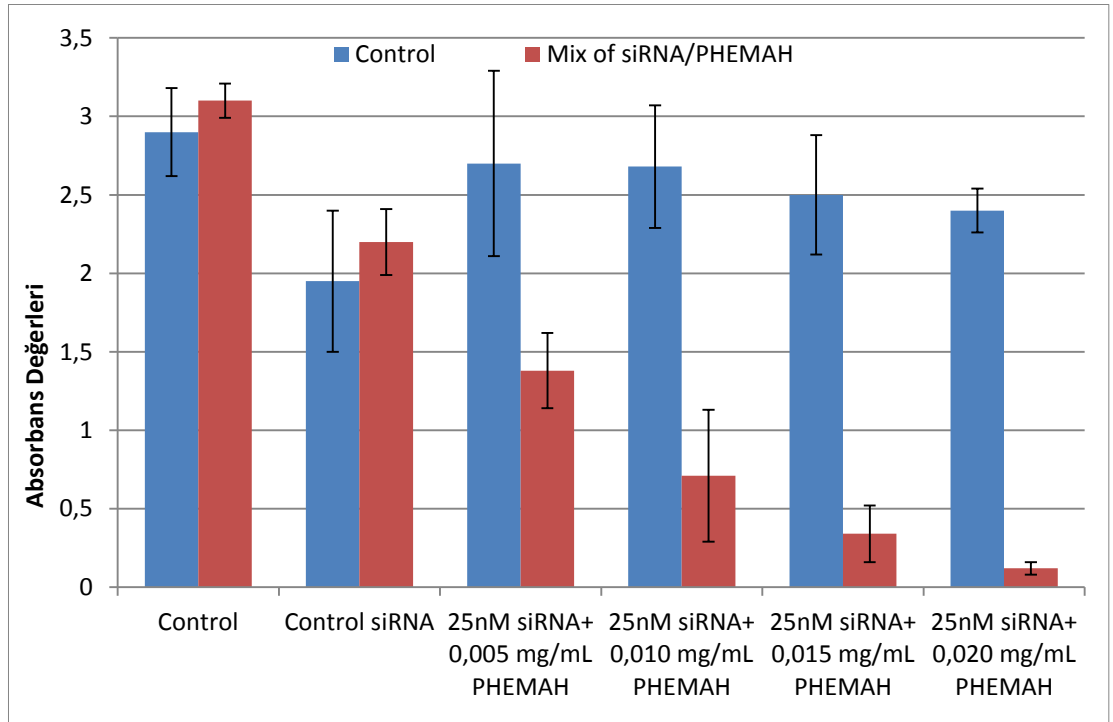
Şekil 4.3. PHEMAH Nanopartiküllerinin farklı dozlardaki MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi.

0,005 ile 0,05 mg/ml arası değişen PHEMAH nanopartiküllerinin miktarı arttıkça hücre canlılığında kontrole göre azalış olduğu gözlenmiştir. 0,005 mg/ml derişimindeki nanopartikülün hücreler üzerindeki canlılık etkisi % 92,15 olarak belirlenmiştir. 48 saatin sonunda en yüksek dozda dahil olmak üzere hücre canlılığı %50'nin altına düşmemiştir.

25 nM siRNA yüklü farklı derişimlerdeki nanopartiküllerin MDA MB-231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri de MTT testiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. 25 nM siRNA yüklü PHEMAH Nanopartiküllerinin MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi.

Örneklerin Konsantrasyonları	MTT (Absorbans Değerleri)	% canlılık
Kontrol (Besiyeri)	3,10±0,11	100
25 nM siRNA+0,005 mg/ml PHEMA	1,38±0,24	44,51
25 nM siRNA+0,01 mg/ml PHEMA	0,71±0,42	22,90
25 nM siRNA+0,015 mg/ml PHEMA	0,34±0,18	10,97
25 nM siRNA+0,020 mg/ml PHEMA	0,12±0,04	3,87
25 nM siRNA	2,2±0,21	70,97



Şekil 4.4. PHEMAH Nanopartiküllerinin farklı dozlarının 25 nM siRNA ile etkileşimi sonucu oluşan komplekslerin, MDA-MB 231 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkisi.

siRNA'nın tek başına yaklaşık %30-40 arası hücre canlılığını etkilediği gözlenirken nanopartiküllerle tutunduktan sonra bu oranın arttığı yapılan sitotoksikite testi ile gözlenmiştir. PHEMAH nanopartikülünün tek başına hücre canlılığına önemli bir etkisi yokken siRNA ile tutunması sonucu hücre canlılığında önemli azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

4.3.2. Apoptoz/Nekroz İkili Boyama Sonuçları

4.3.2.1. İkili Boyama ile Elde Edilen Apoptotik İndeks Sonuçları

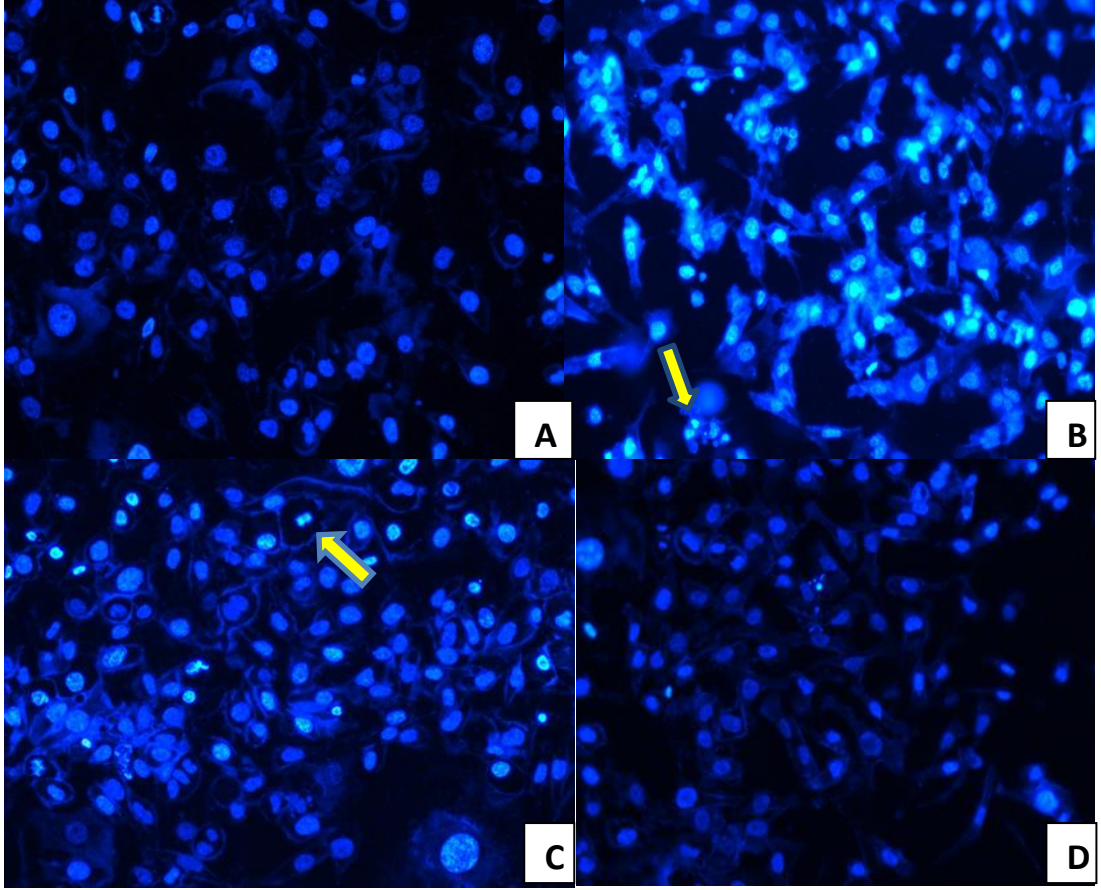
Sunulan tez çalışmaları kapsamında, kontrol grubu nanopartikülleri, kontrol grubu siRNA'ları ve bunların nanopartiküllere yüklenmiş formları MDA-MB 231 hücreleri ile etkileştirilmiş, ikili boyama yöntemi ile boyanmış ve hücre etkileşimleri apoptotik mekanizmaların değerlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir (Çizelge 4.3). Elde edilen mikroskop fotoğrafları Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, 4.8,'de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. siRNA'nın, kontrol nanopartiküllerin ve siRNA yüklü nanopartiküllerin ayrı ayrı meme kanseri hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksler.

Konsantrasyon	% Apoptoz İndeksleri
Kontrol (Besiyesi)	2,4±2
25 Nm siRNA+ 0,005 mg/ml PHEMAH	40,57 ±1
25 nM siRNA+ 0,010 mg/ml PHEMAH	32,71 ±2
25 nM siRNA+ 0,015 mg/ml PHEMAH	58,71 ±3
25 nMsiRNA+ 0,020 mg/ml PHEMAH	37,82 ±2
Kontrol 25 nM siRNA	21,20 ±1
Kontrol 0,005 mg/ml PHEMAH	3,03 ±1
Kontrol 0,010 mg/ml PHEMAH	3,37 ±2
Kontrol 0,015 mg/ml PHEMAH	5,10 ±2
Kontrol 0,020 mg/ml PHEMAH	3,53 ±1

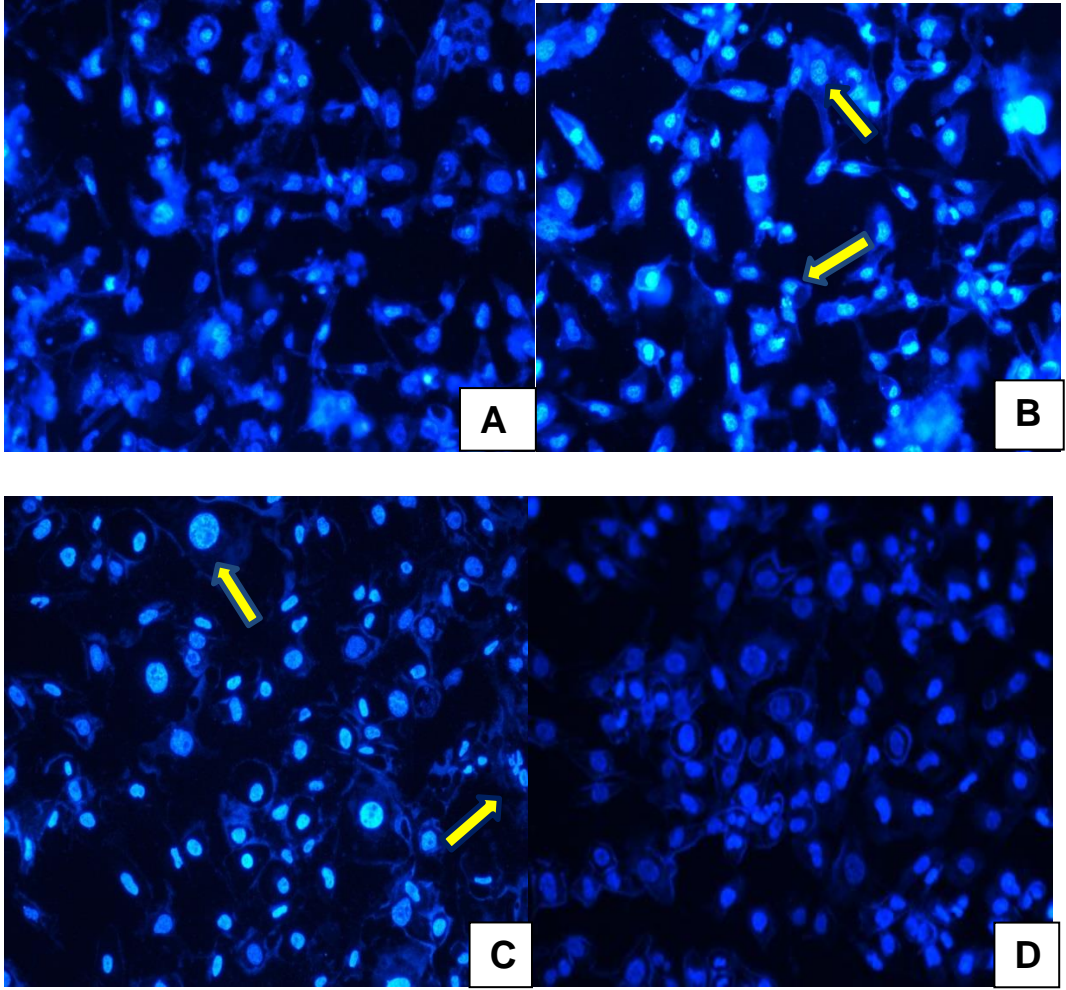
siRNA yüklü nanopartiküllerin MDA-MB 231 hücrelerine uygulanması ile siRNA'nın Bcl-2 genini inhibe etmesi apoptozu indüklemiştir. Apoptotik hücre çekirdeklerinin parçalandığı, bu hücrelerin apoptoza uğramayan hücrelere göre daha parlak mavi renkte olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).

Hoechst 33342 ile boyanmış hücrelerin kontrol grubuna göre, hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir.



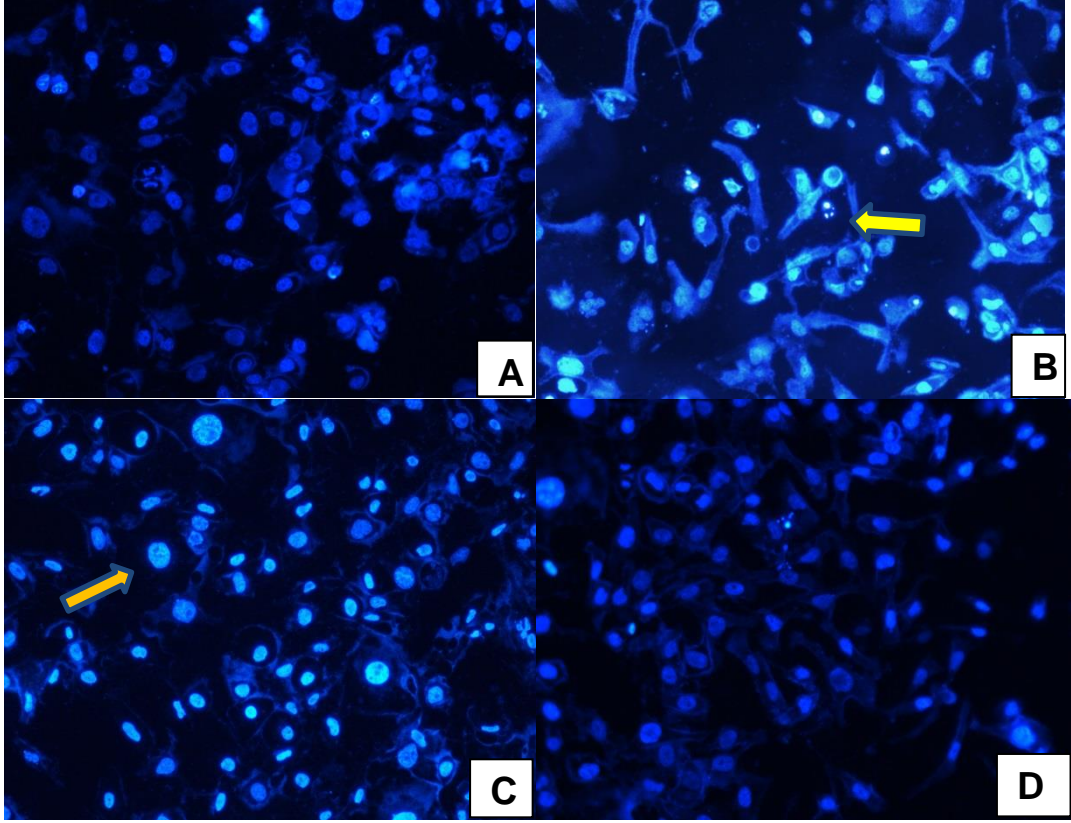
Şekil 4.5. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (200Xbüyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir).

(A) Kontrol 0,005 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,005 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir.



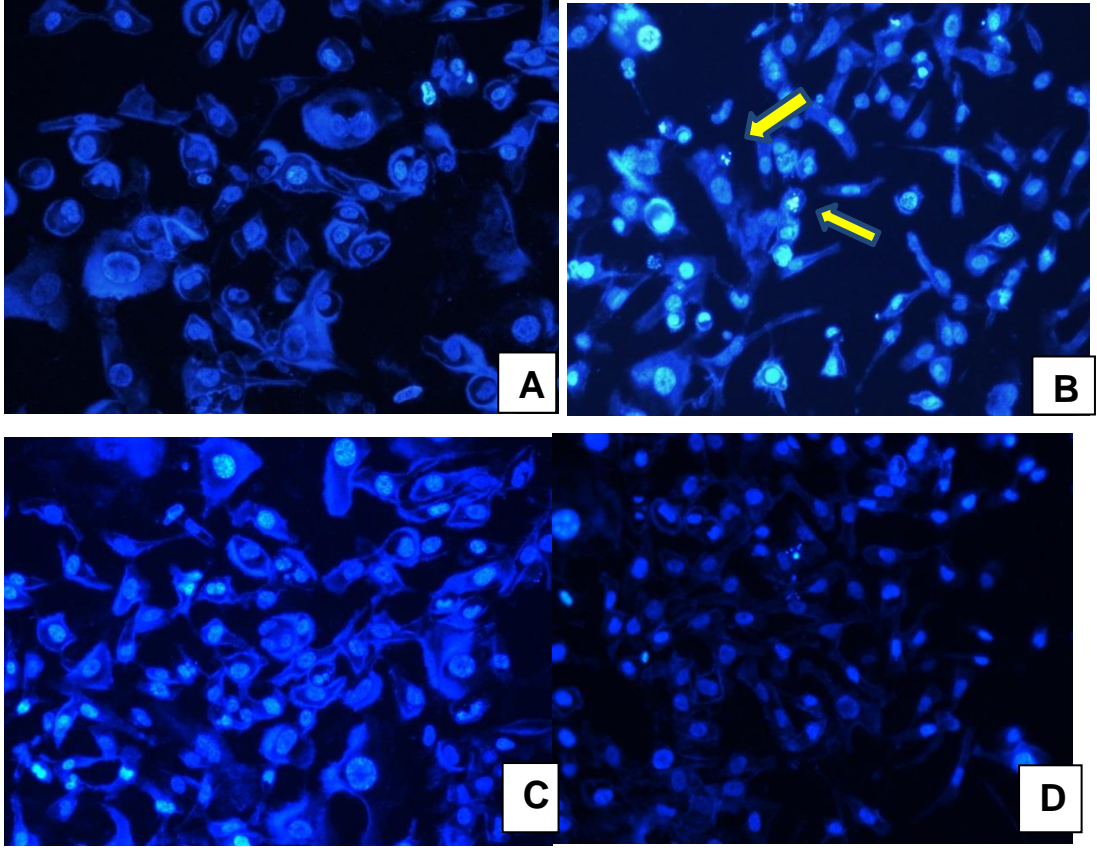
Şekil 4.6. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları. (200Xbüyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir).

(A) Kontrol 0,01 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,01 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.



Şekil 4.7. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (200Xbüyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir).

(A) Kontrol 0,015 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,015 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.



Şekil 4.8. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (200Xbüyütmeye Leica DM6000 ile görüntülenmiştir).

(A) Kontrol 0,020 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,020 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.

Sunulan tez kapsamında elde edilen sonuçlara bakıldığında düşük dozlarda uygulanan nanopartiküllerin hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin, 25 nM siRNA ile birlikte kanser hücrelerine verildiğinde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç Bcl-2'in baskılanma mekanizmasına katkı sağladığının göstergesidir.

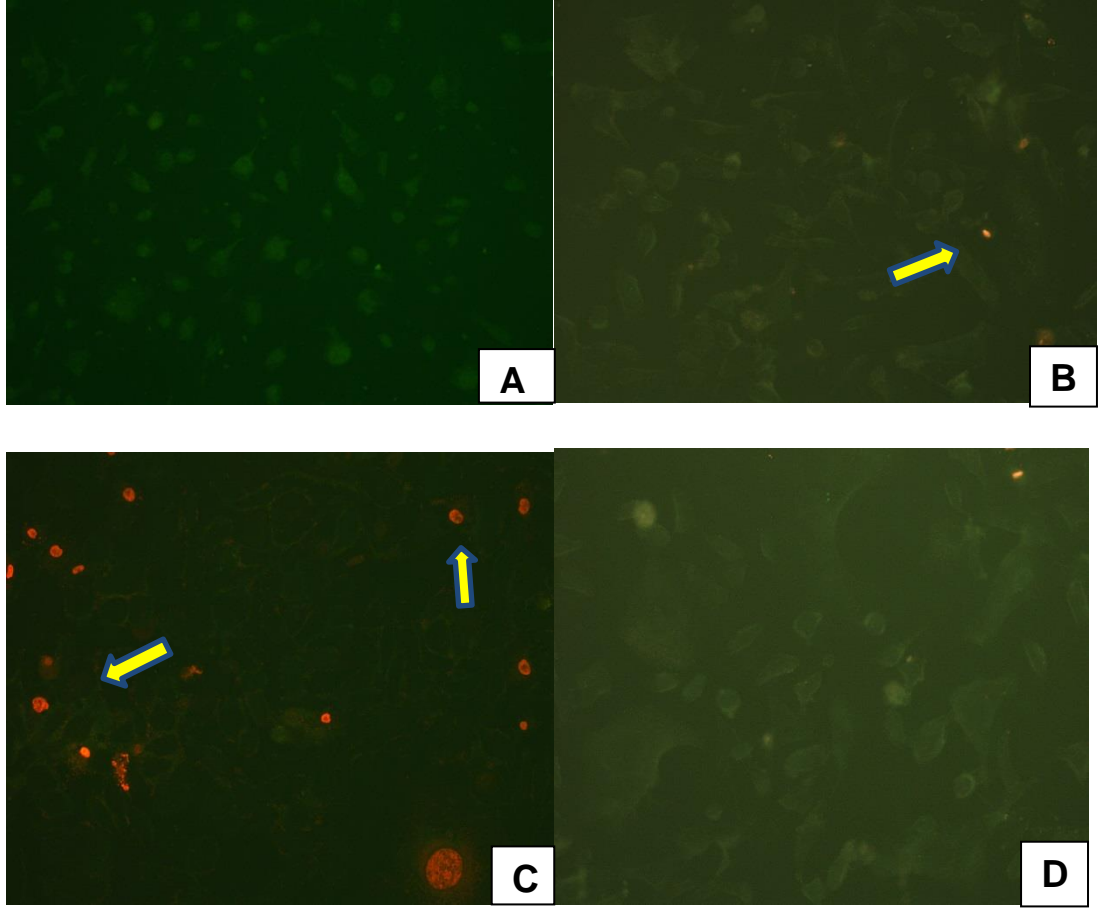
4.3.2.2. İkili Boyama ile Elde Edilen Nekrotik İndeks Sonuçları

İkili boyama metodunda kullanılan bir diğer boya ise PI floresan boyası olup nanopartikül ve siRNA/nanopartikül formülasyonlarıyla etkileştirilen kanser hücrelerinin nekrotik oranı tespit edilmiştir. PI floresan boya ölü ve plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek, çekirdeklerin floresan ışık altında kırmızı görünmelerini sağlar. Nekrotik olmayan hücreler PI ile boyanmazken, apoptotik ve nekrotik hücre ise yeşil renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülendiğinde yeşil renkte görülmektedirler. Sunulan tez çalışmasında nekrotik indeks saptanması 480-520 nm dalga boyunda floresan ışık (FITC filtresi ile) altında incelenmiş ve bu dalga boyunda aynı anda nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı ve hücrelerin zarları yeşil renkte görünmektedir. Nekrotik hücreleri gösteren fotoğraflar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 'de sunulmuştur. % nekrotik indeksi Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi, düşük derişimlerde nekrotik indeks çok yüksek değildir. Fakat derişimin artması toksisiteyi de artırdığı için nekrozun da artmasına sebep olmuştur.

Çizelge 4.4. siRNA'nın, kontrol nanopartiküllerin ve siRNA yüklü nanopartiküllerin ayrı ayrı meme kanseri hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksler.

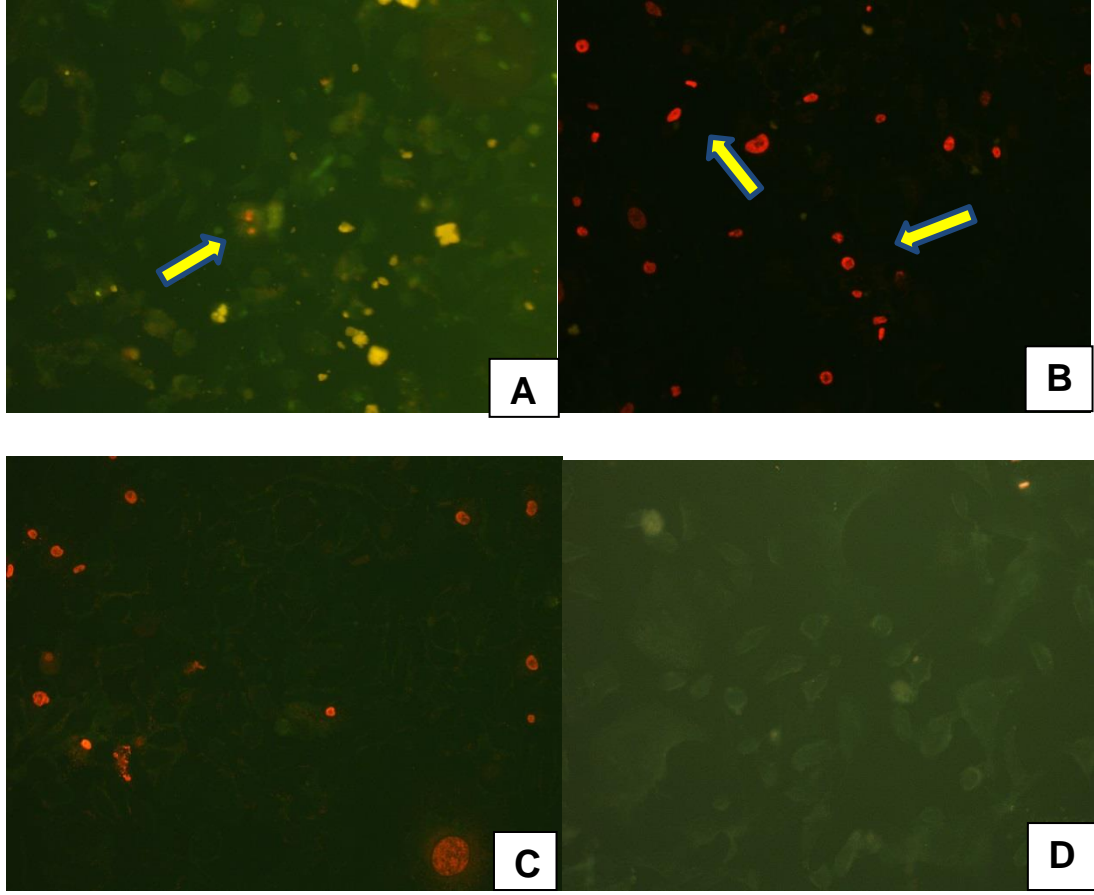
Konsantrasyon	% Nekroz İndeksleri
Kontrol (Besiyeri)	1,03±2
25 nM siRNA+ 0,005 mg/ml PHEMAH	0,93 ±1
25 nM siRNA+ 0,010 mg/ml PHEMAH	5,14 ±2
25 nM siRNA+ 0,015 mg/ml PHEMAH	1,57 ±1
25 nM siRNA+ 0,020 mg/ml PHEMAH	3,11 ±1
Kontrol 25 nM siRNA	16,67 ±3
Kontrol 0,005 mg/ml PHEMAH	1,51 ±1
Kontrol 0,010 mg/ml PHEMAH	7,58 ±2
Kontrol 0,015 mg/ml PHEMAH	11,75 ±3
Kontrol 0,020 mg/ml PHEMAH	16,28 ±3

Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12'de PI ile nekrotik boyama yapılmış hücrelerin kontrol grubunun fotoğrafı görülmekte olup hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir. siRNA ile baskılanması hücrelerdeki nekrotik mekanizmayı da tetiklemiştir 25 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerde nekrotik etki gözlenmiştir ve bu oran yaklaşık % 16'dır.



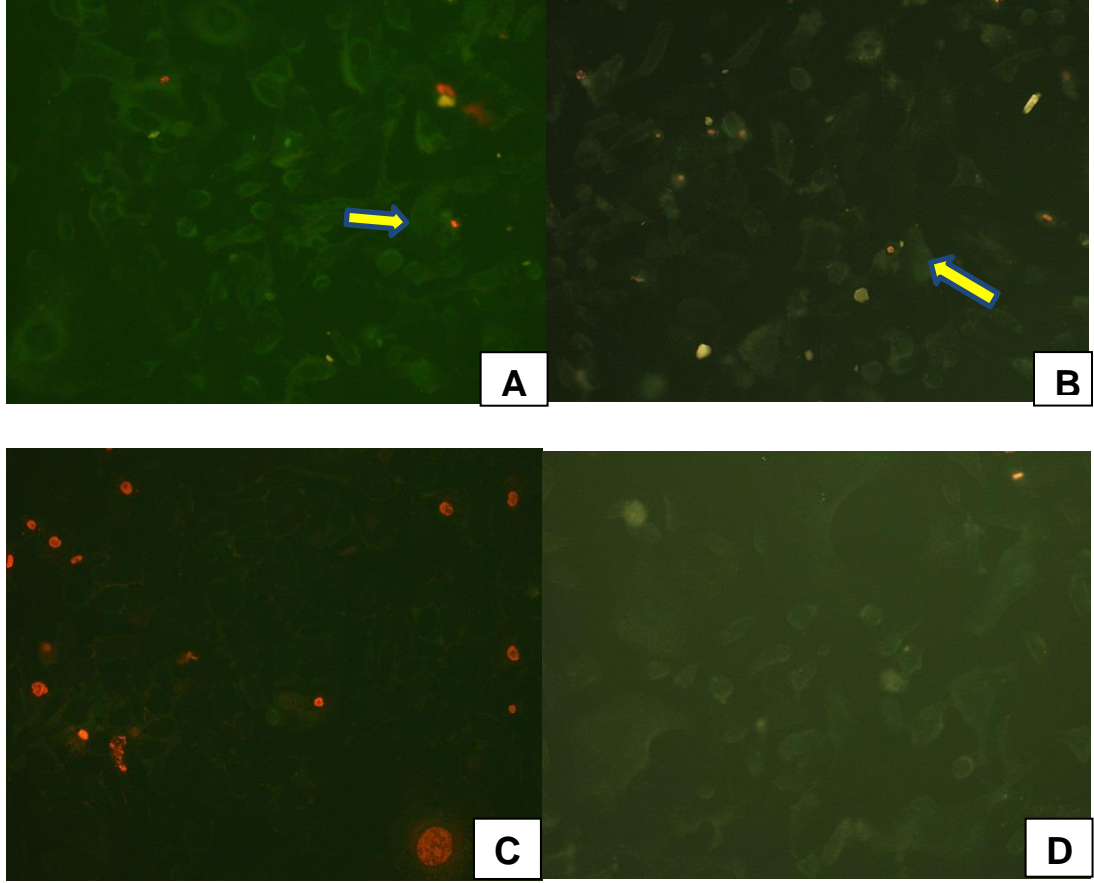
Şekil 4.9. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir).

(A) Kontrol 0,005 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,005 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandığından yeşil görünmektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.



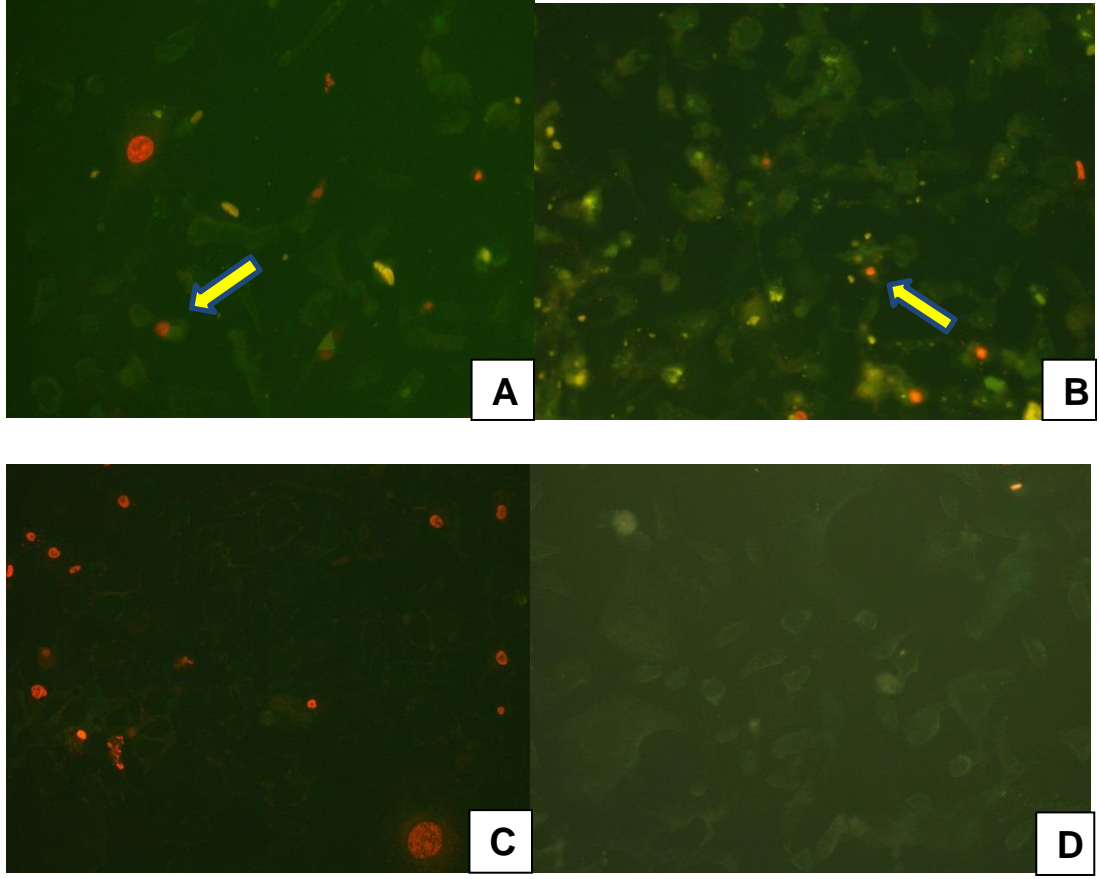
Şekil 4.10. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir).

(A) Kontrol 0,010 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,010 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandığından yeşil görünmektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.



Şekil 4.11. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir).

(A) Kontrol 0,015 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,015 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandığından yeşil görünmektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.



Şekil 4.12. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir).

(A) Kontrol 0,02 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(B)** 25 nM siRNA+ 0,02 mg/ml PHEMAH kompleksi ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(C)** Kontrol 25 nM siRNA ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücreleri; **(D)** kontrol (besiyeri) grubu; Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandığından yeşil görünmektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.

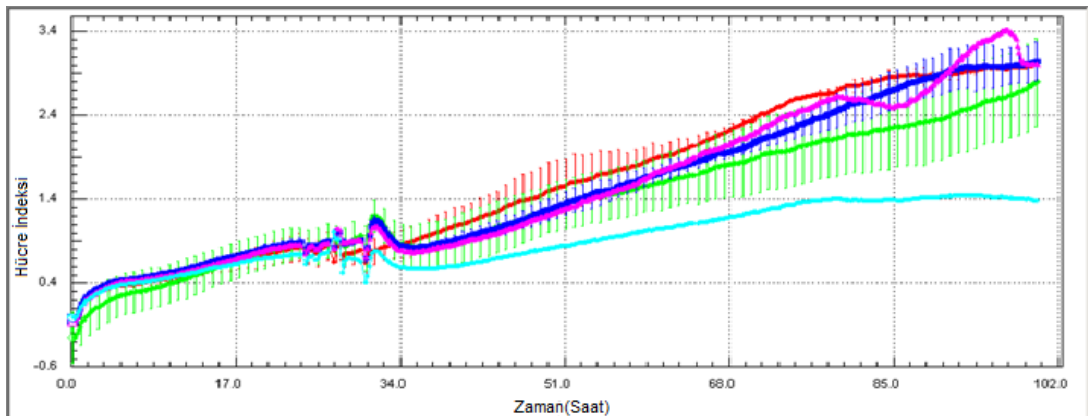
Yapılan nekroz analizinde elde edilen sonuçlara göre siRNA aynı zamanda nekrotik mekanizmayı da tetiklemiştir. MTT sonuçlarına göre de; siRNA ile muamele edilen hücrelerde canlılık azalmaktadır. Hücre ölümlerinin bir kısmının apoptotik bir kısmının da nekrotik yolak ile gerçekleştiği böylece anlaşılmaktadır.

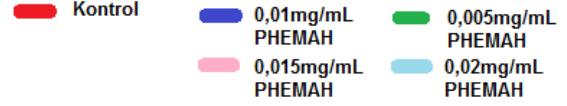
Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12'ye göre 25 nM siRNA ile etkileştirilen farklı dozlardaki nanopartiküller (0,005, 0,010, 0,015, 0,020 mg/ml) hücrelerde nekrotik indeks birlikte etkileşimde daha düşük çıkmıştır. Bu durum kontrol gruplarında tam tersi olarak görülmektedir.

4.3.3. Hücre Canlılık Testi Sonuçları

4.3.3.1. Kontrol PHEMAH grubu ve Kontrol siRNA grubunun RTCA Sonuçları

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur. Çalışmada RTCA testi ve MTT testinden benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de hem MTT testi hem de RTCA testleri birbirlerine uyumlu bir şekilde görülmektedir.



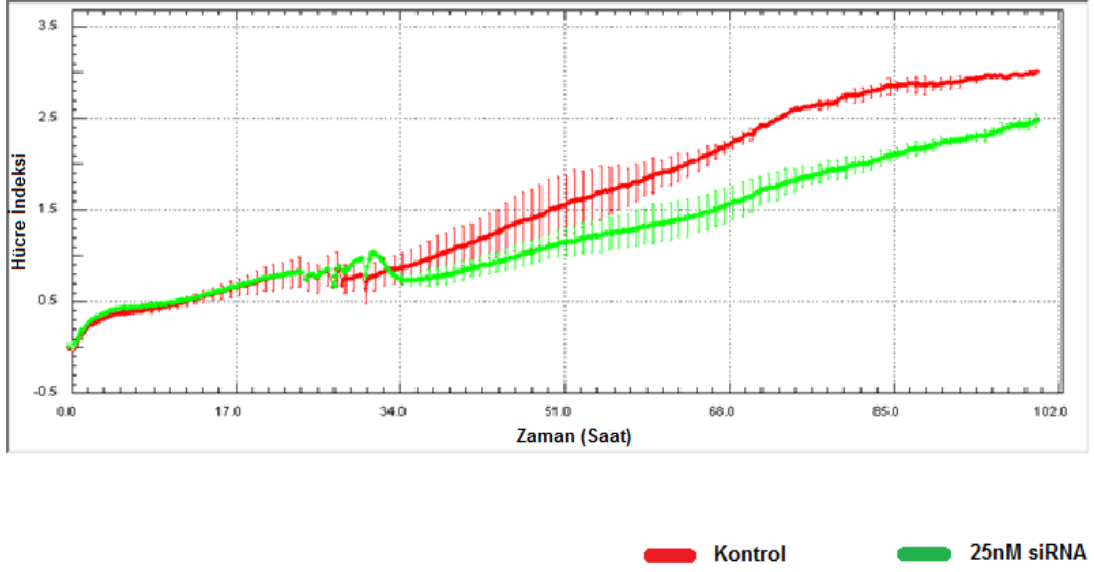


Şekil 4.13. PHEMAH Nanopartiküllerinin hücre çoğalması üzerine etkileri.

Grafiğe göre (Şekil 4.13.) nanopartiküllerin tüm konsantrasyonlarında 102 saat boyunca kontrol grubuna göre kıyasla hücre sayısında çok büyük bir azalma görülmemektedir. 34. saatten itibaren 0,005, 0,010, 0,015 mg/ml derişimlerinde proliferasyonda artış başlamış ve 102. saate kadar kontrol grubuyla paralel proliferasyon artışı görülmektedir. Yaklaşık olarak 70 ile 85. saatleri arasında 0,02 mg/ml derişimindeki nanopartiküllerin proliferasyonda diğer gruplara kıyasla artmanın devam etmediği görülmektedir. Nanopartikül derişimi arttıkça hücre çoğalmasında azalma olduğu MTT ve İkili boyama testlerinde de görülmektedir. Bu durum sonuçların birbirini doğruladığını göstermektedir.

Yapılan çalışmada uygulanan kontrol siRNA da benzer şekilde hücre canlılığında da anlamlı bir fark görülmemektedir. Bu cümle çok anlaşılır durmuyor.

Uygulanan kontrol siRNA da benzer şekilde hücre canlılığında anlamlı bir fark göstermemiştir.

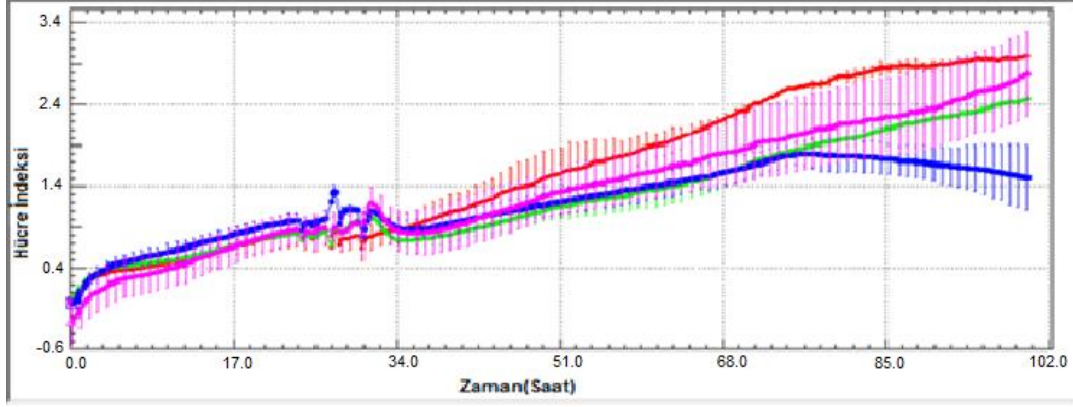


Şekil 4.14. 25 nM kontrol siRNA'nın MDA-MB 231 hücreleri üzerindeki çoğalmaya etkisi.

25 nM siRNA'nın MDA-MB 231 hücreleri üzerinde yapılan proliferasyon testinde Şekil 4.14' de görüldüğü gibi siRNA tek başına hücrelerin proliferasyonunu büyük ölçüde etkilememiştir ancak, kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunda farklılık görülmektedir. Yapılan MTT testinde ve İkili boyama testlerinde de siRNA'nın hücre canlılığını yaklaşık olarak %30-44 arasında etkilediği görülmüştür. Bu durum sonuçların birbirini doğruladığını göstermektedir.

4.3.3.2. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin MDA-MB 231 Hücreleri Üzerine Etkisi

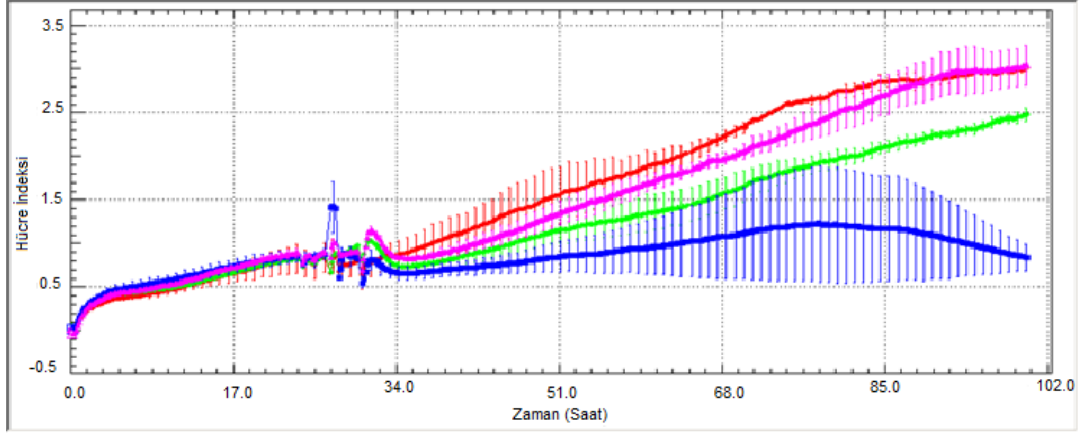
Bu çalışmada 25 nM siRNA ile yüklenen 0,005, 0,01, 0,015, 0,020 mg/ml PHEMAH karışımlarının MDA-MB 231 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi RTCA ile analiz edilmiştir.



■ Kontrol ■ Kontrol 25nM siRNA
■ Kontrol 0,005mg/mL PHEMAH ■ 25nM siRNA+ 0,005mg/mL PHEMAH

Şekil 4.15. Kontrol(Besiyeri), Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi.

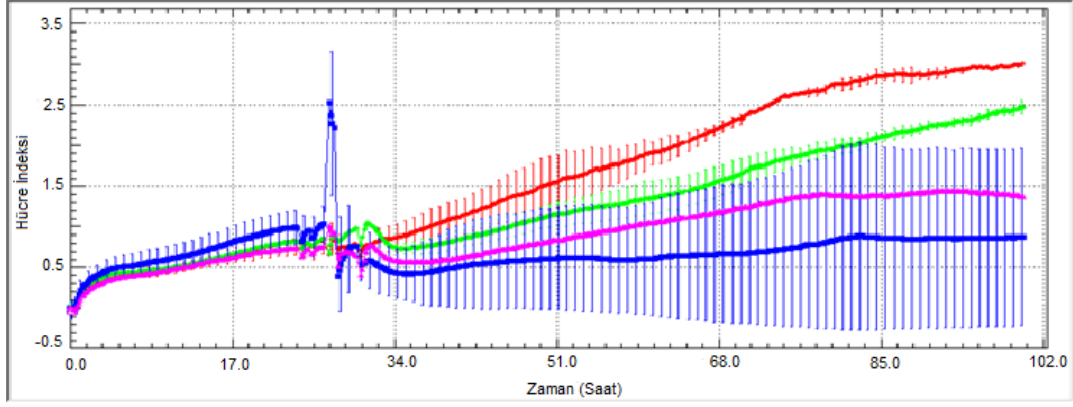
Grafiğe göre (Şekil 4.15) kontrol grubu hücreler 85 saat boyunca artış göstermiş daha sonra 102. saate kadar yaklaşık hücre sayısını korumuştur. Düşük dozda bulunan 0,005 mg/ml derişimindeki nanopartiküller, 102 saat boyunca hemen hemen sabit proliferasyon artışı göstermiştir. Bu nanopartikülün 0,005 mg/ml dozunun hücrelere tek başına uygulandığında bulunan MTT ve ikili boyama testlerini doğrulamaktadır. 25 nM siRNA tek başına hücre proliferasyonunu etkilemektedir ancak nanopartiküllerle yüklendikten sonra daha fazla etki ettiği görülmektedir.



■ Kontrol ■ Kontrol 25nM siRNA
■ Kontrol 0,010mg/mL PHEMAH ■ 25nM siRNA+ 0,010mg/mL PHEMAH

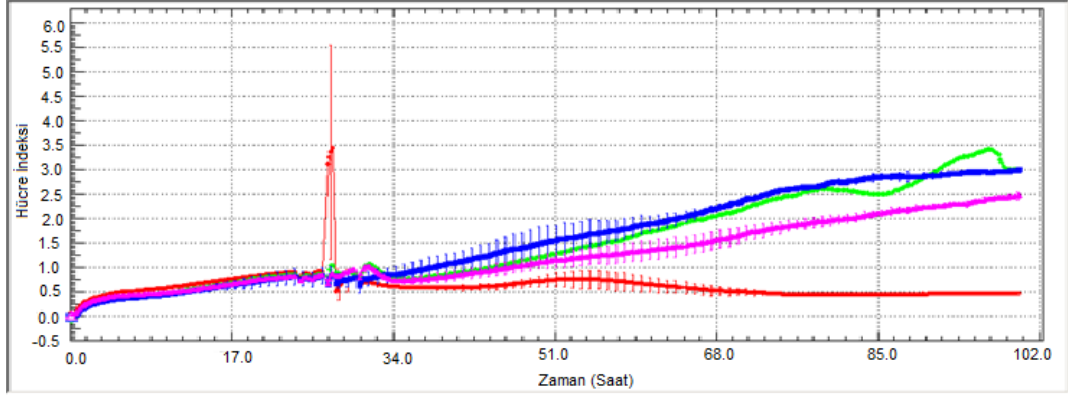
Şekil 4.16. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi.

Grafiğe göre (Şekil 4.16.) kontrol (besiyeri) grubu hücreler 85 saat boyunca artış göstermiş daha sonra 102 saate kadar yaklaşık hücre sayısını korumuştur. Düşük dozda bulunan 0,010 mg/ml nanopartikülleri, 102 saat boyunca hemen hemen sabit proliferasyon artışı göstermiştir. Bu sonuç nanopartikülün 0,010 mg/ml dozunun hücrelere tek başına uygulandığında bulunan MTT ve ikili boyama testlerini doğrulamaktadır. 25 nM siRNA tek başına hücre proliferasyonunu etkilemektedir ancak nanopartiküllerle yüklendikten sonra daha da fazla etki ettiği görülmektedir. Şekilde 4.16 'da nanopartikül derişimi arttıkça siRNA ile hücre çoğalmasında daha fazla etkin olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi.

Grafiğe göre (Şekil 4.17) kontrol (besiyeri) grubu hücreler 85 saat boyunca artış göstermiş daha sonra 102. saate kadar yaklaşık hücre sayısını korumuştur. 0,015 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri, tek başına hücre çoğalmasını kontrol grubuna kıyasla azaltmıştır. Bu sonuç nanopartikülün 0,015 mg/ml dozunun hücrelere tek başına uygulandığında bulunan MTT ve ikili boyama testlerini doğrulamaktadır. 25 nM siRNA tek başına hücre proliferasyonunu azaltmaktadır ancak nanopartiküllerle yüklendikten sonra daha fazla etki ettiği görülmektedir. Nanopartikülün tek başına hücre çoğalmasını azaltması, siRNA ile yüklendiğinde diğer derişimlere kıyasla (0,005, 0,010 mg/ml PHEMAH) hücre çoğalmasını daha fazla azaltmasına sebep olmuştur.



■ Kontrol
 ■ Kontrol 0,020mg/mL PHEMAH
■ Kontrol 25nM siRNA
 ■ 25nM siRNA+ 0,020mg/mL PHEMAH

Şekil 4.18. Kontrol, Kontrol PHEMAH, Kontrol siRNA, siRNA yüklü PHEMAH nanopartikül gruplarının MDA-MB 231 hücreleri üzerine çoğalmaya etkisi.

Grafiğe göre (Şekil 4.18.) Kontrol (besiyeri) grubu hücreler 85 saat boyunca artış göstermiş daha sonra 102. saate kadar yaklaşık hücre sayısını korumuştur. 0,020 mg/ml derişimdeki PHEMAH nanopartikülleri, tek başına hücre çoğalmasını kontrol grubuna kıyasla azaltmıştır. Bu sonuç nanopartikülün 0,020 mg/ml dozunun hücrelere tek başına uygulandığında bulunan MTT ve ikili boyama testlerini doğrulamaktadır. 25 nM siRNA tek başına hücre proliferasyonunu azaltmaktadır ancak nanopartiküllerle yüklendikten sonra daha fazla etki ettiği görülmektedir. Nanopartikülün tek başına hücre çoğalmasını azaltması siRNA ile yüklendiğinde de diğer derişimlere kıyasla (0,005, 0,010, 0,015 mg/ml PHEMAH) hücre çoğalmasını daha fazla azaltmasına sebep olmuştur.

4.3.4. Real Time PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sonuçları

4.3.4.1. RNA İzolasyonu

Bcl-2 proteininin siRNA ile inhibe olduğunu mRNA seviyesinde göstermek amacıyla eş zamanlı PCR analizi uygulanmıştır. Bunun için de öncelikle 25 nM siRNA+0,005 mg/ml PHEMAH, 25 nM siRNA+0,015 mg/ml PHEMAH ve 25 nM siRNA+0,020 mg/ml PHEMAH ile ayrı ayrı muamele edilen hücre gruplarından toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA derişimleri Qubit (İnvitrogen) cihazında ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'de görülmektedir.

Çizelge 4.5. MDA-MB 231 hücrelerine uygulanan siRNA yüklü nanopartiküllerin RNA derişimleri.

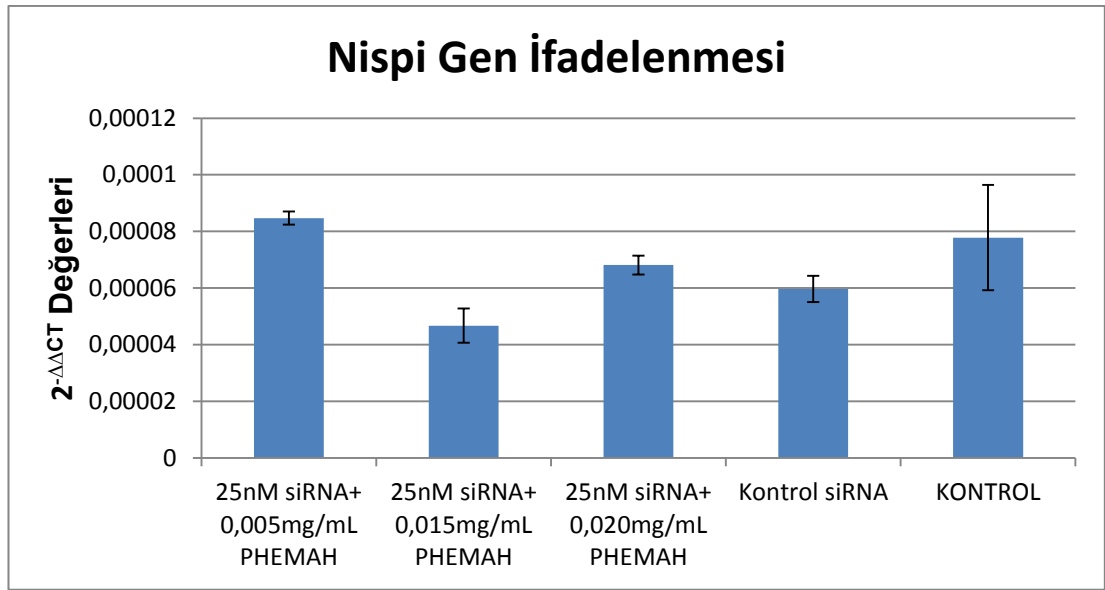
Konsantrasyon	Sonuçlar (ng/µL)
Kontrol	> 1000
25 nM siRNA + 0,005 mg/ml PHEMAH	< 48,1
25 nM siRNA + 0,015 mg/ml PHEMAH	< 20
25 nM siRNA + 0,020 mg/ml PHEMAH	< 141
25 nM siRNA	< 20

Ölçümleri aldığımız Qubit, 20 ng altındaki ve 1000 ng üzerindeki değerleri verememektedir. Bu yüzden yaklaşık değerleri üzerinden en fazla çıkan kontrol grubunun RNA miktarı, primer ve asgari su miktarı hesaptan çıkarıldıktan sonra alınabilecek en yüksek değer verilerek diğer örneklerde oranlama yoluna gidilmiştir. cDNA sentezi protokolüne göre her bir reaksiyon içerisinde kullanılması gereken RNA miktarı 25 ng ile 5 µg arasında olmalıdır.

Her bir örnekten elde edilen RNA derişimleri bu değerler arasında çıkmıştır ve izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir.

4.3.4.2. RT-PCR Primer Analizi

25 nM siRNA+0,005 mg/ml PHEMAH, 25 nM siRNA+0,015 mg/ml PHEMAH ve 25 nM siRNA+0,020 mg/ml PHEMAH ile ayrı ayrı muamele edilen MDA-MB 231 hücrelerinde antiapoptotik gen olan Bcl-2 geninin ifadelenenmesi seviyesinde etkisinin araştırılması için RT-PCR primer analizi yapılmıştır. Hedef genlerin analizi için referans gen β -Actin kullanılarak standardize edilmiştir.



Şekil 4.19. 25 nM Bcl-2 siRNA yüklü, 0,005, 0,015, 0,020 mg/ml PHEMAH nanopartikülleri ile muamele edilmiş MDA-MB 231 hücrelerindeki mRNA düzeylerine etkisi.

Şekil 4.19.'a göre 0,005 mg/ml derişimdekii nanopartikül yüklü siRNA aktarımıyla, Bcl-2 gen ifadesinin arttığı; 0,015 mg/ml de ise azaldığı görülmektedir. 0,020 mg/ml PHEMAH yüklü 25 nM siRNA örneğinde de gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Kontrol siRNA (25 nM)'nın ise kontrol grubuna kıyasla gen ifadesinde azalma olduğu görülmüştür.

Yapılan MTT, RTCA ve ikili boyama çalışmalarında MDA-MB 231 hücrelerinde 25 nM siRNA ile yüklenen nanopartikül miktarı arttıkça anti proliferatif ve apoptotik etkinliğin arttırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada Bcl-2'nin gen ifadesinin değerlendirilmesi, β -actin geninin ifadesine bakılarak yapılmıştır. Bu sonuçlara göre siRNA'nın PHEMAH ile birlikte etkisinin olduğu hücre grubunda proliferasyonun azalması da, % Rölatif Gen Ekspresyonu analizinde 0,015 ve 0,020 mg/ml PHEMAH yüklü 25 nM siRNA'nın Bcl-2 gen ifadesini indüklediğinin görülmesiyle desteklenmiştir.

6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez kapsamında yaptığımız tüm çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ve bulguların ışığı altında ortaya konulan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- İlk olarak PHEMAH (poli hidroksietil metakrilol-(L)-histidin) nanopartikülleri pH'ı 5,5-6 olan distile su içinde çözdürülmüştür. Nanopartiküllerin boyut analizi için zeta boyut analiz cihazı kullanılmış, optimizasyon çalışmaları sonucunda en küçük partikül boyutu 83,8 nm bulunmuştur.
- siRNA'ların pozitif yüklü PHEMAH nanopartikülleri ile tutunması için farklı derişimlerde bir araya getirilmiş ve birbirlerine tutunup tutunmadıkları agaroz jel elektroforezi yapılarak en uygun miktarlar elde edilmiştir.
- Hücre sitotoksisite testi için meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB 231 seçilmiştir. Kontrol grubu olarak besiyeri kullanılmıştır. Karşılaştırma yapabilmek ve etkilerini görebilmek için MDA-MB 231 hücrelerine tek başına nanopartikül, kontrol siRNA ve siRNA yüklenmiş nanopartikül ayrı ayrı eklenmiştir.
- Sitotoksisite testi için MTT metodu seçilmiş ve PHEMAH nanopartiküllerinin hücreler üzerine tek başına sitotoksik etkilerinin olup olmadığını belirlemek için belirli derişimlerdeki nanopartiküller hücrelerle etkileştirilmiştir. Nanopartiküllerin hücre canlılığını çok az etkilediği görülmüştür. Aynı şekilde siRNA'nın tek başına hücreler üzerindeki sitotoksisitesi incelenmiş %30 hücre canlılığını etkilediği görülmüştür. Daha sonra siRNA yüklü nanopartiküllerin hücreler üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiş ve birlikte kanser hücre canlılığını nanopartikül derişimi arttıkça daha fazla etkiledikleri görülmüştür.

- Hücre canlılık analizi RTCA ile incelenmiştir. PHEMAH nanopartikülü tek başına hücrelere uygulandığında derişimi arttıkça hücre proliferasyonun azaldığı, 25 nM siRNA'nın tek başına hücre çoğalmasını çok fazla etkilemediği görülmüştür.
- 25 nM siRNA ile yüklü nanopartiküllerin hücre çoğalmasına etkisi incelendiğinde, nanopartiküllerin yüksek derişimlerinde siRNA ile beraber anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Yapılan MTT ve RTCA sonuçlarının birbirini desteklediği görülmüştür.
- siRNA yüklü nanopartiküllerin hücrelere etkisinde aynı zamanda ikili boyama yapılarak, apoptoz/nekroz indekslerine bakılmıştır. Hücre ölümlerinin morfolojik olarak değerlendirilmesi için kontrol nanopartikül, kontrol siRNA ve siRNA ile yüklenmiş nanopartikül ayrı ayrı MDA-MB 231 hücreleri ile etkileştirilmiş, Hoechst 33342 ve PI boyları kullanılarak ikili boyama yöntemi ile boyanmış ve hücre etkileşimleri apoptotik-nekrotik mekanizmaların değerlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Apoptoz/nekroz sonuçları değerlendirildiğinde nanopartikül ve siRNA'nın tek başlarına hücreler üzerindeki apoptotik indeksinin, siRNA ile nanopartiküller birlikte verildiği uygulamaya kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir.
- İkili boyamada hücrelerle muamele edilen tüm grupların nekrotik etkileri incelendiğinde nekrozun genel olarak tüm gruplarda daha az görüldüğü tespit edilmiştir. Aynı şekilde nanopartikül ve siRNA'nın tek başlarına hücreler üzerindeki nekrotik indeksinin, siRNA ile nanopartiküller birlikte verildiği formülasyona göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.
- Gerçek zamanlı RT-PCR analiziyle siRNA'lar ile farklı derişimlerdeki PHEMAH nanopartikülü, MDA-MB 231 hücreleri ile etkileştirilmiş ve Bcl-2 genini susturma etkinliği tespit edilmiştir ve değişen derişimlere göre oldukça yüksek oranda başarılı bir gen inhibisyonu sağlanmıştır.

Bütün bu sonuçlara göre;

- siRNA'nın PHEMAH partikülü ile birlikte muamelesinde en uygun dozun 0,015 mg/ml PHEMAH ile etkileştirilen 25 nM siRNA olduğu tespit edilmiştir. 25 nM siRNA yüklü 0,015 mg/ml PHEMAH nanopartikülünün; MTT testinde sitotoksik etkisinin yaklaşık %90 civarında olması, hücre canlılığını etkilerken hücrenin seçtiği mekanizmanın %58,71 oranda apoptotik olması, %1,57 gibi düşük oranda nekrotik etkisinin bulunması, hücre çoğalmasına etkisi ve gen ifadesi de incelendiğinde en uygun doz olduğu tespit edilmiştir.
- Bu çalışma ile siRNA'nın, kanser tedavisinde PHEMAH nanopartikülleri ile birlikte kullanılabileceği ilk kez gösterilmiştir. Bcl-2 proteininin sentezinin translasyon basamağında önemli bir yer tuttuğu ve bu proteinin inhibe edilerek hücre çoğalmasını azalttığı tespit edilmiştir.
- Kanser tedavisinde yeni bir hedefli çalışma yöntemi olan siRNA tedavisi direkt olarak sorunlu geni veya sorunlu genden sorumlu mRNA'yı hedef almaktadır. Bu yeni nesil tedavi yöntemi olan hedefli tedavide kullanılan ajanların hücre içine alınmalarını kolaylaştırmak ve daha da etkili olmasını sağlamak için küçük boyutları sebebiyle tercih sebebi olan nanopartiküller kullanılmaktadır. Nanopartiküller kullanılarak yapılan bu tedavideki amaç, geleneksel tedavilerdeki olumsuzlukları en aza indirmek, etken maddenin hücreye yüzeylere etkin bir şekilde taşınımını sağlamak, siRNA'yı vücudun herhangi bir bölgesine zarar vermeden sadece tümörlü dokuya ulaştırmaktır [104].
- Gen tedavisinde istenilenler, karar verilen genin etkili ve yeterli olarak hücre içine taşınması, taşınan genin etkinliğini tedavi boyunca sürdürmesi, bu gene konakçı hücrenin cevabının uygun şekilde olması ve ayrıca bu genin diğer bir hastalığa yol açmamasıdır. Bütün bu beklentiler çerçevesinde gen tedavisinde günümüzdeki ana problem

tedavi geninin kanser hücrelerine uygun şekilde nasıl transfer edilebileceği noktasındadır. Çünkü bu tam olarak başarısız olduğu takdirde kanser hücresi dirençli klon olarak kalmaya devam edecektir. Bu noktada siRNA'nın nanopartiküllerle taşınması önem kazanmaktadır.

- Gen tedavisi çalışmalarının kanser üzerinde uygulanması 1992'den sonra yoğunlaşmıştır [105]. O tarihten bu yana çok çalışma yapılmış olmasına karşın konuyla ilgili olarak sadece birkaç ilaç hasta kullanımına sunulabilmiştir. Bu da tezin gerçekleşmesi durumunda sağlık alanına yapacağı katkının büyük olacağını göstermektedir. Bu çalışma da istenilen amacın gerçekleşmesi durumunda, vücudun herhangi bir bölgesine zarar vermeden nanopartikül/siRNA kompleksinin sadece tümörlü dokuya ulaştırılması sağlanmış olacaktır.
- Liu ve arkadaşlarının [106] yaptıkları çalışmada siklooksigenaz-2 inhibitörü olan NS38 metaboliti ile etkileştirilen LNCaP prostat kanseri hücrelerinde apoptozun, Bcl-2 gen ekspresyonunun azalmasıyla indüklendiğini göstermişlerdir.
- Maruyana ve arkadaşlarının [107] yaptıkları çalışmada Bcl-2 geninin apoptoz üzerindeki etkisi bir köpek meme bezi tümör hücresinde denenmiş, apoptozu arttırdığını ve hem mRNA hem de protein ifadesini azalttığını göstermişlerdir.
- Swapan ve arkadaşlarının [98] yaptıkları çalışmada, U138MG ve U251MG insan glioblastoma hücreleri üzerinde, Bcl-2 siRNA'nın 25, 50, 100 nM olarak apoptoza etkinliği incelenmiş 25 nM konsantrasyonunda yaklaşık %15 civarında olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise bu oran yaklaşık % 21 olarak tespit edilmiştir.
- Pandya ve arkadaşlarının [108] yapmış oldukları çalışmada ise; 25 nM Bcl-2 siRNA'nın tek başına hücre çoğalmasına olan etkisi HeLa ve

MCF-7 hücre hatlarında incelenmiş ve 120 saatin sonundaki değerlendirilmede Hela hücresinde ortalama %19, MCF-7 hücresinde ise ortalama %17 oranında hücre çoğalmasını etkilediği görülmüştür.

Sonuç olarak; meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere siRNA taşıyan pozitif yüklü PHEMAH nanopartikülü kanserli hücrelere gönderilerek orada istenen proteinleri hedefleyip kanserli hücrelerinin proliferasyonuna engel olmayı amaçlayan bu çalışma ile geleneksel kanser tedavilerindeki olumsuzlukları en aza indirmek hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de yapılan bu çalışma; hedefli gen tedavisinde ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır ve siRNA'nın hücreye taşınmasında PHEMAH nanopartikülünün de kullanılabileceğini göstermektedir.

Kullanılan materyallerin pahalı, bütçe ve zamanın sınırlı olması nedeniyle çalışmada tek bir housekeeping gen (β -actin) referans olarak kullanılmıştır, Çalışma sırasında oluşan düşünce ve önerilerin de doğrultusunda çalışmanın sonucunu daha iyi desteklemek amacıyla daha fazla sayıda housekeeping genin ileride yapılması planlanan çalışmalar da kullanılması da önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ruddon R.W., Cancer Biology, 4th ed., Oxford University Press, New York, 3-5, 2007.
- [2] Boyle P., Levin B., World Cancer Report 2008, Published by the International Agency for Research on Cancer, Lyon, 02-26, 2008.
- [3] Anonim, Cancer Fact, Figures 2014, Publication of the American Cancer Society, Atlanta, Georgia, 06-29, 2014.
- [4] Anonim, Cancer Fact sheet N°297, World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Erişim Tarihi: 11.04.2014).
- [5] Akyol H., Kemoterapinin Temel İlkeleri, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, 59-163, 2004.
- [6] Karaboz İ., Çolak C., Antisens Teknolojisi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 5 (2): 14-37, 2007.
- [7] Barnes, M. N., Deshane, J. S., Rosenfeld, M., Siegal, G.P., Curiel, D.T., Alvarez, R.D., Gene therapy and ovarian cancer: a review, ObstetricsGynecology, 89, 145–55, 1997.
- [8] Saka O. M., Anti-Anjiogenik Etki Gösteren Non-Viral Gen Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2009.

- [9] Özvaran M.K., Malign Mezotelyomada Gen Tedavisi, Türk Toraks Dergisi. 5 (2): 110-115, 2004.
- [10] Guo J., Bourre L., Soden D.M., O'Sullivan G.C., O'Driscoll C., Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics?, Biotechnology Advances. 29: 402–417, 2011.
- [11] Huang C., Li M., Chen C., Yao Q., Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications, Expert Opinion on Therapeutic Targets. 12 (5): 637-645, 2008.
- [12] Chouhan R., Bajpai A.K., Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles, Journal of Nanobiotechnology. 7 (5): 1477-3155, 2009.
- [13] Tunç İ., Zergeroğlu S., Hepşen Daylan B., Aydoğdu T., Mollamahmutoğlu L., Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonlar ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu, Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. 7 (4): 140-148, 2004.
- [14] White M.C., Peipins L.A., Watson M., Trivers K.F., Holman D.M., Rodriguez J.L., Cancer Prevention for the Next Generation, Journal of Adolescent Health. 52: 1-7, 2013.
- [15] Anonim, What is Cancer ?, National Cancer Institue,<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>, (Erişim tarihi: 03.07.2014).
- [16] Anonim, Understanding Cancer Series: Cancer, Loss of Normal Growth Control, National Cancer Institue,

<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page4>, (Erişim tarihi: 04.07.2014).

- [17] Anonim, Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014, What is breast cancer?, Publication of the American Cancer Society, Atlanta, Georgia, 1-2, 2013.
- [18] Trichopoulos D., Lagiou P., Adami H.O., Towards an integrated model for breast cancer etiology, The crucial role of the number of mammary tissue-specific stem cells, Breast Cancer Res. 7: 13-17, 2004.
- [19] Moulder S., Hortobagyi G.N., Advances in the treatment of breast cancer, Clinical Pharmacology and Therapeutics. 83 (1), 26-36, 2008.
- [20] Özmete S., Cerrahi Tedavi Uygulanan Meme Kanserli Hastaların Erken Dönem Sonuçları, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Adana, 4, 2007.
- [21] Geske F.J., Gerschenson L.E., The biology of apoptosis, Hum Pathol. 32: 1029-1038, 2001.
- [22] Hacker G, The morphology of apoptosis, Cell Tissue Res. 301: 5-17, 2000.
- [23] Martin L.J., Al-Abdulla N., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera-Cailliau C., Neurodegeneration in Excitotoxicity, Global Cerebral Ischemia, and Target Deprivation: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis, Brain Research Bulletin, 46, 4, 281-309, 1998.

- [24] Cohen J.J., Apoptosis, *Immunol Today*. 14: 126-130, 1993.
- [25] Adams J.M., Cory S., The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival, *Science*. 281: 1322–1326, 1998.
- [26] İnci A., Yıldırım A., Yavuz A., Düzlü Ö., Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis, *Derleme, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 6 (2): 121-133, 2009.
- [27] Tsujimoto Y., Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?, *Genes Cell*. 3: 697-707, 1998.
- [28] Miyashita T., Harigai M., Hanada M., Reed J.C., Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene, *Cancer Res*. 54: 3131–3135, 1994.
- [29] Tan M.L., Choong P.F., Dass C.R., Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61 (1): 3-12, 2009.
- [30] Anonim, WHO (World Health Organization), <http://www.who.int.en> (Erişim tarihi: 17.06.2014)
- [31] Ko A.H., Dolinger M., Rosenbaum E.H., *Everyone's Guide To Cancer Therapy*, Andrews McMeel Universal Company, Missouri, 5: 17-31, 2008.
- [32] Nehru M.R., Singh, P.O., *Nanotechnology and Cancer Treatment* , *Asian J. Exp. Sci.* 22 (2): 45 – 50, 2008.
- [33] Devita V.T., Chu E., A history of cancer chemotherapy, *Cancer Research*. 68: 8643-8653, 2008.

- [34] Wang X., Wang Y., Chen Z., Shin M.D., Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology, *Cancer Res. Treat.* 41 (1): 1-11, 2009.
- [35] Oylar Ö., Tekin İ., Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 2011.
- [36] Delaney G., Jacob S., Featherstone C., Barton M., The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer*. 104 (6): 1129-1137, 2005.
- [37] Voss C.Y., Albertini M.R., Malter J.S., Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Cancer and Relevant Challenges for Transfusion Medicine, *Transfusion Medicine Reviews*. 18 (3): 189-202, 2004.
- [38] Kars A., Gen tedavisi, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma, 18-22 Mayıs, 2004.
- [39] Kaiser J., Death prompts a review of gene therapy vector, *Science*. 317: 580, 2007.
- [40] Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D., Arthritis gene therapy's first death, *Arthritis Research & Therapy*. 10: 110, 2008.
- [41] Wang X., Su C., Cao H., Li K., Chen J., Jiang L., Zhang Q., Wu X., Jia X., Liu Y., Wang W., Liu X., Wu M., Qian Q., A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying p53 gene exerts potent antitumor efficacy on common human solid cancers. *Mol Cancer Ther.* 7: 1598–1603, 2008.
- [42] Li S., Huang L., Non-viral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7: 31–34, 2000.

- [43] Mao H.Q. et al., Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficacy. *J Control Release*. 70: 399–421, 2001.
- [44] Gao Y., Liu X.L., Li X.R., Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine*. 6: 1017-1025, 2011.
- [45] Gewirtz A.M., On Future's Doorstep: RNA Interference and The Pharmacopeia of Tomorrow, *The Journal of Clinical Investigation*. 117 (12): 3612- 3614, 2007.
- [46] Sifuentes-Romero I., Milton S.L., García-Gasca A., Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand?, *Mutation Research*. 728 (3): 158–171, 2011.
- [47] Hammond S.M., Caudy A.A., Hannon G.J., Post-Transcriptional Gen Silencing by Double Stranded RNA, *Nature Reviews&Genetics*. 2: 110-119, 2001.
- [48] Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., Introduction of A Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Result in Supression of homologous Revesible Co-supression of Homologous Genes in Trans, *The Plant Cell*. 2: 279- 289, 1990.
- [49] Cunningham C.C., New modalities in oncology: antisense oligonucleotides, *Prac (Bayl Univ Med Cent)*. 15 (2): 125-128, 2002.
- [50] IDT Tutorial, Antisense Technologies, Integrated DNA Technologies, 1-12, 2005.

- [51] Kurreck J., Antisense Technologies improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270: 1628-1644, 2003.
- [52] Aigner A., Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct applications of siRNAs. *Journal of Biotechnology.* 124 (1): 12-25, 2006.
- [53] Ruiz M.T., et al., Initiation and Maintenance of Virus- induced Gene Silencing, *Plant Cell.* 10: 937- 946, 1998.
- [54] Angell S.M., Baulcombe D.C., Consistent Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing A Replicating Potato Virus X RNA, *EMBO Journal.* 16: 3675- 3684, 1997.
- [55] Dougherty W.G. et al., RNA-Mediated Virus Resistance in Transgenic Plants: Exploitation of A Cellular Pathway Possibly Involved in RNA Degradation, *Molecular Plant Microbe Interactions.* 7: 544-552, 1994.
- [56] Fire A., et al., Production of Antisense RNA Leads to Effective and Specific Inhibition of Gene Expression in *C. elegans* Muscle, *Development.* 113: 503-514, 1991.
- [57] Fire A., et al., Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature.* 391: 806-811, 1998.
- [58] Agrawal N., et al., RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 657-685, 2003.

- [59] Bernstein E., et al., Role For A Bidentate Ribonuclease in The Initiation Step of RNA Interference, *Nature*. 409: 363-366, 2001.
- [60] Zamore P.D., et al., RNAi: Double-Stranded RNA Directs The ATP Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals, *Cell*. 101: 25-33, 2000.
- [61] Khanna D., Balgir P.P., Gurloveen K., RNA Interference: An Ancient Mechanism For Novel Therapeutics, *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*. 2 (2): 1-45, 2007.
- [62] Zhang H., Biochemistry and Modeling of Human Dicer, A Key Protein Involved in RNA Interference, Ph.D. Thesis, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, 2004.
- [63] Szweykowska- Kulinska Z., et al., RNA Interference and Its Role in The Regulation of Eucaryotic Gene Expression, *Acta Biochimica Polonica*, 50 (1): 217-229, 2003.
- [64] Zhang H., et al., Human Dicer Preferentially Cleaves dsRNAs at Their Termini Without A Requirement For ATP, *EMBO Journal*. 21: 5875- 5885, 2002.
- [65] Lee S.H., Sinko P.J., siRNA-Getting the message out, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27: 401-410, 2006.
- [66] Karagüzel A., Kalay E., Celep F., RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 33 (1): 41-44, 2007.

- [67] Selli Ç., TRPC iyon kanallarının işlevsel ekspresyon kalıplarının post-transkripsiyonel gen susturma ile araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 125, 2011.
- [68] Rand T.A., et al., Argonaute2 Cleaves The Anti-Guide Strand of siRNA During RISC Activation Cell. 123: 621-629, 2005.
- [69] Eggleston A., RNAi Therapy Collection, Nature Collections, 54, 2005.
- [70] Gündoğdu R. ve Çelik V., Rna İnterferans (Rnai), Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 25: 1-2, 34-47, 2009.
- [71] Reddy L.S., Sarojamma V., Ramakrishna V., Future of RNAi in Medicine. A Review, World Journal of Medical Sciences. 2 (1): 1-14, 2007.
- [72] Masiero M., Nardo G., Indraccolo S., Favaro E., RNA interference: Implications for cancer treatment Molecular Aspects of Medicine. 28: 143-166, 2007.
- [73] Deura V., Nanotechnological Applications In Cancer Treatment, 1st ed., Global Vision Publishing House, India, 1-9, 2008.
- [74] Şengel-Türk C.T., Hasçıçek C., Polimerik Nanopartiküller İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Yüzey Modifikasyonu Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara, 38 (2): 137-154, 2009.
- [75] Campbell P., Cancer nanotechnology: Small, but heading fort he big time, Nature Reviews Drug Discovery. 6: 174-175, 2007.

- [76] Riegler J., Nann T., Application of luminescent nanocrystals as labelsfor biological molecules,Anal. Bioanal. Chem. 379: 913–919, 2004.
- [77] Wang X.H., Aliyari R., Li W.X., Li H.W., Kim K., Carthew R.,Atkinson P., Ding S.W.,RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult Drosophila, Science, 312, 452, 2006.
- [78] Burikhanov R., Zhao Y., Goswami A., Qiu S., Schwarze S.R., Rangnekar V.M., The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis Cell, 138, 2, 377-88, 2009.
- [79] Portakal O., Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller, Türk Biyokimya Dergisi. 33 (1): 35–38, 2008.
- [80] Tkachenko A.G., Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M.F., Franzen S., Feldheim D.L.,Multifunctional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes for Nuclear Targeting, J. Am. Chem. Soc. 125 (16): 4700-4701, 2003.
- [81] Özcan Ö., Türk Populasyonunda Gastrointestinal Sistem Kanseri Olgularında Fosfatidilinositol-3-Kinaz Katalitik Alfa (PIK3CA) Gen Mutasyonları ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T Polimorfizminin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, Temmuz, 2009.
- [82] Klug W.S., Cummings M.R., Genetik Kavramlar, 515, Palme Yayıncılık, Ankara, 2003.
- [83] Özmen M., Tavuk Trakelerinde Mikoplazma Galliseptum'un Real-Time PCR Tekniği İle Saptanması ve İstatistik Analizi, Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2011.

- [84] Wittwer C., T., Lay M., J., Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR, *Clinical Chemistry* 43: (12), 2262–2267, 1997.
- [85] Günel T., Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 27, 2007.
- [86] Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E., "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential". *BioTechniques*. 26 (1): 112–22, 1999.
- [87] Grove D.S., Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector, *Journal of Biomolecular Techniques*. 10: 11–16, 1999.
- [88] Mikael at all., The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2-3): 95-125, 2006.
- [89] Bustin S.A., Mueller R., Review: Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*. 109: 365-379, 2005.
- [90] Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K., Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization, *Genome Res*. 4: 357-362, 1995.
- [91] Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H., Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7276–7280, 1991.

- [92] Ohi F., Jung M., Xu C., Stephan C., Rabien A., Burkhardt M., Nitsche A., Kristiansen G., Loening S.A., Radonić A., Jung K. 2005. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?, *J. Mol. Med.* Dec. 83 (12): 1014-24, 2005.
- [93] Jung M., Ramankulov A., Roigas J., Johannsen M., Ringsdorf M., Kristiansen G., Jung K., In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, Jun. 8: 8-47, 2007.
- [94] Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J., GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, *Physiol Genomics*. 21: 389–395, 2005.
- [95] Morris T., Robertson B., Gallagher M., Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2933-2936, 1996.
- [96] Koga K., Hattori Y., Komori M., Narishima R., Yamasaki M., Hakoshima M., Fukui T., Maitani Y., Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis, *Cancer Science*. 101 (4): 941-947, 2010.
- [97] Wang S., Liu G., Ahmad S., Liu W., Riaz H., Jiang X., Vasoactive intestinal peptide suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro by up-regulating Bcl-2 gene expression, *Animal Reproduction Science*. 132: 201–206, 2012.
- [98] George J., Banik N.L., Ray S.K., Combination of taxol and Bcl-2 siRNA induces apoptosis in human glioblastoma cells and inhibits

invasion, angiogenesis and tumour growth, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (10): 4205-4218, 2009.

- [99] Lima R.T., Martins L.M., Guimaraes E.J., Sambade C., Vasconcelos M.H., Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells, *Nature Publishing Group, Cancer Gene Therapy.* 11: 309–316, 2004.
- [100] Serter N., *Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*, 8. Baskı, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi, 8. Baskı, Eskişehir, 101-104, 2006.
- [101] Harrison R., Greenman M.J., Mall F.P., Jackson C.M., Observations on the living developing nerve fiber, *The Anatomical Record.* 1 (5): 116-128, 1907.
- [102] Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A., A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics.* 288: 369–376, 2005.
- [103] Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *METHODS.* 25: 402–408, 2001.
- [104] Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature.* 411: 494-498, 2001.
- [105] Blankenstein T., ed. *Gene Therapy Principles and Applications.* Basel; Boston; Berlin; Birkhauser, 1999.

- [106] Liu X., Yao X., Kirschenbaum A., Levine, A.C., NS398, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis and Down-Regulates Bcl-2 Expression in LNCaP Cells, *Cancer Research*. 58: 4245-4249, 1998.
- [107] Nagamatsu K., Tsuchiya F., Oguma K., Maruyama H., Kano R., Hasegawa A., The effect of small interfering RNA (siRNA) against the Bcl-2 gene on apoptosis and chemosensitivity in a canine mammary gland tumor cell line, *Research in Veterinary Science*. 84: 49–55, 2008.
- [108] Pandya A.A., Berg R., Vincent M., Koropatnick J., Combination Silencer RNA (siRNA) Targeting Bcl-2 Antagonizes siRNA against Thymidylate Synthase in Human Tumor Cell Lines, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 322 (1): 11, 2006.