



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**siRNA YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ İLE HELA
HÜCRELERİNDE E6 GENİNİN SUSTURULMASI**

ŞEYMA ERDAL
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

KIRIKKALE - 2024



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**siRNA YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ İLE HELA
HÜCRELERİNDE E6 GENİNİN SUSTURULMASI**

ŞEYMA ERDAL
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

KIRIKKALE - 2024

ŞEYMA ERDAL tarafından hazırlanan “siRNA YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ İLE HELA HÜCRELERİNDE E6 GENİNİN SUSTURULMASI ” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Doç. Dr. Murat İNAL

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: /...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şeyma Erdal

27.09.2024

ÖZET

siRNA YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ İLE HELA HÜCRELERİNDE E6 GENİNİN SUSTURULMASI

ERDAL, Şeyma

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Eylül 2024, 73 Sayfa

Günümüzde kanser hastalığı ciddi sağlık sorunlarından ve en ölümcül hastalıklardan biridir. Rahim ağzı kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinde üçüncü sıradadır. Geleneksel kanser tedavilerinde hastalar, tümörü yok etmek için kemoterapi gibi yüksek doz sitotoksik ajanlara maruz kaldıklarından dolayı istenmeyen sistemik toksisiteye maruz kalmaktadır. Gen terapi yöntemi olarak kullanılan siRNA mekanizması, hedeflenen genin transkripsiyon sonrası diziye özgü bir şekilde inhibe edilmesini sağlayarak kanser gibi hastalıkların hedeflenmesi için gen tedavisinde önemli bir araç haline gelmiştir. siRNA'nın verimli bir şekilde hücrelere taşınması için nanoteknolojinin en önemli ürünlerinden olan nanopartiküller kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki kitosan biyobozunurluluk, yüksek biyoyumluluk, pozitif yük ve düşük toksisite gibi özelliklere sahip olması nedeniyle siRNA'yı hücrelere verimli şekilde taşıyarak kanser tedavisi için umut vadeden gelişmelere katkı sağlamaktadır.

Sunulan tez kapsamında rahim ağzı kanseri tedavisi için katyonik potansiyele sahip kitosan nanopartiküllerine yüklenmiş siRNA'nın HeLa hücre hattına aktararak E6 gen ifadesinin baskılanması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın ilk bölümünde kitosan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlenmiş ve nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra siRNA ile muamele edilmiş kitosan nanopartiküllerin agaroz jel elektroforez işlemi yapılarak, nanopartikül ile

siRNA'ların birbirine tutunup tutunmadığı kontrol edilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise; siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. MTT testi yapılarak hücre ölüm oranları değerlendirilmiştir. Daha sonra ikili boyama yöntemi kullanılarak hücreler üzerinde ki apoptotik ve nekrotik etkileri incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise Real Time-PCR yöntemi kullanılarak siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa hücre hattında ki hedef genin ifade seviyelerine ve inhibasyon etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kitosan nanopartiküllerin verimli siRNA taşıyıcıları olarak kullanılabilceğini ve uygun dozlarda kullanılan siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin E6 geninin ifade seviyesini etkili bir şekilde baskılayabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, TPP, siRNA, Rahim ağzı kanseri, HeLa, Gen terapisi, E6 geni, RT-PCR

ABSTRACT

SILENCING OF THE E6 GENE IN HELA CELLS WITH siRNA-LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES

ERDAL, Şeyma

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

September 2024, 73 Pages

Today, cancer is one of the most serious health problems and one of the deadliest diseases. Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide. In conventional cancer treatments, patients are exposed to unwanted systemic toxicity due to exposure to high doses of cytotoxic agents such as chemotherapy to destroy the tumour. The siRNA mechanism, which is used as a gene therapy method, has become an important tool in gene therapy for targeting diseases such as cancer by inhibiting the targeted gene in a sequence-specific manner after transcription. Nanoparticles, one of the most important products of nanotechnology, are used to efficiently transport siRNA into cells. Recent studies in cancer treatment have shown that chitosan contributes to promising developments for cancer treatment by efficiently transporting siRNA to cells due to its properties such as biodegradability, high biocompatibility, positive charge and low toxicity.

In this thesis, it was aimed to suppress E6 gene expression by transferring siRNA loaded in chitosan nanoparticles with cationic potential for cervical cancer treatment to HeLa cell line. In the first part of this study, chitosan nanoparticles were synthesised by ionic gelation method and nanoparticles were characterised. Then, agarose gel electrophoresis of siRNA-treated chitosan nanoparticles was performed and it was checked whether the nanoparticles and siRNAs adhered to each other. In the second part of the study, the effects of siRNA loaded chitosan nanoparticles on

HeLa cancer cells were investigated. Cell death rates were evaluated using MTT test. Then, apoptotic and necrotic effects on cells were examined using the double staining method. In the last stage of the study, the expression levels and inhibition effect of siRNA-loaded chitosan nanoparticles on the target gene in HeLa cell line were examined using Real Time-PCR method. The results obtained showed that chitosan nanoparticles can be used as efficient siRNA carriers and siRNA-loaded chitosan nanoparticles used at appropriate doses can effectively suppress the expression level of the E6 gene.

Keywords: Chitosan, TPP, siRNA, Cervical cancer, HeLa, Gene therapy, E6 gene, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim, bana her konuda yol gösterici olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve bilimsel deneyimlerinden yararlanma imkanı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e ve Doç. Dr. Murat İNAL'a,

Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılan deneyler boyunca bana her şekilde yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Beste ÇAĞDAŞ hocama ve İstanbul Gelişim Üniversitesi Öğr. Gör. Aleyna ÇAVDAR arkadaşşıma,

Analizlerimin bir kısmını yapmama yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarı Müdürü Prof. Dr. Siyami Karahan'a, Doç. Dr. Ogün BOZKAYA'ya ve Öğr. Gör. Nebahat Aytuna ÇERÇİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışması Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 2022/105 numaralı projesi tarafından desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte yanımda olup desteğini bir an olsun benden esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser Nedir?.....	4
2.2. Serviks Kanseri.....	5
2.3. HPV Virüsü	7
2.4. E6 Geni.....	8
2.5. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Yöntemler	10
2.5.1. Cerrahi	10
2.5.2. Kemoterapi	11
2.5.3. Radyoterapi	12
2.5.4. İmmunoterapi	12
2.5.5. Fotodinamik Terapi	13
2.5.6. Hipertermi	14
2.5.7. Gen Terapi	14
2.6. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları.....	15
2.7. Kanser Tedavisi İçin Moleküler Hedefleme	16
2.8. Hücre İçine Taşımada Kullanılan Vektörler	16
2.8.1. Viral Vektörler	17
2.8.2. Viral Olmayan Vektörler.....	17

2.9. Kitosan.....	18
2.10. RNA İnterferans (RNAi) Teknolojileri	21
2.11. siRNA (Small Interfering RNA; Küçük Müdahaleci RNA)	22
2.12. siRNA Mekanizması	23
2.13. Apoptoz ve Nekroz.....	23
2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	24
2.15. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (Real-Time Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)	25
3.MATERYAL METOD	27
3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	27
3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Üretimi.....	28
3.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	29
3.3.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Boyut ve Yük Analizi.....	29
3.3.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Kimyasal Yapısının Analizi	30
3.3.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	30
3.4. Agaroz Jel Elektforezi ile Kitosan Nanopartiküllerinin siRNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi	30
3.5. Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi.....	30
3.6. Hücre Kültürü Analizi	31
3.6.1. HeLa Hücre Hattı	31
3.6.2. Hücrelerin Hazırlanması.....	32
3.7. Kitosan Nanopartiküllerinin, siRNA'nın ve siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	33
3.8. Kitosan Nanopartiküllerinin, siRNA'nın ve siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Hücreleri Üzerinde İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi.....	34
3.9. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (Real-Time Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) Analizi.....	35
3.9.1. Hücrelerin Hazırlanan Kitosan Nanopartikül (NP)/siRNA Kompleksleri ile Muamelesi	35
3.9.2. RNA İzolasyonu İçin Hücrelerin Toplanması.....	36
3.9.3. RNA İzolasyonu	36

3.9.4. cDNA Sentezi	37
3.9.5. Real-Time qPCR	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	40
4.1.1. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi.....	40
4.1.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Kimyasal Yapısının Belirlenmesi (FTIR Analizi).....	42
4.1.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	43
4.2. Agaroz Jel Elektroforezi ile Kitosan Nanopartiküllerinin siRNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi	44
4.3. Enkapsülasyon Verimi Sonuçları	45
4.4. MTT Test Sonuçları	46
4.5. Apoptoz-Nekroz İkili Boyama Sonuçları.....	47
4.6. RT-PCR Sonuçları.....	52
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	55
KAYNAKÇA	60
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. Rahim ağzının anatomik yapısı.....	6
2.2. E6 geninin mekanizması	10
2.3. Nanopartikül yapıları	16
2.4. İn vivo siRNA iletimi ile ilgili zorluklar ve serbest siRNA iletimi problemlerinin üstesinden gelmek için nano taşıyıcıların kullanılmasıyla sağlanan çözümler.....	18
2.5. Kitosanın kimyasal yapısı	19
2.6. Farklı yöntemler kullanarak kitosan bazlı DNA/siRNA nanoparçacıklarının sentezi	19
2.7. Kitosan ve siRNA'nın hücrelere transferi.....	20
2.8. siRNA mekanizması.....	23
3.1. Kitosan-tripolifosfat (TPP) nanopartiküllerinin sentezinin şematik gösterimi	29
3.2. HeLa hücrelerinin mikroskop görüntüsü	32
4.1. Kitosan nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi	41
4.2. Kitosan nanopartiküllerin boyut analizi	41
4.3. (A) TPP molekülünün, (B) Kitosan molekülünün, (C) Kitosan-TPP nanopartiküllerinin FTIR spektrumları.....	43
4.4. Kitosan nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	44
4.5. Nanopartikül-siRNA agaroz jel görüntüsü.....	44
4.6. Enkapsülasyon verimi kalibrasyon grafiği.....	46
4.7. Hoechst 33342 ve PI boyaları ile HeLa hücrelerinin ikili boyama sonucu elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	50
4.8. Hoechst 33342 ve PI boyaları ile HeLa hücrelerinin ikili boyama sonucu elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları	51
4.9. 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa hücrelerindeki E6 geninin ekspresyon değerleri.....	53
4.10. 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa hücrelerindeki E6 geninin ekspresyon değerleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	27
3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	27
3.3. Çalışmada kullanılan siRNA ve primerler	28
3.4. RNA izolasyonu için kullanılan izolasyon kitinin markası, adı ve katalog numarası	36
3.5. cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı	37
3.6. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları	38
3.7. Ekpresyon analizi için kullanılan primer bilgileri	38
3.8. RT-PCR için kullanılan PCR karışımı	39
3.9. RT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları	39
4.1. Farklı siRNA konsantrasyonlarında ölçülen 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri	45
4.2. Sentezlenen konjugatların farklı konsantrasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksosite sonuçları	46
4.3. Kitosan nanopartikül, 100 ve 200 nM E6-siRNA ve E6-siRNA yüklü nanopartiküllerin HeLa hücre kültürü ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen % apoptoz ve nekroz indeksleri	48

KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	Komplementer DNA
CO ₂	Karbondioksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsRNA	Çift sarmallı RNA
DS	Dekstran sülfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELİSA	Enzim bağlantılı immün analiz
E6AP	E6 ile ilişkili protein ligaz
FBS	Fetal sığır serum
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrosu
FITC	Yeşil floresan
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HeLa	İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	Polidispersite indeksi
PGA	Poli-d glutamik asit
PI	Propidium İyodit

pRb	Retinoblastoma protein
p53	Tümör protein 53
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferansı
RT-QPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA-indüklü susturma kompleksi
siRNA	Küçük müdahaleci RNA
shRNA	Kısa firkete RNA
TPP	Sodyum Tripolifosfat
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
miRNA	Mikro RNA
MDR	Çoklu İlaç Direnci
NaOH	Sodyum hidroksit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid

1. GİRİŞ

Kanser, 21. yüzyılın hâlâ en tehlikeli hastalıklarından biridir. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliği onları ölümsüz kılan sınırsız hücre bölünmesi yeteneğidir [1]. Bir dokuda çoğalması, tümör oluşumunun hızlanması, hareket kabiliyetinin artması, diğer dokulara istila etmesi gibi davranışları yanında organların işlevinde ve hemostaz durumunda bozukluklara da neden olmaktadır [2]. Rahim ağzı kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen üçüncü kanserdir. Neredeyse tüm rahim ağzı kanseri vakaları, insan papilloma virüsü (Human Papilloma Virüs; HPV) enfeksiyonuna bağlanabilir. HPV tipleri genel olarak onkogenik potansiyellerine göre düşük riskli ve yüksek riskli olarak sınıflandırılır. Düşük riskli HPV türleri asemptomatik olabilir veya genital siğillere neden olabilirken, yüksek riskli türler onkogeniktir [3].

Moleküler biyoloji alanında son yıllarda kaydedilen ilerlemeler, kanserin moleküler temelini daha iyi anlaşılmasını sağlamış, kanser tanı ve tedavisinde önemli ilerlemelere neden olmuştur [1]. Dünya çapında ölüm nedenleri arasında yer alan kanser, dünyada biyomedikal araştırma ve uygulamaların uzun süredir devam eden ve hızla gelişen bir odağı olmuştur [4]. Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavileri bazı sınırlamalar nedeniyle hala yetersiz kalmaktadır. Bunlar, anti-tümör ajanlarının spesifik olmayan yaygın dağılımı, tümör lokasyonuna ulaşan ajanların yetersiz konsantrasyonları, aşırı sitotoksosite gibi nedenlerden dolayı yetersiz tedavi yanıtlarını ve çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [5]. Geleneksel kemoterapiye direnç gelişmesi nedeniyle kanser tedavisinde genetik araçların kullanılması umut verici adaylar olarak değerlendirilmektedir. "Susturucu" RNA olarak bilinen küçük müdahaleci RNA (small interfering RNA; siRNA), hedef geni baskılama kapasitesine sahip bir RNA interferans (RNAi) aracıdır. Kanserde onkogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu nedeniyle siRNA, bu yolları baskılamak için kullanılabilir [6]. siRNA'nın keşfi, onkoloji dünyasında yeni bir atılım ve kanser tedavisi için güçlü bir araç olarak dünya çapındaki bilim adamları ve hastalar için umut vaat etmektedir [7].

Gen terapisi umut verici bir terapötik yaklaşımdır çünkü hastalığa neden olan genleri, diziye özgü bir şekilde hedef alır ve bu da yaşamı tehdit eden çeşitli hastalıkların daha kesin ve kişiselleştirilmiş tedavisine olanak tanır. Hastanın istenen dokusuna belirli bir nükleik asit molekülü sokularak gen ekspresyonu azaltılabilir, artırılabilir veya düzeltilir [8]. Bu teknoloji, geleneksel ilaçlarla tedavi edilebilen ancak tamamen iyileştirilemeyen hastalıkları tedavi etme potansiyeline sahiptir ve böylece daha önce tedavi edilemez olarak sınıflandırılan hastalıkların tedavi edilmesini sağlar. Bu nedenle insan gen terapisi, içinde bulunduğumuz yüzyıldaki araştırmaların önemli noktalarından biridir [9].

RNAi, hücrelerde gen susturulmasına aracılık etmek için siRNA'ları kullanır ve kanser tedavisi için yeni ortaya çıkan bir stratejiyi temsil eder. Başarılı RNAi aracılı gen susturma, siRNA'ların tümör veya konakçı hücreler de dahil olmak üzere in vivo hücrelere etkili bir şekilde iletilmesini sağlamak için birden fazla fizyolojik engelin aşılmasını gerektirir [10]. siRNA bazlı terapötiklerin intravenöz uygulama yoluyla klinik uygulamaları, hızlı bozunmaları, zayıf hücresel alımları, endositik alımdan kaçarak düşük sitoplazmik salınımları ve hedef dışı etkileri nedeniyle sınırlı olmuştur. siRNA bazlı terapötiklerin başarısı, siRNA'yı in vivo ortamda bozulmadan koruyabilen ve özellikle siRNA'yı hedef hücrelerin sitozolüne iletebilen etkili dağıtım vektörlerinin tasarımına ve oluşturulmasına bağlıdır [11].

Doğal polisakkaritler biyoyumurlulukları, biyobozunurlukları ve düşük toksisiteleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca yapı, boyut ve yük bakımından çeşitlilik gösterirler. Ayrıca kimyasal fonksiyonel grupları, nihai uygulamanın ve uygulama şeklinin ihtiyaçlarına uyacak şekilde kolayca değiştirilebilir [12]. Polianyonik siRNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerin oluşumu, siRNA'yı in vitro veya in vivo olarak iletebilen kolloidal parçacıkların oluşumuna kolay erişim sağlar. siRNA iletimi için kullanılan polikasyonlar arasında kitosan, benzersiz fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı özel bir yere sahiptir [13].

HPV ile ilişkili tümörler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar, iki viral onkoprotein E6 ve E7'nin rahim ağzı kanserlerinin gelişiminde ve malignitesinde ana role sahip olduğunu göstermektedir. E6 ve E7 onkoproteinlerinin düzensiz ve aşırı ekspresyonu, hücresel yollarda çeşitli değişikliklere yol açar; bunlardan en önemlisi,

iki önemli tümör baskılayıcı protein olan p53 ve pRb'nin bozulmasıdır. p53, vücuttaki homolog genler tarafından kodlanan proteinin herhangi bir izoformudur. Bu homolog, çok hücreli organizmalarda kanser oluşumunu engellediği ve dolayısıyla tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı için önemlidir. Bu nedenle p53, genetik mutasyonları önleyerek stabiliteyi korumadaki görevi nedeniyle "genomun koruyucusu" olarak tanımlanır ve tümör baskılayıcı bir gen olarak sınıflandırılır [14]. E6 onkoproteini, E6AP (E6 ile ilişkili protein ligaz) ve tümör baskılayıcı p53 ile bir kompleks oluşturarak p53 degradasyonuna aracılık eder. Bu durum hücre döngüsünün durması, apoptozun indüklenmesi ve hücre yaşlanma gibi p53 fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır [15].

Bu çalışmanın amacı; rahim ağzı kanseri tedavisinde verimli siRNA taşınımı için pozitif yüklü kitosan nanopartikülü sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve elde edilen nanopartiküllere E6 siRNA'nın transfer edilerek HeLa hücre hattına aktarılması ile kanser hücreindeki hedeflenen E6 geninin susturulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Nedir?

Kanser yüzyıllar önce olduğu gibi bugün de aramızdaki varlığını sürdürmektedir ve insan sağlığı için geçmişe göre daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 yılında, kanserin 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş altı ölümlerin birinci veya ikinci nedeni olduğunu, 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü önde gelen neden olduğunu tahmin etmektedir [16].

Kanser, esas olarak normal büyüme yollarından sapan, komşu normal dokulara göç eden ve esas kökenleri dışındaki bölgelerde ikincil tümörlere (metastaz) yol açan tek somatik mutasyonların neden olduğu bir hastalıktır. İnsanlarda, vücuttaki hemen hemen her dokuda meydana gelebilecek yüzden fazla kanser çeşidi bulunmaktadır. Her kanser türünün kendine ait özellikleri olmasına rağmen, tüm bu farklı tümörler, genetik ve epigenetiği içeren ortak bir ilerleme şemasına göre gelişmektedir [17].

Erkeklerde en sık görülen kanserler; prostat, akciğer, kolon, karaciğer ve mide kanserleri olmasına rağmen kadınlarda en sık görülen kanserler ise meme, akciğer, rahim ve tiroid kanserleridir [18].

Sağlıklı hücre ve kanserli hücre biyolojisi arasındaki farklar biyokimya, anatomi ve moleküler biyoloji ile ilgili farklılıkları içermektedir. Tümör biyolojisinin karakteristik anatomik özellikleri, tümör dokusunda vasküler sızıntıyı ve yetersiz lenfatik drenajı içermektedir. Vasküler endotel hücrelerinin morfolojisi ve şekli, bitişik hücreler arasındaki pencerelerin varlığı ve temas inhibisyonunun olmaması nedeniyle kanser damarlarında farklılık göstermektedir. Katı tümörlerin çoğu, belirli bir büyüme düzeyine ulaştıktan sonra artmış vasküler geçirgenlik sergilemektedir. Bu, tümör dokusuna çevre dokulardan daha hızlı büyümesi için yeterli besin ve oksijen sağlar. Tümör damarları, normal dokuya kıyasla aşırı halkalar ve arteriyovenöz şantlar içeren bir dallanma örneği sergiler ve genellikle geniş ve kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Bu özellikler, normal dokulardaki kan damarlarına kıyasla tümörlerdeki kan damarlarının geçirgenliğini artırarak, normal dokulardaki

kan damarlarından geçemeyen moleküllerin ve diğer maddelerin tümör dokusuna taşınmasını ve birikmesini sağlar [19].

Tümörler iyi huylu veya kötü huylu olarak sınıflandırılabilirler. İyi huylu tümörler, yavaş büyürler ve yayılım göstermezler. Genellikle fibröz bir bağ doku kapsülü ile çevrilidir bu da hücre ayrılmasını önler ve cerrahi diseksiyonu kolaylaştırır. Kötü huylu tümörler, hızlı büyüyen, kapsüllenmemiş ve yayılım gösterdikleri için kansere neden olurlar [20].

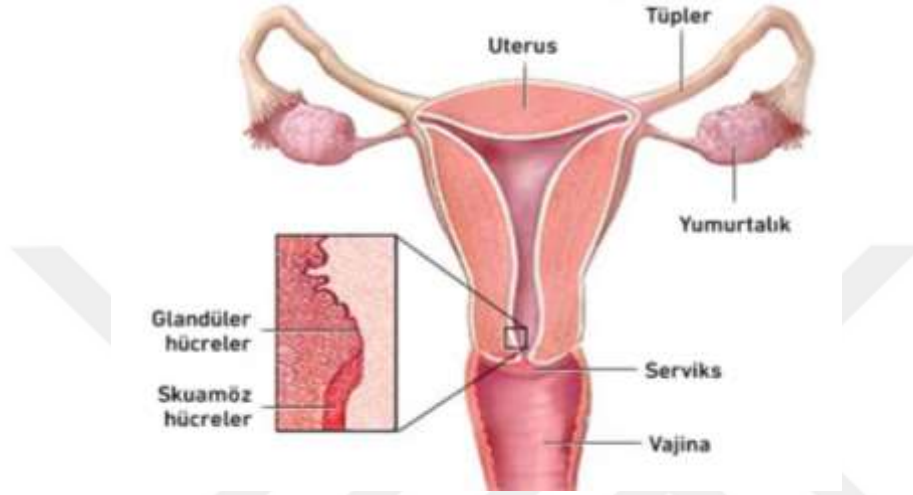
Normal, sağlıklı hücreler kansere neden olan ajanlarla temas ettiğinde, hücrelerin DNA'sında mutasyonlar ve değişiklikler meydana gelir. Bu patojenler arasında fiziksel (iyonlaştırıcı radyasyon ve ultraviyole), kimyasal (asbest, anilin boya, alkol) ve biyolojik kanserojenler (virüsler, mikotoksinler ve mantarlar) bulunur. Karsinojenler, normal hücre büyümesini ve onarımını engelleyen, mutasyonlara yol açan genetik değişikliklere neden olurlar [20]. Kanser biyolojisinin anlaşılması ve bu alandaki gelişmeler, hedefe yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır [21].

2.2. Serviks Kanseri

Rahim ağzını oluşturan iki kısım vardır ve iki değişik hücre tipi ile kaplıdır. Endoserviks, rahim ağzında rahime açılan açıklıktır. Glandüler hücrelerle kaplıdır. Ekzoserviks (veya ektoserviks), doktorların muayene sırasında görebilecekleri serviksin dış kısmıdır (Şekil 2.1). Rahim ağzı kanseri laboratuvarında mikroskop altında nasıl göründüklerine göre sınıflandırılır. Başlıca rahim ağzı kanseri türleri skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomdur. Rahim ağzı kanserlerinin çoğu skuamöz hücreli karsinomlardır. Bu kanserler ekzoservikste hücrelerden gelişmeye başlar. Skuamöz hücreli karsinom en yaygın olarak transformasyon bölgesinde, ekzoservikal endoservikal ile birleştiği yerde ortaya çıkar. Diğer rahim ağzı kanserlerinin çoğu adenokarsinomdur. Adenokarsinom, glandüler hücrelerden kaynaklanan bir kanserdir. Servikal adenokarsinom, endoserviksin mukus üreten bez hücrelerinden kaynaklanır. Daha az yaygın olmakla birlikte, rahim ağzı kanserleri hem skuamöz hücreli karsinomun hem de adenokarsinomun özelliklerini taşır. Bunlara adenoskuamöz karsinomlar veya karışık karsinomlar denir [3]. İnvaziv

rahim ağzı kanseri parametrium, vajina, uterus ve komşu organlara, yani mesane ve rektuma doğrudan yayılır [22].

Serviks kanserinin en sık semptomu ise ağrısız kanamadır [23]. Ayrıca sürekli, sulu ve soluk pembe renkte vajinal akıntı görülebilmektedir. Miktar olarak normalden daha fazla kanamayla seyreden ve daha uzun süren adet dönemleri rahim ağzı kanseri belirtisi olabilir [24].



Şekil 2.1. Rahim ağzının anatomik yapısı [25]

Rahim ağzı kanseri genellikle kötü huylu bir tümördür. Kadınlarda kötü bir kanser türü olması nedeniyle kadın sağlığı için büyük bir tehdittir. Küresel olarak, her yıl 500.000 yeni enfeksiyon ve 250.000'den fazla ölüm vardır. Bu rakamlar, gelişmekte olan ülkelerde bildirilen yeni vakaların yaklaşık %80'ini ve dünya çapındaki tüm kanser vakalarının %5'ini oluşturmaktadır [26]. DSÖ yakın zamanda, daha etkili önleyici tedbirler alınmadığı takdirde rahim ağzı kanserinden ölümlerin yaklaşık yarı yarıya artabileceğini bildirmektedir [27].

Rahim ağzı kanseri gelişimini etkileyen faktörler arasında genç yaşta cinsel ilişki (<16 yaş), genital bölgedeki siğiller, HPV ve HIV pozitiflik bulunmaktadır. Aynı zamanda sigara içmek akciğer kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Sigara içenlerin servikal mukus veya epitelinde, tütüne özgü kanserojenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların hücrel DNA'ya zarar verdiği, tümör üretmek için HPV ile çalışabildiği belirtilmektedir [28].

Her yıl dünyada 493.000 hasta serviks kanseri tanısı almakta ve 274.000 insan hayatını kaybetmektedir. Rahim ağzı kanseri tarama programları olan, erken teşhis

edilip önlenebilen mevcut kanserlerden biridir ancak özellikle gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde önemli bir ölüm nedenidir [29]. Rahim ağzı kanseri insidansı yüksek olmasına rağmen, rutin HPV taraması, pap smear tabanlı testler ve son zamanlarda ki tedavideki yeni gelişmeler sayesinde hasta sağ kalımı önemli ölçüde artmıştır [30,31].

Pap smear testi ile rahim ağzından alınan hücreler incelenmektedir. Pap smear sonuçları anormal ise kolposkopi adı verilen özel bir işlem ve kimyasallar kullanılarak rahim ağzı genişletilerek incelenir ve gerekirse biyopsi yapılmaktadır [24].

2.3. HPV Virüsü

İnsan Papilloma Virüsü (HPV), servikal hücreli karsinomların gelişiminde en önemli faktördür [32]. Epidemiyolojik çalışmalar, genital HPV enfeksiyonu ve rahim ağzı kanseri riskinin cinsel aktiviteden etkilendiğini açıkça göstermektedir [33].

HPV enfeksiyonlarının yaklaşık %90' ının enfeksiyondan sonraki 2 yıl içinde bağışıklık sistemi tarafından temizlendiği ve kadınların yalnızca yaklaşık %10'unda devam ettiği ve kanser oluşumunun başladığı belgelenmektedir [22]. Daha spesifik olarak, yüksek riskli HPV ile enfekte olmuş hücreler daha hızlı çoğalır ve bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilmezse zamanla kanser öncesi değişiklikler ve tümörler geliştirebilir [34].

HPV yaşam döngüsü, enfekte olmuş epitel dokusunun terminal farklılaşma programı ile yakından bağlantılıdır ve üretken replikasyon farklılaşmış suprabazal hücrelerle sınırlıdır. Epitelin bazal tabakasındaki mitotik olarak aktif hücreler öldükçe, HPV geni düşük kopyalı bir bileşen (~100) olarak gelişir. Farklılaşmanın ardından, HPV ile enfekte olmuş hücreler hücre döngüsünde aktif kalır ve virüs, genom replikasyonu için S/G2 fazına yeniden girer [35].

Virüsler tipik olarak mukokutanöz epitelini enfekte eder, olgun epitel hücrelerinde virüs partikülleri üretir, kontrolsüz hücre bölünmesini teşvik eder ve normal hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına ve genetik hasarın birikmesine neden olmaktadır [36].

Bugüne kadar, yüksek riskli olarak sınıflandırılan 100'den fazla farklı HPV tipi tanımlanmıştır. Yüksek riskli HPV, hemen hemen tüm servikal kanserlerde (>%99.7)

bulunur [37]. HPV tip 16 ve 18, Türkiye'de ve diğer birçok ülkede rahim ağzı kanseri ile ilişkili en yaygın yüksek riskli HPV tipleridir [24]. Servikal, vajinal ve anal kanserlerin yaklaşık %70'ine neden olur [38].

Genital HPV tipleri, rahim ağzı kanseri ve öncülleri ile ilişkilerine göre yüksek riskli (onkogenik) ve düşük riskli (onkogenik olmayan) HPV tipleri olarak ikiye ayrılabilir. Düşük riskli veya onkogenik olmayan HPV tipleri 6, 11, 42, 43 ve 44 tiplerini içerir; yüksek riskli veya onkogenik HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 'yi içerir [39].

HPV'nin tümör oluşumuna aracılık ettiği moleküler mekanizmalar aydınlatılmıştır. Doğal formunda HPV, dairesel çift sarmallı bir DNA epizomu olarak bulunur ve viral E2'nin ekspresyonu, E6 ve E7 onkogenlerinin transkripsiyonunu inhibe eder. E2 okuma çerçevesi, konakçı DNA'ya viral entegrasyondan sonra bozulur. Daha sonra sırasıyla E6 ve E7'nin varlığını yok eder ve tümör baskılayıcı proteinin ve retinoblastoma proteininin azalması veya yokluğuyla neoplastik transformasyona yol açar [40].

Yüksek riskli HPV viral onkogenleri, DNA onarımı, anjiyogenez ve/veya apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreci değiştirerek karsinojeneze yol açar [34].

2.4. E6 Geni

Kanseri yönlendiren spesifik gen havuzu, tümörün kökenine ve türüne bağlıdır. Bu nedenle, her bir kanser türü için gen hedeflerinin dikkatli bir şekilde seçilmesi, siRNA terapötik stratejileri için esastır. Kanserde mekanizma keşfi, siRNA tedavisi için genellikle geleneksel ilaçlarla hedeflenemeyen yenilikçi hedefler sağlar [41].

Tümör oluşumunu tetikleyen çeşitli genomik değişikliklerin saptanması için, son zamanlarda dizileme ve veri analizi gibi geliştirilen teknolojiler hazırlanmıştır. Bugüne kadar, çeşitli çalışmalarda, 55'i onkogenler ve 70'i tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılan, kanseri teşvik eden genlerle ilişkili yaklaşık 125 gen tanımlanmıştır [42].

Yüksek riskli insan papilloma virüsü (HPV) onkoproteinleri E6 ve E7'nin sürekli ekspresyonu, malign transformasyon ve malign fenotipin korunması için kritik öneme sahiptir. E6 ve E7 tarafından kodlanan onkoproteinler, hücre döngüsü

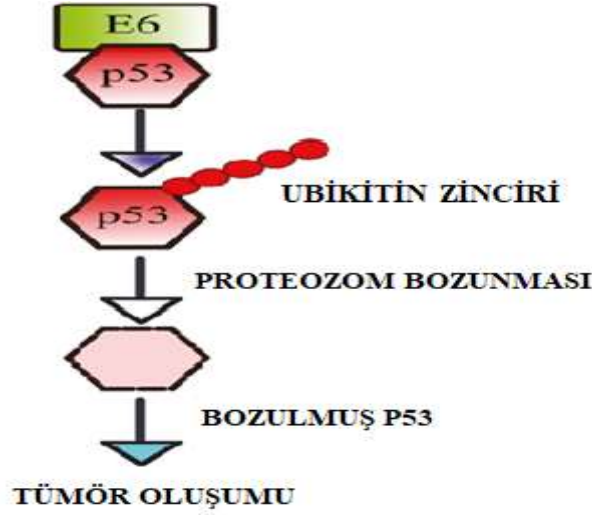
kontrolü için önemlidir. Bu onkogenler, insan rahim ağzı kanserine karşı gen susturma temelli moleküler tedaviler için potansiyel hedefler olabilir [43].

HPV-16'nın tümör oluşturma potansiyeli enfekte kadınlar arasında farklılık göstermektedir. E6'nın aminoasit dizisindeki değişikliklerin hastalığın gelişimi ve saldırganlığı için önemli bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür. HPV-16 E6 proteini 151 amino asitten oluşur ve yapısal olarak her biri iki çinko bağlayıcı alan içerir; bu alanlar virüsün onkogenik potansiyeli için hayati önem taşır. Ayrıca E6 dizisinin proteini, karboksil terminalinde bulunan bir PDZ sınıf I bağlayıcı motif barındırır. Viral proteinler genellikle bozunmalarını indüklemek için PDZ alanlarını hedef alırlar ve bu da viral döngüye fayda sağlayan hücrel süreçlerin bozulmasına neden olur [44].

Viral genomun konak genomuyla bütünleşmesinden sonra, HPV E6 ve E7 erken proteinleri viral genomun replikasyonundan sorumludur ve bunlar viral replikasyon süreci sırasında hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olabilir. HPV16 gen dizisi 6 erken açık okuma genlerinden (E1, E2, E4, E5, E6, E7), 2 geç okuma genlerinden (L1, L2) ve uzun bir kodlamayan kontrol bölgesinden oluşur. Bunlar arasında HPV16'nın birincil replikasyon genleri (E1, E2, E4, E5, E6, E7), replikasyonu ve patojeniteyi kontrol eden ana genlerdir. E1 geni, enfekte olmuş hücrelerde viral parçaların replikasyonu ve çoğaltılması için gerekli olan ATP'ye bağımlı bir DNA helikazıdır. E2 geni, DNA replikasyonunda ve transkripsiyon sonrası işleme ve paketlemede önemli bir rol oynar. E4 açık okuma geni E2'de bulunur ve E5, HPV16 virüsünün yaşam döngüsüne dahil olabilir. E6 ve E7, meme kanseri de dahil olmak üzere genital tümörlerin başlamasını tetikleyen birçok hücrel kontrol noktasından sorumludur. HPV E6 ve E7 viral onkoproteinleri, anjiyogenezi, kötü huylu çoğalmayı istilayı, sınırsız telomeraz aktivitesini, göçü ve ayrıca enfekte olmamış hücrelerin apoptozunu ve viral genom replikasyonu sırasında büyüme inhibitörü aktivitesini indükler [45].

E6 ve E7 proteinlerinin serviks kanserini tetiklemede farklı rolleri vardır ve bu proteinlerin iş birliği bu açıdan önemlidir [46]. E6 proteini p53 ve hücrel ubiquitin ligaz E6-AP'nin trimerik bir kompleksini oluşturarak, tümör baskılayıcı p53'ün bozulmasını destekler, böylece kanser hücresi ilerlemesini aktive eder (Şekil 2.2) [47]. E6, ubiquitin ligaz E6-AP ve pro-apoptotik Bcl2 proteini aracılığıyla p53 tümör baskılayıcısına bağlanır ve apoptozu önlemek için pro-kaspaz-8 aktivasyonunu

inhibe eder, böylece hücreleri kontrolsüz hücre bölünmesi yoluyla, önleyici kontrol noktalarından kaçmaya zorlar. E7, ubikitinasyon için pRb'yi hedef alır, E2F transkripsiyon faktörlerinin salınmasına yol açar ve hücreleri önceden S fazına girmeye zorlar, böylece hücrelerin G1-S zorunlu kontrol noktasını geçmesini ve sınırsız hücre çoğalmasına ulaşmasını sağlar [45].



Şekil 2.2. E6 geninin mekanizması [48]

2.5. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Yöntemler

Rahim ağzı kanseri tedavisinde kanserin evresi, boyutu, derinliği ve yayılımı önemlidir. Bu kriterler değerlendirildikten sonra cerrahi yöntem, radyasyon tedavisi, kemoterapi veya bu tedavilerin bir kombinasyonu kullanılmaktadır. Hastalığın erken evrelerinde cerrahi veya radyasyon tedavisi, kemoterapi ile birlikte kullanılır, ancak ileri evrelerde kemoterapi ile beraber radyasyon tedavisi veya tek başına kemoterapi kullanılmaktadır [49].

Mevcut ana kanser tedavisi yöntemleri; cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi, lazer tedavisidir [50]. Tedavi için hangi yöntemin kullanılacağı tümörün konumuna, histopatolojik tipine, evresine ve derecesine, hastanın durumuna ve birçok faktöre bağlıdır [51].

2.5.1. Cerrahi

Kanserli bölgeleri çıkarmak için cerrahi yöntemler uygulanır. Tüm kanser türleri için cerrahi yöntemler uygulanamaz ve bu yöntem organ kaybına ve kanserin tekrarlama riskine neden olabilir [52]. Cerrahi tedavi genellikle uzun süreli hastanede yatış

gerektirir ve tipik yapıların geri dönüşü olmayan işlev kaybına yol açarak yaşam kalitesinin düşmesine neden olabilir [51].

Erken evrede ve lokal olarak ilerlemiş kanser, potansiyel olarak iyileştirici yöntemlerle tedavi edilebilmektedir, ancak ameliyat sırasında rahim ağzının ve rahmin alınması hastanın hamile kalmasını imkansız hale getirir. Bu nedenle, serviks kanseri tedavisi gören kadınların gebelikle ilgili sorunları önlemek ve yaşam kalitesini iyileştirmek için yeni terapötik hedeflere ihtiyaç vardır. Ayrıca cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisi kısırlık ile ilişkilidir. Bu sorunu ele almak için alternatif tedavi yaklaşımları üzerine araştırmalar aktif olarak devam etmektedir [47].

2.5.2. Kemoterapi

Kemoterapide kullanılan ilaçlar kan dolaşımına katılarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurur ve onları yok eder fakat bu ilaçlar ayrıca vücuttaki normal hücreleri de etkileyebilir, sağlıklı doku dahil tüm vücutta, sağlıklı hücrelere de etki ederek ciddi yan etkilere neden olur [50,53].

Kemoterapide kullanılan ilaçlar genellikle sistemik olarak uygulanır ve sağlıklı doku dahil tüm vücutta, sağlıklı hücrelere de etki ederek ciddi yan etkilere neden olur. Kemoterapi ilaçlarının mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, saç dökülmesi, ağız yaraları, yorgunluk, gibi ciddi yan etkilerinin yanında vücutta enfeksiyonlar, nefes darlığı, trombositlerde azalma, kanama ve morluklarda artış, menstrual sorunlar, nöropati ve lösemi riskini artırma gibi yan etkileri de vardır [54]. Ayrıca bağışıklık sistemini zayıflatır ve hastayı diğer hastalıklara karşı daha duyarlı hale getirir. Ortaya çıkan bir diğer konu da kanser önleyici bileşenler için MDR (çoklu ilaç direnci) durumudur. Tüm bu önemli yan etkiler, kemoterapötik ilaçların dokuya özgü etkilerinin olmamasından kaynaklanmaktadır [55].

Bununla birlikte yüksek toksisite, düşük biyoyararlanım ve zayıf suda çözünürlük, düşük terapötik indeks, tutarsız dolaşım, spesifik olmayan biyolojik dağılım ve ilaçların kanser hücrelerine etki ederken aynı zamanda normal hücreler üzerindeki etkileri, geleneksel kanser tedavilerinin başlıca dezavantajlarıdır. Bu nedenle, yüksek mortalite ve morbidite oranlarını azaltmak için yeni zararsız ve etkili tedavilere ihtiyaç vardır [56].

2.5.3. Radyoterapi

Kanser radyoterapisi kanser hastalarının yarısından fazlasının tedavisinde yer almaktadır [57]. Radyasyon tedavisinde, kanseri tedavi etmek için x-ışınları, gama ışınları veya elektronlar gibi iyonlaştırıcı radyasyon kullanılmaktadır [50]. Kullanılan radyasyona iyonlaştırıcı radyasyon denir çünkü nüfuz ettikleri doku hücrelerinde enerji depolayan iyonlar (yükü parçacıklar) oluşturur. Bu depolanan enerji kanser hücrelerini öldürebilir veya kanser hücresi ölümüne yol açan genetik değişikliklere neden olabilir [58].

Radyoterapi genellikle ameliyattan önce verilir. Amaç, uygulama yoluyla tümörleri küçültmektir. Radyoterapide doku veya organların ışınlanmasından sonra tümör alanını küçültmek ve kanser hücrelerini öldürmek hedeflenmiştir. Radyoterapinin en önemli ve en büyük dezavantajlarından biri zararlı hücreleri yok ederken sağlıklı hücreleri de beraberinde yok etmesidir. Kusma, halsizlik, saç dökülmesi, iştahsızlık gibi yaygın yan etkiler hastanın yaşam kalitesini etkileyebilmektedir. Bu sebepten dolayı başka alternatif tedaviler düşünülebilir [59]. Ayrıca tedavi bittikten sonrada bazı yan etkiler devam edebilir. Radyasyon dozu yeterince yüksekse bazı hücreler kendilerini onaramayabilir. Sonuç olarak, radyasyona maruz kalmanın etkileri uzun süreli veya kalıcı olabilir [51].

Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinden olan kemoterapi ve radyoterapi, erkek hastalarda geçici, uzun süreli veya kalıcı gonadal toksisiteye, sperm sayılarının birkaç yıl sürebilen veya kalıcı olabilen azospermik seviyelere düşmesine neden olur. Bu sitotoksik tedaviler, hastaların kendi biyolojik yavrularına sahip olma yeteneklerini büyük ölçüde etkiler; bu özellikle üreme çağındaki kanser hastaları için endişe vericidir [53].

2.5.4. İmmünoterapi

Kanser tedavisi alanında büyük başarı elde eden olumlu yaklaşımlardan biri de immünoterapidir [42]. İmmünoterapi, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla savaşmak için kişinin bağışıklık sisteminin belirli kısımlarını kullanan bir tedavi yöntemidir [60]. Bazı immünoterapi türleri ayrıca biyolojik terapi veya biyoterapi olarak da adlandırılır [51]. Dr. William Coley, yaşanan ciddi bir bakteriyel enfeksiyondan sonra kanserin gerileyebileceğini gözlemlemiştir ve yirminci yüzyılın başında kanser immünoterapisinin ortaya çıkmasına katkı sağlamıştır [61].

Son yıllarda sitokin tedavisi, tümör aşılması, immün sistemi uyarıcı antikorlar ve diğer modaliteler dahil olmak üzere başka immünoterapötik yaklaşımlar geliştirilmiştir [62]. İmmünoterapi tedavileri, özellikle hastalıkları başka türlü tedavi edilemez olarak düşünülen hastalarda kanser tedavisinde devrim yaratmıştır [63].

Kanser hücreleri patojenlerden daha az immünojenik olsa da, bağışıklık sistemi açıkça tümör hücrelerini tanıma ve ortadan kaldırma kabiliyetine sahiptir [64]. 1970'lerde ve 1980'lerde, immünologlar kanser hastalarının serumlarını tümör bağlayıcı antikorlar için araştırdılar ve lektinler veya interlökin-2 (IL-2) tarafından aktive edilen lenfositlerin in vitro olarak tümör hücrelerini hedeflediğini keşfetmişlerdir [65]. Son on yıl boyunca yapılan araştırmalar, anormal kanser hücrelerine karşı güçlü anti-tümör bağışıklığını indüklemek için kanser aşılı, antikorlar ve bağışıklık uyarıcı adjuvanlar gibi bazı stratejilerin geliştirildiğini göstermiştir [66].

HPV tümörleri ile konakçı arasındaki bağışıklık sistemi etkileşimlerinin anlaşılmasındaki son gelişmeler ve bağışıklık kontrol noktalarını hedef alan yeni tedavilerin geliştirilmesi, rahim ağzı kanserinde immünoterapi kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. Hem lokal olarak ilerlemiş hem de metastatik rahim ağzı kanserinde immünoterapiyi tek bir ajan olarak veya kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon halinde değerlendiren birkaç faz II ve III denemesi halen devam etmektedir [67]. İmmünoterapiye dayalı tedavilerden kaynaklanan toksisite genellikle geçicidir ancak bazı durumlarda şiddetli ve ölümcül olabilir [68].

2.5.5. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (PDT), kanser tedavisi için umut verici yeni bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmıştır [69]. PDT, ışığa duyarlı hale getirci bir madde ve oksijen varlığında hedef hücrelerin ışık kaynaklı yok edilmesi yöntemiyle gerçekleşir. Hiperisinin ışığa bağımlı tümör öldürücü özellikleri, PDT'de bir ışığa duyarlaştırıcı olarak umut verici bir ajan olduğu vurgulanmaktadır [70]. Bu faktörler birleştiklerinde, oksijen varlığında tümör yıkımına neden olan sitotoksik ürünler üretirler [69].

PDT, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır ve akciğer kanseri, özofagus kanseri, melanom ve mesane kanseri dahil olmak üzere birçok malignitenin klinik tedavisinde kullanılmaktadır. PDT, lokalize tümörler için terapötik bir hedef

sağlayarak normal dokuyu korur. PDT, 800 nm'nin altında dalga boylarına sahip ışık kullandığından, dokuya daha az nüfuz eder ve genellikle cilt tümörlerini ve yüzeysel maligniteleri tedavi etmek için kullanılır [62]. PDT'nin cerrahi ve radyasyon tedavisine göre çeşitli potansiyel avantajları vardır. Nispeten non-invazivdir, hedeflenebilir ve tekrar tekrar uygulanabilir [71].

2.5.6. Hipertermi

Tümörden etkilenen dokunun sıcaklığını 40-43°C'ye çıkarmak için kullanılan bir teknik olan hipertermi, radyoterapi ve kemoterapi gibi çeşitli yerleşik kanser tedavilerine ek olarak kullanılır. Hipertermi, kolon kanseri, meme kanseri, cilt kanseri, baş ve boyun kanseri, özofagus kanseri, rahim ağzı kanseri, yumuşak doku kanseri veya beyin tümörü tedavisi için onaylanmıştır [72]. Isı şoku genlerinin ekspresyonuna, büyük ölçüde ısı ile indüklenebilir genlerin promotörlerindeki spesifik bağlanma bölgelerinin etkileşimi aracılık eder [73].

2.5.7. Gen Terapi

Gen tedavisi, terapötik bir etki yaratmak için genetik materyalin belirli hücelere verilmesi olarak tanımlanır [74]. Ek olarak, bu terapi doğru hücreler için işlevi yeniden düzenlemeyi, hedef hücrelerdeki mutasyona uğramış veya eksik genleri uygun kopyalarla değiştirmeyi ve ekspresyonlarını normal proteinlere yönlendirmeyi amaçlar. Başarılı gen tedavisinin anahtarı, güvenli ve etkili gen aktarımı sağlamaktır. Gen terapisi teorik olarak kusurlu genleri tamamlamak, istenen proteinleri ifade etmek veya terapötik tedavileri hedeflemek için genleri bölgeye özgü olarak geliştirme yeteneği olarak anlaşılır. Gen tedavisi, büyük bir terapötik potansiyele sahip olan ve yakın gelecekte pek çok hastalık türü için standart bir tedavi yöntemi olabilecek bir yaklaşımdır [75].

Gen tedavisinin gelişmesine rağmen, kansere bağlı ölümler önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir ve kanser tedavisinin etkinliğini artırmak için daha iyi genetik araçlara ihtiyaç duyulmaktadır [76]. Hastalar, tümörü yok etmek için gereken yüksek doz sitotoksik ajanlarla tedavi edildiğinde istenmeyen sistemik toksisiteye maruz kalmaktadır. Kanser hücrelerine ve tümör mikroçevresine antikanser ilaç dağıtımının seçiciliği, normal hücreleri ve dokuları korumak ve çeşitli doku ve organlarda kanser için etkili tedaviler sağlamak için büyük bir zorluktur [19]. Çıplak DNA molekülleri, büyüklükleri ve negatif yüklü fosfat grupları ve

hidrofiliklikleri nedeniyle hücelere verimli bir şekilde giremezler. Ayrıca, nükleaz aracılı bozulmaya karşı oldukça hassastırlar. Bu nedenle gen terapisindeki büyük bir zorluk, taşınan geni bozmadan hedef hücelere gen iletimini kolaylaştıran fiziksel yöntemler ve taşıyıcılar geliştirmektir [77].

2.6. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları

Nanoteknoloji, kansere karşı ilaçlarla yüklenebilen ve kanser fenotiplerini tanıyan kısımlar ekleyerek öncelikle kanser hücelerini hedef alan protein, lipid ve metal bazlı nanotaşıyıcılar geliştirmeyi mümkün kılmıştır [19]. İlaçların nanopartiküller içinde kapsüllenmesi, yüksek stabilite, artan ilaç yüklemesi, daha yüksek içselleştirme, uygun biyolojik dağılım ve gelişmiş farmakokinetik gibi birçok avantaj sunar [78].

siRNA bazlı terapötiklerin etkili potansiyelini gerçekleştirmedeki en büyük zorluklardan biri, güvenli ve etkili dağıtım yöntemlerine duyulan ihtiyaçtır. siRNA'lar kan dolaşımında kararsızdır, immünojenik olabilir ve hücelere girmek için zarları kolayca geçemez. Bu nedenle, siRNA'nın tedavi edilecek etki alanına yan etkiler olmadan iletilmesi için kimyasal modifikasyonlar ve/veya dağıtım malzemeleri gereklidir [79].

Nano ölçekli ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi gibi nanoteknoloji tedavileri, minimum yan etkilerle kanserli dokunun kesin tedavisini sağlama potansiyeline sahiptir. Nanomalzemeler biyolojik yapıları nedeniyle hücre bariyerlerini kolaylıkla geçebilirler ve aktif ve pasif hedeflemeleri nedeniyle de tümörlerin tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadırlar. Kanseri tedavi etmek için birçok ilaç kullanılmaktadır. Ancak ilaç duyarlılığı genellikle tatmin edici olmayan sonuçlara neden olmakta ve çeşitli yan etkilerin yanı sıra sağlıklı hücelere de zarar verebilmektedir. Yapılan çalışmalar lipozomlar, polimerler, moleküller ve antikorlar gibi farklı nanomalzeme formlarını incelemiş ve kanser ilacı tasarımında bu nanomalzemelerin kombinasyonunun, ilacın etkinliğini artırma ve toksisiteyi azaltma arasında bir denge sağlayabileceği sonucuna varmıştır [80].

2.7. Kanser Tedavisi İçin Moleküler Hedefleme

Kanser tedavisinin temel amacı; normal dokuyu etkilemeden kanser hücrelerini yok etmektir. Bu durum, kanser hücrelerinin doğru bir şekilde hedeflenmesi ile mümkündür. İdeal bir tümör hedefli nanomalzemenin özellikleri:

- (1) Pasif ve aktif hedefleme ile tümör içindeki ilaç lokalizasyonunu artırmak
- (2) Hassas, hedef olmayan dokularda ilaç lokalizasyonunu azaltmak
- (3) Hedefe geçiş sırasında ilaç akışını en aza indirmek
- (4) İlacın bozulmaya ve parçalanmaya karşı korunması
- (5) İlacın istenen süre boyunca hedef bölgede tutulması
- (6) Hücresel alımı ve hücre içi taşımayı kolaylaştırmak
- (7) Taşıyıcı tedavi edici ajanların biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olması şeklinde sıralanabilir [81].

2.8. Hücre İçine Taşımada Kullanılan Vektörler

Kanser hücrelerinin sentetik ilaçlara karşı direnci büyük bir endişe kaynağıdır [76]. İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan nanopartiküller polimerler (polimerik nanopartiküller, miseller veya dendrimerler), lipitler (lipozomlar), virüsler, karbon bazlı nano yapılar dahil olmak üzere çeşitli malzemelerden yapılabilen sistemlerdir [82] (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Nanopartikül yapıları [83]

İlaç taşıyıcılarının işlevini tam olarak gerçekleştirilmesi için, polimerlerin iyi karakterize edilmesi, büyük miktarlarda tekrarlanabilir şekilde sentezlenmesi ve

linik kullanım için kabul edilebilir saflıkta olması gerekir. Ayrıca, spesifik ilaçla konjugasyon veya birleşme için gerekli olan uygun fonksiyonel grupları da içermelidir. En önemlisi, biyouyumlu, immünojenik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerden yapılmış olmaları gerekir. Ayrıca dolaşımda stabil kalmalı ve kemoterapötik yüklerini intratümöral veya hücre içi iletebilmelidirler [84].

2.8.1. Viral Vektörler

Viral vektörler, spesifik hücre tiplerini veya dokuları modifiye etmek için en etkili gen dağıtım yoludur ve terapötik genleri ifade edecek şekilde tasarlanabilir. Geçici veya kalıcı transgenlerin ifadesini sağlamak için genleri hücrelere iletmede kullanılmak üzere çeşitli virüs türleri araştırılmaktadır [85].

Retrovirüsler, lentivirüsler, adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler ve herpes simpleks virüsleri gibi rekombinant virüsler, gen transferi için yaygın olarak kullanılan vektörlerdir. Virüsler, uygun hücre alımı ve hücre içi hareket mekanizmaları sayesinde etkili gen aktarımına aracılık ederler. Bununla birlikte viral vektörler, üretim zorlukları, akut enflamatuvar reaksiyonlar nedeniyle tekrarlanan uygulamalar için sınırlı olması ve gecikmiş hümorale veya hücresele bağışıklık tepkileri gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir [77].

2.8.2. Viral Olmayan Vektörler

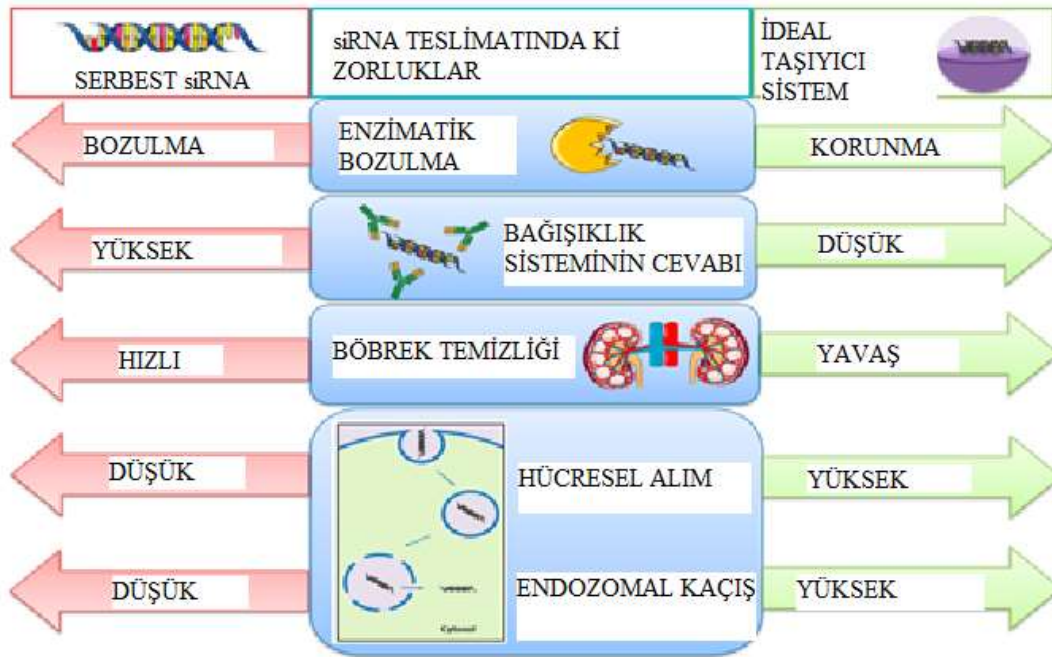
Viral vektörlerde yaygın olarak görülen immünojenisite veya insersiyon mutasyonu komplikasyonları olmaksızın eksojen genlerin hedef hücrelere taşınmasını kolaylaştıran viral olmayan bir yaklaşım geliştirilmiştir [77]. Hidrodinamik enjeksiyon, katyonik lipozom kapsülleme, katyonik polimer kompleks oluşumu ve antikora özgü hedefleme dağıtım sistemleri dahil olmak üzere siRNA'yı in vivo iletmek için çok sayıda viral olmayan dağıtım yöntemi kullanılmaktadır [86].

Tedavide RNAi'nin başarılı uygulamaları, hedef transkriptlerin etkin bir şekilde yıkılmasına ve önceden oluşturulmuş siRNA'nın veya vektörle ifade edilen siRNA'nın etkin hücre içi dağıtımına bağlıdır [87]. Bu nedenle siRNA'lar, hedef hücrelere in vitro veya in vivo teslim için viral ve viral olmayan vektörler gibi taşıyıcılar içinde kapsüllemelidir. Bunlar arasında viral olmayan vektörler, viral vektörlere göre daha az toksisite, daha kolay sentez ve daha düşük bağışıklık tepkisi

avantajlarına sahiptir [88]. Viral olmayan yaklaşımların diğer pratik avantajları, üretim kolaylığı ve yeniden uygulama potansiyeline sahip olmasıdır [77]. Viral olmayan araçlar lipozomlar, katyonik polimerler ve doğal polimerlerdir. Bu dağıtım araçları büyük ölçüde hücreler tarafından alınır ve kanda kolayca bozulmazlar [89].

Çıplak siRNA'nın insan plazmasında bir saatten daha kısa bir yarı ömrü vardır, bu nedenle dolaşımdaki siRNA, enfekte hedef dokulara ulaşmadan önce böbrekler yoluyla hızla temizlenmektedir. Başarılı bir gen susturma ise, siRNA'nın hedef hücrenin sitoplazmasına ulaşmasını gerektirir, ancak verimli iletimi sağlamak için siRNA'nın sağlam kalması gerekmektedir [87].

Gen aktarımı için kullanılan başlıca viral olmayan vektör türleri olan katyonik lipozomlar ve polimerik parçacıkların siRNA aktarımı için uygun olduğu gösterilmektedir (Şekil 2.4) [88].



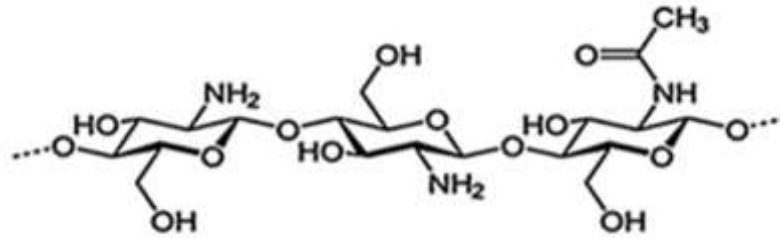
Şekil 2.4. İn vivo siRNA iletimi ile ilgili zorluklar ve serbest siRNA iletimi problemlerinin üstesinden gelmek için nano taşıyıcıların kullanılmasıyla sağlanan çözümler [12]

2.9. Kitosan

Kitosan, böceklerin, yengeç ve karides gibi kabukluların dış iskeletinin bir bileşeni olan kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen rastgele dağılmış (1 → 4) bağlı D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir amino-

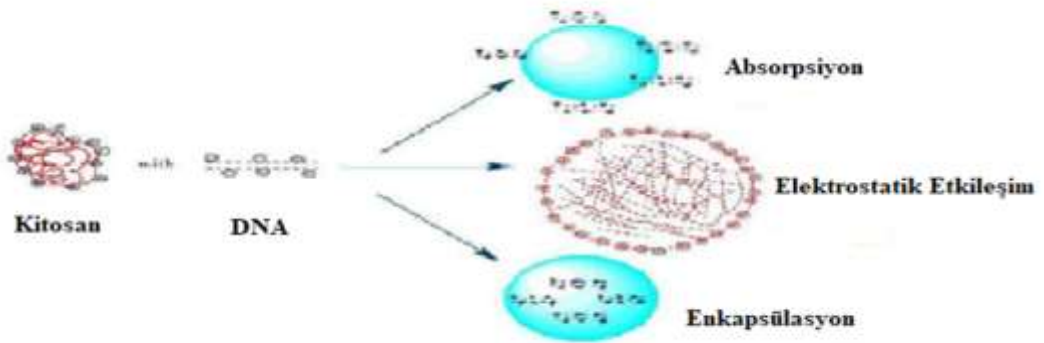
polisakkarittir (poli-1,4-D-glikozamin) ve doğada bulunan en bol polisakkaritlerden biridir (Şekil 2.5) [90,91]. Ayrıca reaktif fonksiyonel gruplara sahip bir polielektrolittir [92].

Eşsiz fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı kitosan, güvenli ve etkili ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için sürekli bir ivme sağlamaktadır. Ayrıca farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için oldukça önemli bir polisakkarittir. Kitosanın omurgasında bulunan birincil hidroksil ve amin grupları, kimyasal modifikasyona ve fiziksel özelliklerinin kontrolüne izin vermektedir [18,93].



Şekil 2.5. Kitosanın kimyasal yapısı [94]

siRNA'lar, negatif yükleri nedeniyle hücre zarlarını kolayca geçemedikleri için, siRNA ile optimal kompleks oluşumu elde etmek için kitosan tabanlı gen taşıyıcıları yükü nötralize ederler ve sertlik, hidrofobiklik/hidrofiliklik, yük yoğunluğu, biyolojik olarak bozunabilirlik ve moleküler ağırlık açısından da oldukça verimlidirler. Bu nedenle, kitosan veya kitosan bazlı gen dağıtım taşıyıcıları, diğer katyonik lipid bazlı taşıyıcılara göre sistemik dağıtım için benzersiz avantajlara sahiptir (Şekil 2.6) [87].

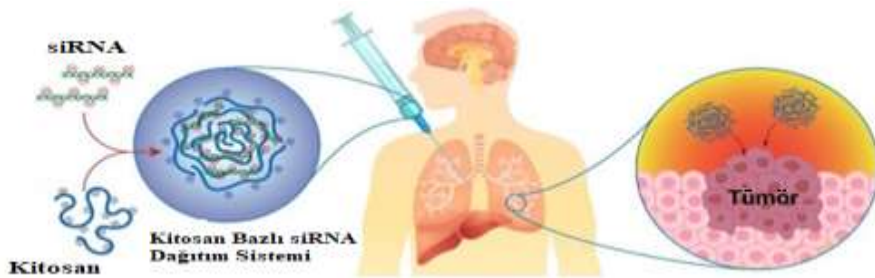


Şekil 2.6. Farklı yöntemler kullanarak kitosan bazlı DNA/siRNA nanoparçacıklarının sentezi [95]

Hedeflenen dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için kitosan ve türevleri, biyouyumluluk, biyobozunurluk, düşük toksisite ve diğer benzersiz biyolojik özellikler gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Kitosandaki aktif fonksiyonel grupların varlığı, kimyasal modifikasyon için mükemmel fırsatlar sağlar ve benzersiz özelliklere sahip çok çeşitli türevler sunar. Genel olarak, kitosan ve türevlerinin, hedeflenen dağıtım gerektiren küçük molekülü ilaçlar için faydalı taşıyıcılar olduğu açıktır [93]. Kitosanın anti-tümör etkisi, kitooligosakkaritlerin moleküler ağırlığı ve D-glikozaminin serbest amino grupları tarafından sağlanan aşırı katyonik karakterden kaynaklanmaktadır [96].

siRNA'lar muhtemelen hücreler tarafından endositoz yoluyla alınır ve siRNA sitoplazmik bölmeye verimli bir şekilde iletilmediği sürece RNAi'yi indükleyemez [86]. Katas ve Alpar [97], siRNA iletiminin, basit kompleks oluşturma veya adsorpsiyon yerine kitosan ile iyon jelseyonu yoluyla kompleksleştirildiğinde daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, iyon jelleştirme ile hazırlanan siRNA yüklü kitosan nanoparçacıklarının stabilitesi ve etkinliği, kullanılan çapraz bağlayıcıya büyük ölçüde bağlıdır. Abdul Ghafoor Raja ve arkadaşları [98], sodyum tripolifosfatın (TPP), daha yüksek siRNA bağlanma etkinliğine sahip kitosan nanotaşıyıcılar olan dekstran sülfat (DS) ve poli-D-glutamik asit (PGA) ile karşılaştırıldığında daha küçük boyutlu en kararlı sistem olduğunu bildirmektedir.

Kitosan nanoparçacıkları, kararlılığı artırmak ve siRNA ile anti-tümör ilaçların birlikte verilmesi için bir platform sağlamak üzere kimyasal olarak modifiye edilebilir. Preklinik çalışmalar, kitosan bazlı nanopartiküllerin siRNA iletimi potansiyeli ile tutarlıdır ve bu taşıyıcılar biyouyumlu ve güvenli olduğundan, kanser hastalarında kullanımları daha ileri çalışmalar ile değerlendirilmelidir (Şekil 2.7) [76].



Şekil 2.7. Kitosan ve siRNA'nın hücelere transferi [76]

Kitosanın pozitif yükleri, pH 6'nın altında protonlanan birincil amino gruplarına dayanmaktadır. Bu özellik polimerin, tümörlü hücre ortamı gibi zayıf asidik koşullarda kullanımı için yararlı olmasını sağlamaktadır [99].

2.10. RNA İnterferans (RNAi) Teknolojileri

RNA interferansı (RNAi), çift sarmallı RNA heliksleri tarafından tetiklenen güçlü ve oldukça spesifik bir gen susturma yöntemidir. RNAi, siRNA adı verilen 21-23 baz çiftinden oluşan küçük enterferans yapan RNA'ların eklenmesinin homolog mRNA'ların bozunmasına ve spesifik proteinlerin bozunmasına neden olduğu hücre içi bir süreçtir [87]. İlk olarak Andrew Fire ve Craig Mello tarafından nematod *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir [100]. Keşfedildiği günden bu yana RNA interferansı (RNAi), *C. elegans* araştırmaları ve genel olarak bilim camiası için önemli bir araç haline gelmiştir. RNAi, *C. elegans*'taki genlerin işlev kaybı ve fenotiplerini belirlemek için güçlü, özgül, hızlı, basit bir yöntemdir ve çeşitli genom çapında taramaların temeli olmuştur. dsRNA'lar solucanlara doğrudan enjeksiyonla, dsRNA ifade eden bakterilerle beslenerek veya solucanlar bir dsRNA çözeltisine batırılarak sokulabilir. Kılcal bir iğne kullanılarak, dsRNA solucanın vücudunun herhangi bir yerine mikroenjekte edilebilir ve RNAi, germ hattı da dahil olmak üzere enjekte edilen hayvanın her yerine ve bir sonraki nesle sistemik olarak yayılır. Ancak, memeli sistemlerinde durum böyle değildir. RNAi, memeli hücrelerinde 21-23 baz çifti uzunluğunda sentetik çift sarmallı küçük müdahaleci RNA'ların (siRNA'lar) tanıtılmasıyla veya daha sonra hücrenel makine tarafından siRNA'lara işlenen çift sarmallı kısa saç tokası RNA'ları (shRNA'lar) ifade eden plazmid ve viral vektör sistemleri tarafından indüklenebilir [101,102].

RNAi'nin gen bazlı tedavi için kullanımı, özellikle viral enfeksiyonlar, kanser ve kalıtsal genetik hastalıklarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu nedenle, RNAi teknolojisi, oldukça spesifik dsRNA bazlı gen susturma terapötiklerinin geliştirilmesi için potansiyel olarak faydalı bir yöntemdir [103].

RNAi için kısa firkete RNA (shRNA), endojen mikroRNA (miRNA) ve küçük enterferans yapan RNA (siRNA) olmak üzere üç strateji vardır [104].

2.11. siRNA (Small Interfering RNA; Küçük Müdahaleci RNA)

Kimyasal olarak sentezlenmiş siRNA moleküllerinin, gen ekspresyonunun güçlü inhibitörleri olduğu gösterilmiştir ve proteinlerin fonksiyonel analizi ve proteomik bazlı hedef tanımlaması için yaygın olarak kullanılmaktadır [105].

siRNA'nın spesifik mekanizması, potansiyel bir kanser tedavisi olarak önemli derecede avantajlara sahiptir. İlk olarak yüksek derecede güvenli olmasıdır; siRNA'lar gen ekspresyonunun translasyon sonrası aşamasında hareket ettikleri için DNA ile etkileşime girmezler ve mutasyonları önlerler. siRNA'ların ikinci bir avantajı da yüksek verimlilikleridir. Tek kanser hücrelerinde, sadece birkaç siRNA kopyası, gen ekspresyonunun dramatik şekilde baskılanmasına neden olabilir. Diğer küçük moleküllü ilaçlara ve antikör bazlı ilaçlara kıyasla siRNA'nın diğer önemli bir avantajı ise, tamamlayıcı baz eşleştirme ilkesiyle belirlenen sınırsız hedef seçimi ve özgüllüğüdür. Bu strateji aynı zamanda moleküler biyoloji ve tüm genom dizilemesindeki hızlı gelişmelerden de yararlanır. İnsan genomu veri tabanı, cDNA veri tabanı ve hastalık geni veri tabanı gibi dizi veri tabanları da oluşturulmuştur ve kapsamlı nükleotid siRNA ilaç geliştirmesi için sağlam bir temel sağlar. siRNA ilaçlarının temel stratejisi, kanseri teşvik eden spesifik genleri rasyonel olarak tasarlanmış siRNA'larla susturarak kanseri tedavi etmektir [104].

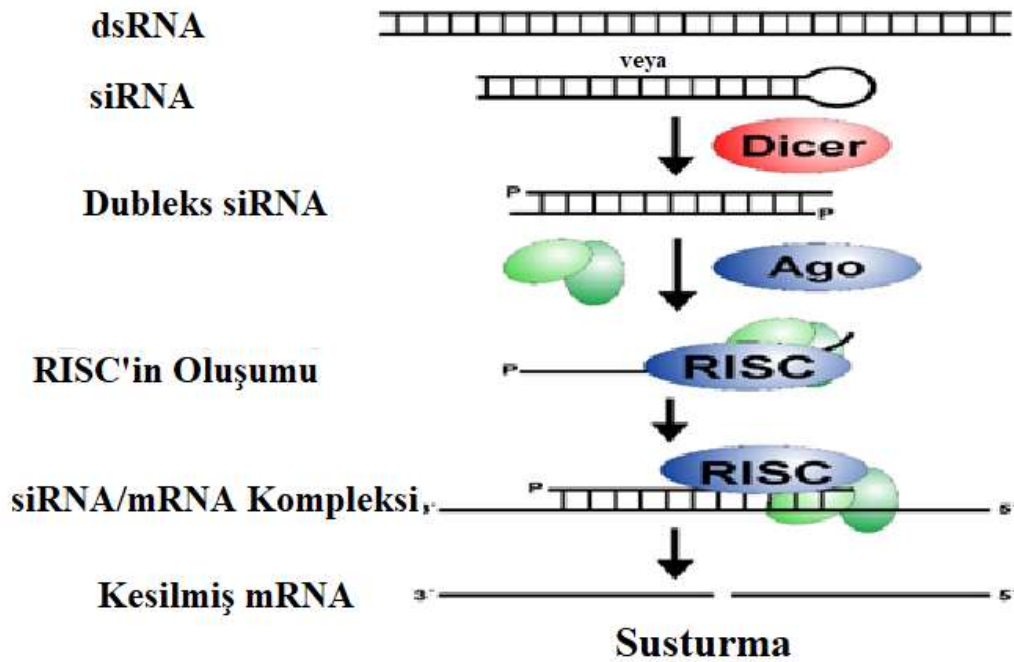
Kanserli hücrelere uygulanan gen terapisi bağlamında, siRNA, hücreler içindeki lokalizasyonuna bakılmaksızın, neredeyse her bir ilgili proteininin ifadesini engelleyebilen bir işlev kaybı stratejisi olarak hareket eder. Bugüne kadar hücre döngüsü, apoptoz, proliferasyon ve anjiyogenez yollarına dayalı kanser patolojilerinde viral olmayan iletim sistemlerine yerleştirilen siRNA'lar tarafından çok sayıda protein hedeflenmiştir. Ayrıca, DNA'ya entegre olmama özelliği sayesinde siRNA'lar, düzenleme ve güvenlik hususları için önemli bir parametre olan genomik değişikliklere yol açmazlar [106].

siRNA'ların hedef tanımlama ve doğrulamada spesifik gen susturma etkisi ayrıca ilaç keşfi ve geliştirilmesinde kullanılır. siRNA'lar kanser tedavisi için umut vaat eden yeni ilaç adaylarıdır. Kanserde aşırı eksprese edilen genlerin siRNA tarafından susturulması önemli bir terapötik yaklaşımdır. Diğer tedavi yöntemleriyle karşılaştırıldığında siRNA tedavisinin potansiyel avantajları şunlardır: 1) diziye özgü gen tedavisi sağlar ve birçok ilacın etkili olmadığı genleri hedefleyebilir; gen

susturulmasını sağlayabilir, 2) siRNA güvenli bir terapötik ajandır. 3) siRNA, yüksek gen susturma aktivitesine sahip oldukça aktif bir moleküldür, 4) herhangi bir hastalık genini hedeflemek üzere kolayca tasarlanabilir [107].

2.12. siRNA Mekanizması

Hem hayvanlarda hem de bitkilerde, uzun dsRNA, Dicer benzeri enzimler tarafından çift sarmallı siRNA'lara işlenir. Dicer enzimleri, uzun dsRNA'ların uçlarını tanıyan ve RNA'yı uçtan yaklaşık 21 nükleotid uzaklıkta kesen RNase III enzim ailesine aittir. Dicer, RNA kaynaklı gen susturma girişimini başlatır. Katalitik bileşen olan argonaut proteini ise siRNA dizisine karşılık gelen diziyi içeren haberci RNA'yı (mRNA) parçalayabilen ve endonükleaz olan RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) oluşumunu sağlar. (Şekil 2.8) [108].



Şekil 2.8. siRNA mekanizması [108]

2.13. Apoptoz ve Nekroz

Genel olarak hücre ölümü veya hücre canlılığının kaybı, onarılamaz yapısal hasarla birlikte hayati hücresel işlevlerin geri döndürülemez şekilde bozulması olarak tanımlanabilir. Hücre ölümü; hipoksi, belirli ilaçlara ve kimyasallara maruz kalma, bağışıklık reaksiyonları, enfeksiyöz ajanlar, yüksek sıcaklık, radyasyon ve çeşitli

hastalık durumları gibi çeşitli fizyolojik veya fizyolojik olmayan koşullar tarafından tetiklenebilir. Hücrelerin bu koşullara maruz kalması, apoptojenik (apoptozu indükleyen) veya nekrojenik (nekrozu indükleyen) olabilir [109].

Hücre ölümü biçimlerinden biri olan apoptoz; ilk kez 1963 yılında ipekböceklerinin metamorfozu sırasında Lockshin tarafından tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. 'Apo' ayrı, 'Ptosis' düşmek anlamına gelir ve programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilir [14]. Apoptoz, fizyolojik metabolizma da homeostazis ve hücrel dönüşüm için varsayılan hücre ölümü yoludur. Hücrenin hızlı küçülmesi, nükleer yoğunlaşma, DNA parçalanması, fosfatidilserine maruz kalma ve membran taşması olarak bilinen bir süreç gibi tipik morfolojik özelliklere neden olur. Fosfatidilserine maruz kalma, makrofajlara yönelik bir 'beni ye' sinyali olarak işlev görür. Daha da önemlisi, plazma zarı apoptotik olarak ölen hücrelerde sağlam kalır; bu, hücre içeriğinin, hücre dışı boşluğa salınmasını önleyen bir mekanizmadır. Bu nedenle apoptoz immünolojik olarak sessizdir [110]. Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, stres, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, genetik bozukluklar ve anormal derecede artan hücre içi kalsiyum (Ca) konsantrasyonu gibi çeşitli ölüm uyarıları tarafından tetiklenebilir [111].

Nekroz, geri döndürülemez hasarı izleyen dejeneratif bir olgu olarak tanımlanmaktadır [112]. Morfolojik olarak nekroz, hücre şişmesi, sitozolik vakuollerin oluşumu, gergin endoplazmik retikulum, şişmiş veya yırtılmış mitokondri, sitoplazmik kabarcıklar, yırtılmış lizozomlar ve sonunda hücre zarının bozulmasıyla ilişkilidir. Bu durumlar, sitoplazmik içeriklerin çevredeki alana salınmasıyla sonuçlanır ve inflamatuvar yanıtları tetikler [109].

2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Taq DNA polimeraz olarak bilinen *Thermus aquaticus*'tan izole edilen DNA polimeraz I enzimini kullanarak deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) dizilerinin kısa segmentlerini sentezlemek için kullanılan bir laboratuvar nükleik asit amplifikasyon tekniğidir. 1985'te, PCR, Mullis ve meslektaşları tarafından tanıtılmış ve bunun için Nobel ödülü almışlardır. DNA'nın amplifikasyon bileşenlerini inceleme ve tespit etme konusundaki derin yeteneği nedeniyle biyomoleküler bilimlerde kullanılan bir yöntemdir [113].

PCR programları tekrar eden aynı üç temel adımı içerir. Bunlar; DNA molekülünün çift sarmallarını ayırmak için ısıtma, primerlerin tamamlayıcı hedef dizilerine bağlanması ve numunenin DNA polimerazının yeni çift sarmallı molekülünü sentezlemesi için bağlanmanın biraz üzerinde bir sıcaklığa ısıtıldığı uzatma aşamalarıdır. Bu üç adım, tespit edilebilecek yeterli hedef DNA üretilene kadar tekrarlanır [114].

PCR'ın farklı amaçlar için tasarlanmış nested PCR, ters transkripsiyon PCR, multipleks PCR, real-time PCR ve kantitatif PCR gibi çok sayıda farklı tipleri geliştirilmiştir. PCR yöntemi, yeni nesil dizi analizi, DNA çip teknolojisi, ters hibridizasyon teknikleri, klonlama çalışmaları, lumineks teknolojisi, PCR-ELISA ve PCR-RFLP gibi temel moleküler tekniklerin bir parçası veya ön basamağı olarak da yaygın kullanım alanı bulmuştur [115].

2.15. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (Real-Time Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)

Başlangıçta, PCR teknolojisi nükleik asit kantifikasyonunun sınırlamaları nedeniyle nitel ve yarı nicel analizle sınırlıydı. O zamanlar, hedef genin başarılı bir şekilde çoğaltılıp çoğaltılmadığını doğrulamak için DNA ürünü agaroz jel elektroforezi yoluyla boyuta göre ayrılıyordu. dsDNA'ya bağlandığında floresan veren bir molekül olan etidyum bromür, ayrılmış bantların yoğunluğunu karşılaştırarak DNA miktarını tahmin etmek için kullanıldı ancak titiz nicel analiz için yeterince hassas değildi. Florofor geliştirme ve enstrümantasyondaki gelişmeler, artık yalnızca son ürün DNA'sının ölçülmesini gerektirmeyen cihazların gelişimine yol açtı. Gerçek zamanlı veya kantitatif PCR (qPCR) olarak bilinen bu işlem, amplifikasyon sırasında dsDNA'nın tespit edilmesine olanak tanıdı [116].

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), çeşitli kaynaklardan mRNA ekspresyonunu analiz etmek için tercih edilen bir tekniktir. Gerçek zamanlı RT-PCR oldukça hassastır ve nadir transkriptleri ve gen ifadesindeki küçük değişikliklerin belirlenmesinde kullanılır. Üstelik uygulaması kolay, gerekli doğruluğa sahip, güvenilir ve hızlı ölçüm sonuçları sağlamaktadır. Yeni sentezlenen PCR ürünlerini gerçek zamanlı PCR'de tespit etmenin en basit yöntemi, çift sarmallı DNA'ya spesifik olarak bağlanan floresan boya SYBR Green I'i kullanmaktır [117]. Bir başka

raportör molekül olarak kullanılan TaqMan probu ise hedef amplifikasyonu ile doğrudan seçilen bölgeye özel floresan etiketli problemlerin eklenmesidir [118]. TaqMan problemleri, spesifik tespit için RT-PCR analizinde floresan raporörler olarak yaygın şekilde kullanılır. Ancak problemin tasarımı zor ve pahalıdır. Bu nedenle SYBR Green tabanlı mutlak ve bağıl ölçümler daha çok tercih edilir [119]. Ayrıca sabit ekspresyon seviyelerine sahip dahili referans genlerinin seçimi, hedef gen ekspresyonunu doğru bir şekilde analiz etmenin önemli bir anahtarıdır [120].

Real-time PCR testlerinin yüksek duyarlılık ve özgüllük yeteneği, tekrarlanabilir ve kısa sürede sonuç vermeleri gibi avantajları vardır; bulaşıcı patojenlerin tanımlanması, suş tiplendirmesi, antimikrobiyal duyarlılık profilinin çıkarılması, toksin üretiminin tespiti, mRNA gen ekspresyon analizi ve spesifik genlerin ve alellerin tanımlanması gibi kullanım alanları ile dünya genelinde sık kullanılan güvenilir moleküler tanı testleri haline gelmiştir. İşlemlerin kapalı tüplerde gerçekleşmesi ve agaroz jel elektroforezi gibi amplifikasyon sonrası tespit işlemlerini gerektirmemesi gibi özellikler sayesinde kontaminasyon sorunu geleneksel PCR ile karşılaştırıldığında büyük oranda azaltılmıştır. Kantitatif real-time PCR günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında başta viral hepatit, sitomegalovirus ve birçok bulaşıcı hastalığın teşhis edilmesi ve tedavi etkinliğinin izlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [121]. Ayrıca RT-PCR genetik alanında; gen ekspresyon çalışmaları, genomik ve viral DNA kopya sayısı hesaplanması, allelik varyasyonların incelenmesi ve genlerin spesifik sıplays (splicing) varyantlarının ekspresyon analizleri gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır [122].

3. MATERYAL METOD

3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzemeler	Üretici
Kitosan	Fluka
TPP	Sigma Aldrich
Asetik asit	Reidl-de Haén, Almanya
Tris	Sigma, ABD
EDTA	Sigma, ABD
Hoechst 33342	Serva, İsrail
Propidium İyodide	Serva, İsrail
MTT	Biological Industries-İsrail

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

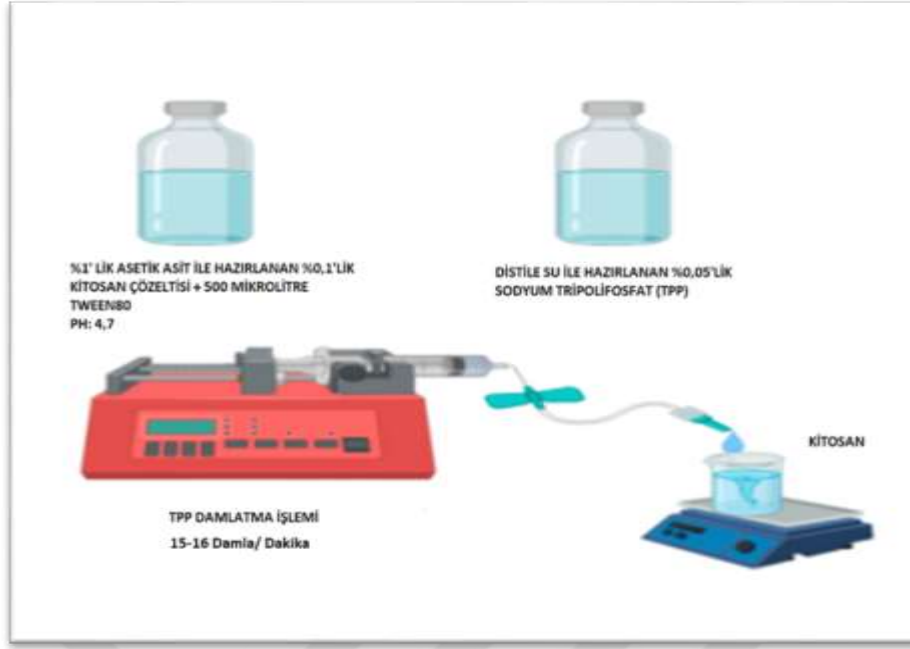
Cihazlar ve Malzemeler	Üretici
ZetaSizer	Malvern Nano-ZS
FTIR Spektrofotometre	Bruker Vertex 70 V
Spektrofotometre cihazı	Biotek
Manyetik karıştırıcı	Corning
Soğutmalı santrifüj	Hettich Almanya
Terazi	Mettler Toledo
pH metre	Mettler Toledo
Laminar akış kabin	Labor İldam, Türkiye

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan siRNA ve primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Sentezleyen Firma
E6-siRNA-sense	CGCGCTTTGAGGATCCAA	BİOLİGO
E6-siRNA-antisense	TATGGCATGCAGCATGGG	BİOLİGO
GAPDH-F	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	BİOLİGO
GAPDH-R	TTCACACCCATGACGAACAT	BİOLİGO

3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Üretimi

Kitosan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu yöntemde öncelikle, %0,1 (a/h)'lik kitosan, %1 (a/h)'lik asetik asit çözeltisi içinde çözdürülmüş, daha sonra çözünmüş kitosan çözeltisine 500 µL tween 80 eklenmiştir. Ardından 1 M NaOH çözeltisi ile pH'ı 4,7'ye ayarlanmıştır. 1 saat 750 rpmde 25 °C sıcaklıkta karıştırılmış ve 0,45 µm'lik filtre ile süzülmüştür. %0,05 (a/h) Tripolifosfat (TPP) distile su ile çözdürülmüş ve çözüldükten sonra 0,22 µm'lik filtre ile süzülmüştür. Manyetik karıştırıcı üzerinde 750 rpm de 25 °C sıcaklıkta karışmakta olan 15 mL süzülüş kitosan çözeltisine 12 mL süzülüş TPP çözeltisi peristaltik pompa ile 15 damla/dakika hızla damlatılmıştır. Damlatma işleminden sonra sabit karıştırma hızında 30 dakika daha karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 3 dakika sonikasyon yapılmıştır ve zeta ölçümü ve daha sonraki analizler için nanopartikülümüz hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.1) [123,124].



Şekil 3.1. Kitosan-tripolifosfat (TPP) nanopartiküllerinin sentezinin şematik gösterimi [123]

3.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

İyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmış olduğumuz kitosan nanopartiküllerinin ortalama tanecik boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli (Zetasizer Nano ZS cihazı, Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) ve Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrumları (Bruker, Vertex 70 V, Germany) Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KUBTUAM)'nde yapılmıştır.

3.3.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Boyut ve Yük Analizi

Hazır halde bulunan kitosan nanopartiküllerden 1 mL polistiren küvet içerisine konularak ölçüm yapılmıştır. Çözeltiden 633 nm dalga boyuna sahip kırmızı lazer ışığı geçirilmiştir. Numuneden geçen lazer ışınının saçtığı ışık, bir dedektör tarafından algılanır veriler analiz edilir. Ölçümler nanopartikül boyutunu, çapını, yüzey yükünün oranını ve PDI sonuçlarını belirlemek için kullanılmıştır.

3.3.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Kimyasal Yapısının Analizi

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin kimyasal yapısı Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR; Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (Bruker, Vertex 70 V, Germany) ile analiz edilmiştir.

3.3.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Geçirimli Elektron Mikroskop (High Contrast Transmission Electron Microscopy, CTEM, 120 kV, TecnaiTM G2 Spirit Biotwin, FEI) analizi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarına yaptırılmıştır. Böylece hazırlanan nanopartiküllerin geometrik, şekil ve boy dağılımları belirlenmiştir.

3.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Kitosan Nanopartiküllerinin siRNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin siRNA ile bağlanma yeteneklerinin belirlenebilmesi için agaroz jel elektrofrezisi yöntemi kullanılmıştır. Nanopartikül ve siRNA etkileşiminin saptanmasında kitosan nanopartikülün pozitif ve siRNA'nın negatif yükünden yararlanılarak hazırlanan kompleksin agaroz jeldeki etkileşimleri incelenmiştir.

Farklı oranlarda hazırlanan nanopartiküller ve siRNA'lar birleştirilmiş, siRNA'ların nanopartiküller ile bağlanması için yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra %1 (a/h) 'lik agaroz, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. Tampon içerisinde çözündürülen agaroz etidyum bromür ilave edilerek yatay agaroz jel tabağına dökülmüştür ve jelleşme için 30 dakika beklenmiştir. siRNA ve siRNA+nanopartikül kompleksleri bromofenol boyası ile birlikte karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Daha sonra örnekler agaroz jelde 90 V akımda 30 dakika yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.5. Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

siRNA'ların saflık derecesi ve enkapsülasyon verimliliği UV-spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Farklı siRNA konsantrasyonlarında (50, 100, 200, 400

nM) hazırlanan çözeltilerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür ve kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Enkapsülasyon verimliliği için 100 nM ve 200 nM derişimlerdeki her iki siRNA çözeltilerinden 40 µL alınarak 40 µL kitosan nanopartiküllerine ilave edilmiştir ve 30 sn vorteks işlemi yapılarak 30 dk inkübe edilmiştir. Çözeltilerimizde bulunan toplam siRNA konsantrasyonları 260 nm de ölçülmüştür. Daha sonra serbest siRNA ları tespit etmek için çözeltiler 10.000 rpm de 30 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Ardından süpernatantdaki serbest siRNA konsantrasyonu ölçülmüştür. UV spektrofotometre kullanılarak siRNA enkapsülasyon verimliliği şu şekilde hesaplanmıştır:

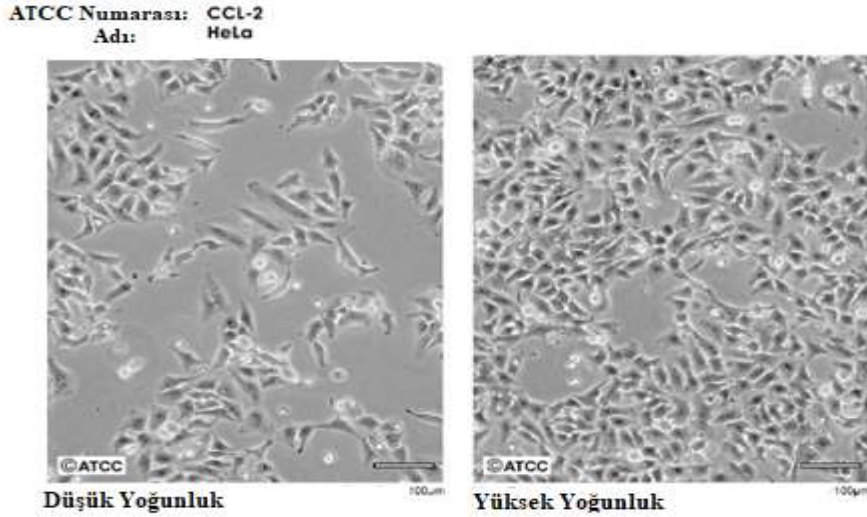
% Enkapsülasyon Verimliliği:

$$\frac{(\text{Toplam siRNA konsantrasyonu} - \text{Süpernatantdaki siRNA konsantrasyonu})}{\text{Toplam siRNA konsantrasyonu}} \times 100$$
 [125]

3.6. Hücre Kültürü Analizi

3.6.1. HeLa Hücre Hattı

Hücre kültürü mikrobiyoloji alanında özel bir öneme sahiptir. Günümüzde kanser araştırmalarında ve viroloji alanının da hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürü, virüslerin üretimi ve tanımlanmasının yanı sıra viral aşılardan imalatında da kullanılmaktadır. Hücre kültürleri özellikle 21. yüzyılda kanser ilaçlarının geliştirilmesinde araştırmaların hızlanmasıyla, büyük önem arz etmektedir. Kanser hücrelerinin ölümsüzlüğü ve üretilmelerinin kolaylığı, hücre kültürü gerektiren araştırmaları hızlandırmıştır [126]. HeLa hücre dizisi, 1951'de kanserden ölen Henrietta Lacks adlı bir hastadaki rahim ağzı kanserinden türetilmiştir [127]. Bu hücre dizisi in vitro olarak süresiz olarak çoğalabilen ilk insan hücre dizisidir ve bilim adamlarının bunu "ölümsüz" olarak tanımlamasına yol açmıştır. HeLa hücrelerinin tek biçimliliği ve dayanıklılığı, biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasına katkıda bulunmuştur. HeLa hücreleri, yaklaşık 70 yıldır öncelikle kanser araştırmaları ve yeni ilaç testleri için kullanılmaktadır (Şekil 3.2) [128].



Şekil 3.2. HeLa hücrelerinin mikroskop görüntüsü [129]

HeLa hücreleri, çocuk felci, kanser, Ebola virüsü, orak hücre anemisi ve sayısız diğer hastalıklarda Nobel Ödülü almaya hak kazanan tıbbi gelişmeler ve bilimsel araştırmalarda önemli bir rol oynamıştır [130].

3.6.2. Hücrelerin Hazırlanması

Sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki HeLa hücreleri çıkarılarak 37°C 'de çözdürülmüş ve steril laminar kabin içerisinde çözülen hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Çözülen HeLa hücrelerinin üzerine %10 FBS (h/h), %10 (h/h) RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), %1 (h/h) penisilin/streptomisin içeren besiyeri hazırlanarak ilave edilmiş ve 2000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek, santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır. Pellet 3 mL besiyeri ile süspansiyon edilip 25 cm²'lik flaslara aktarılmıştır. Flaskların kapağı hafif gevşetilerek ve 37 °C de %5 (h/h) CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur. Oluşabilecek kontaminasyonlara karşı her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandığında kültürler tripsinize edilerek ¼ pasaj yapılmış ve hücreler yeni flaslara aktarılmıştır.

Hücrelerin pasajlanması aşamasında ise; flask inkübatörden alınmış ve laminar kabinde, flask içerisinde bulunan besiyeri atılmış ve belli sayıya ulaşmış hücreleri kaldırmak için ilk olarak PBS ile yıkayıp sonrasında 1 mL tripsin-EDTA ilave edilmiştir. Daha sonra flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon

sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra flaska besiyeri eklenmiş ve hücreler falkon tüpe aktarılmıştır. Daha sonra 2000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Daha sonra 10 µL hücreden, 10 µL tripan blue boyasından alınarak ependorfa koyulup süspansiyon edilmiş ve karışımdan 10 µL alınarak hücre sayım lamına aktarılmış ve hücre sayım cihazına yerleştirilerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.7. Kitosan Nanopartiküllerinin, siRNA’nın ve siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Tetrazolyum halkasının aktif mitokondri tarafından parçalanarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) formazana dönüştürülmesi ve bunun sonucunda oluşan renk değişimi ile canlı hücre izlenimi verilmesi fikri 1983 yılında Mossman tarafından ortaya atılmıştır. Tetrazolyum, organik bir tuz grubu olarak tetrazol halkasında dört atomlu azot içeren heterosiklik bileşikler olarak bilinir. Suda çözünen sarı bir tetrazolyum boyası olan MTT, mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenir ve bu kristaller Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak analiz edilir [131]. MTT tahlili, güvenli, basit, uygun maliyetli olduğundan hücre çoğalmasımı ve sitotoksiteyi ölçmek için en çok tercih edilen kolorimetrik yöntemlerden biridir [132]. MTT mitojenlere, antijenik uyarılara ve büyüme faktörlerine karşı sitotoksik tepkileri belirlemek için devam eden testlerde önemli bir maddedir. MTT testi yalnızca hücre örnekleri için değil, aynı zamanda doku kültürlerini test etmek için de kullanılır. Cilt tahrişi, cilt aşınması ve göz tahrişi testlerinde kullanılır. Ayrıca MTT testlerinin olumlu yönleri arasında tek bir test mekanizması ile birden fazla numunenin incelenebilmesi ve sonucun hassas olması sayılabilir [133].

Çalışma kapsamında, sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin ve kitosan-siRNA partiküllerinin HeLa hücreleri üzerinde oluşturdukları sitotoksik etkinin değerlendirilmesi için MTT testi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle HeLa hücreleri

gerekli kültür çalışmaları yapılarak yeterli hücre sayısına ulaştıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki hücre vasatı atılmış, hücreler taze besiyeri ile seyreltilmiş ve son hacimde 200, 100, 50, 25, 12,5 µL olacak şekilde kitosan nanopartikül, nanopartikül-siRNA ve siRNA deney grupları 3 tekrar olacak şekilde kültür kaplarının kuyucuklarına uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklar içindeki vasatlar atılmış ve her kuyucuk başına 50 µL MTT solüsyonu (1 mg MTT, 1 mL fenol redsiz besiyeri içerisinde çözündürülmüş, 0,2 µm'lik milipor filtreden geçirilerek, +4 °C'de folyoya sarılarak ışık geçirmesi engellenecek şekilde saklanmıştır) eklenmiştir. Plaka folyoya sarılarak 2 saat etüvde bekletilmiş, 2 saatin sonunda MTT solüsyonu atılarak her kuyucuğa 100 µL izopropil alkol eklenmiş ve ELİSA okuyucu ile 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak besiyeri kullanılmıştır. Uygulanan parçacıkların sitotoksitesisi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = [\text{OD570 (örnek)}] / [\text{OD570 (kontrol)}] \times 100$$

3.8. Kitosan Nanopartiküllerinin, siRNA'nın ve siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Hücreleri Üzerinde İkili Boyama Metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında siRNA'nın, nanopartiküllerin ve nanopartikül-siRNA karışımının HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileşimleri ikili boyama yöntemi ile araştırılmıştır. HeLa hücreleri 20×10³ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 48 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Daha sonra kuyucuklara belirli dozlarda siRNA, kitosan nanopartikülü çözeltisi ve nanopartikül-siRNA karışımından eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak %20 (h/h)'lik DMSO, negatif kontrol olarak sadece besiyeri eklenmiş ve hücreler 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültür kaplarındaki hücrelerin besiyeri atılmıştır. Boyama işlemi için, hücrelerin üzerine PBS eklenerek hücreler yıkanmış ve apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için her kuyucuğa 70 µL ikili boyama solüsyonu (10 mL PBS içine, 100 µL propidyum iyodür, 100 µl ribonükleazA ve 500 µL Hoechst 33342 çözeltisi konulmuş ve ışığa maruz kalmaması için alüminyum folyo ile kaplanarak saklanmıştır) eklenmiştir. 48 kuyucuklu kültür kabı ışık

görmeyecek şekilde alüminyum folyoya sarılarak 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler floresan mikroskopunda (Leica DMI70, Almanya) DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin, FITC filtresi kullanılarak da nekroza uğramış hücrelerin değerlendirmeleri yapılmıştır. Değerlendirme floresan mikroskobu yardımı ile apoptotik indeks yüzde oranı (%) hesaplanarak ifade edilmiştir.

İkili boyama metodu ile hücre çekirdeği boyanmakta ve bu sayede apoptoz ve nekroz belirlenmektedir. Bu metot ile yapılan değerlendirmede apoptotik olmayan normal hücrelerin; çekirdekleri sönük mavi, DNA'ları dağılmamış şekilde gözlemlenmektedir. Boyama esnasında kullanılan Hoechst floresan boyası, hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamakta ve apoptoza uğramış hücreler diğer hücelere göre daha parlak ve çekirdek kısmı kaybolmuş ya da parçalanmış olarak gözlemlenmektedir. Bu sayede apoptotik hücrelerin normal hücrelerden ayrımı gerçekleştirilir. Nekroz işleminin belirlenmesi için kullanılan Propidyum iyodür (PI) boyası ise ikili boyamada kullanılan diğer bir boyadır. PI floresan boyası hücre zarını geçemeyecek büyüklüğe sahiptir bu nedenle canlı hücreleri boyayamamakta yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri kırmızıya boyayabilmektedir, böylece nekrozlu hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Nekroza uğrayan hücreleri değerlendirmek için hücelere floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekrozlu hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülmektedir [134].

3.9. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (Real-Time Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) Analizi

Çalışmanın bu kısmında E6 proteininin siRNA ile mRNA seviyesinde inhibe edilip edilmediğini göstermek amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır.

3.9.1. Hücrelerin Hazırlanan Kitosan Nanopartikül (NP)/siRNA Kompleksleri ile Muamelesi

HeLa hücreleri 12 kuyucuklu plaklara 2×10^5 hücre/mL konsantrasyonda ekilmiş ve hücreler 24 saat 37°C 'lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelerin vasatı atılmıştır. Daha sonra RT-PCR için kuyucuklara uygulanmak üzere hazırlanan örnekler (Nanopartikül (NP), NP+100 nM siRNA (E6), NP+200 nM siRNA(E6), 100 nM siRNA ve 200 nM siRNA) 200, 100, 50 ve 25 μL konsantrasyonlarında

kuyucuklara uygulanmış ve transfeksiyon amacıyla 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.9.2. RNA İzolasyonu İçin Hücrelerin Toplanması

İnkübasyondan sonra kuyucuklardan besiyeri atılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreleri kuyucuklardan kaldırmak için 120 µL %0,05 (a/h) konsantrasyonundaki tripsin ilave edilmiş ve etüvde bekletilmiştir. Tripsinin aktivitesini durdurmak için 250 µL besiyeri ilave edilmiş ve örnekler 1,5 mL'lik ependorf tüplere konularak 2000 rpm' de 4 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüş üzerine 1 mL PBS ilave edilerek ve pipetlenerek peletin çözünmesi sağlanmıştır. Örnekler kryo tüplere alınarak RNA izolasyonu yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.9.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılan izolasyon kitinin markası, adı ve katalog numarası Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. RNA izolasyonu için kullanılan izolasyon kitinin markası, adı ve katalog numarası

Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
GeneAll	RiboEx	301-001
GeneAll	Hybrid-R	305-101

RNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. RNA izolasyonu için öncelikle hücre örneklerine 0,5 mL RiboEx eklendi ve vortekslendi.
2. Numuneler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
3. Karışım 11.000 rpm'de, 10 dakika, 4 °C'de santrifüjlendi ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışıma 200 µL kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve 2 dk bekletildi.
5. 12000xg'de +4°C'de 15 dakika süreyle santrifüjleme işlemi yapıldı ve süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.

6. Süpernatant hacmi kadar RB1 tamponu eklendi ve pipetaj işlemi yapılarak karıştırıldı. Daha sonra karışımın 700 µl'si kolona aktarıldı.
7. 10.000×g'de 30 sn. santrifüjleme işlemi yapıldı. Toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
8. Karışım miktarının artması durumunda 6. ve 7. işlemler tekrarlandı.
9. Kolona 500 µl SW1 tamponu eklendi. Daha sonra 10.000×g'de 30 sn. santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
10. Kolona 500 µL RNW tamponu eklendi. Daha sonra 10.000×g'de 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
11. Kolondaki yıkama solüsyonlarını çıkarmak için 10.000×g'de 1 dakika boyunca santrifüjleme yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
12. Kolona 50 µl Rnase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
13. Daha sonra 1 dakika boyunca 10.000×g'de santrifüj işlemi ile elde edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.9.4. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için A.B.T marka cDNA Synthesis Kit (High Capacity, Katalog No: C03-01-05)'i kullanılmıştır. cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı bilgileri Çizelge 3.5'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı

Bileşen	Hacim
10X Reaksiyon Tamponu	2 µL
20X dNTP mix	1 µL
Random hexamer	2 µL
RTase	1 µL
RNase Inhibitor	0.5 µL
RNase'sız su	3.5 µL
Örnek	10 µL
Toplam	20 µL

cDNA sentezi için PCR karışımı hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	-

Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.9.5. Real-Time qPCR

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçilmiştir. Real-Time qPCR için A.B.T. SYBR Green Mastermix (Katalog NO: Q03-01-05) kullanılmıştır.

Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri

Primer Adı	Primer Dizisi	Sentezleyen Firma
E6-sense	CGCGCTTTGAGGATCCAA	BIOLİGO
E6-antisense	TATGGCATGCAGCATGGG	BIOLİGO
GAPDH-F	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	BIOLİGO
GAPDH-R	TTCACACCCATGACGAACAT	BIOLİGO

RT-PCR için kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. RT-PCR için kullanılan PCR karışımı.

RT-PCR Karışımı	Hacim
2X SYBR-Green RT-PCR Mix	10 µL
İleri Primer (10 µM)	1 µL
Geri Primer (10 µM)	1 µL
cDNA	4 µL
Nükleaz İçermeyen Su	4 µL
TOPLAM	20 µL

RT-PCR karışımı hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. RT-PCR qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında Çizelge 3.9’da belirtilen reaksiyon koşulları ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9. RT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları

RT-PCR Fazı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon Fazı	95	300 sn.	1
Denatürasyon Fazı	95	15 sn.	40
Bağlanma ve Uzama Fazı	60	60 sn.	

mRNA ekspresyon seviyesinin relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi” kullanılmıştır.

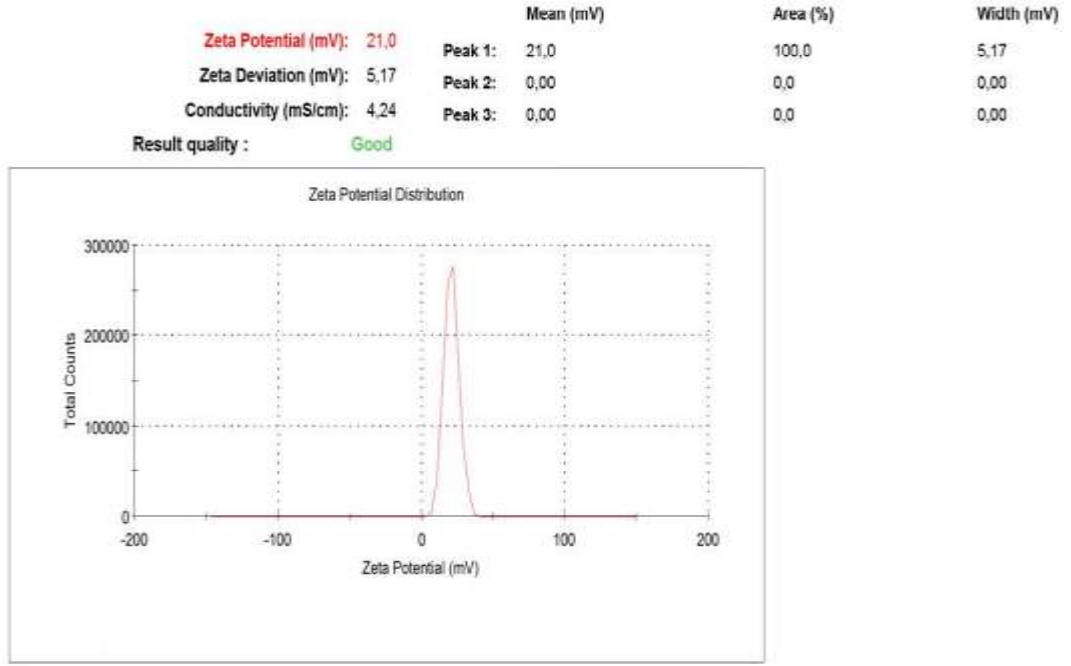
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

Çalışmada kullanılan kitosan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Bu yöntemde çapraz bağlayıcı madde olarak kullanılan TPP, elektrostatik kuvvetler yoluyla kitosanla etkileşime giren toksik olmayan bir polianyondur. Kitosanın protonlanmış amin grupları, iyonik çapraz bağlı ağlar oluşturmak için iyonik etkileşimler yoluyla TPP'deki negatif yüklü iyonlarla etkileşime girer [135]. Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin yüzey yükü, boyut dağılımı ve PDI değerleri analizi Zeta-Sizer cihazında yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de gösterilmektedir. Sonuç olarak iyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenen kitosan nanopartikülleri; 0,3 polidispersite indeksi (PDI), +21 mV zeta potansiyeli ve 178 nm ortalama hidrodinamik çap sergilemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre hedef dokulara etkili ve verimli bir şekilde siRNA iletimini sağlamak için nanopartikül boyutunun ideal boyutta ve pozitif yüzey yüküne sahip olduğu tespit edilmiştir.



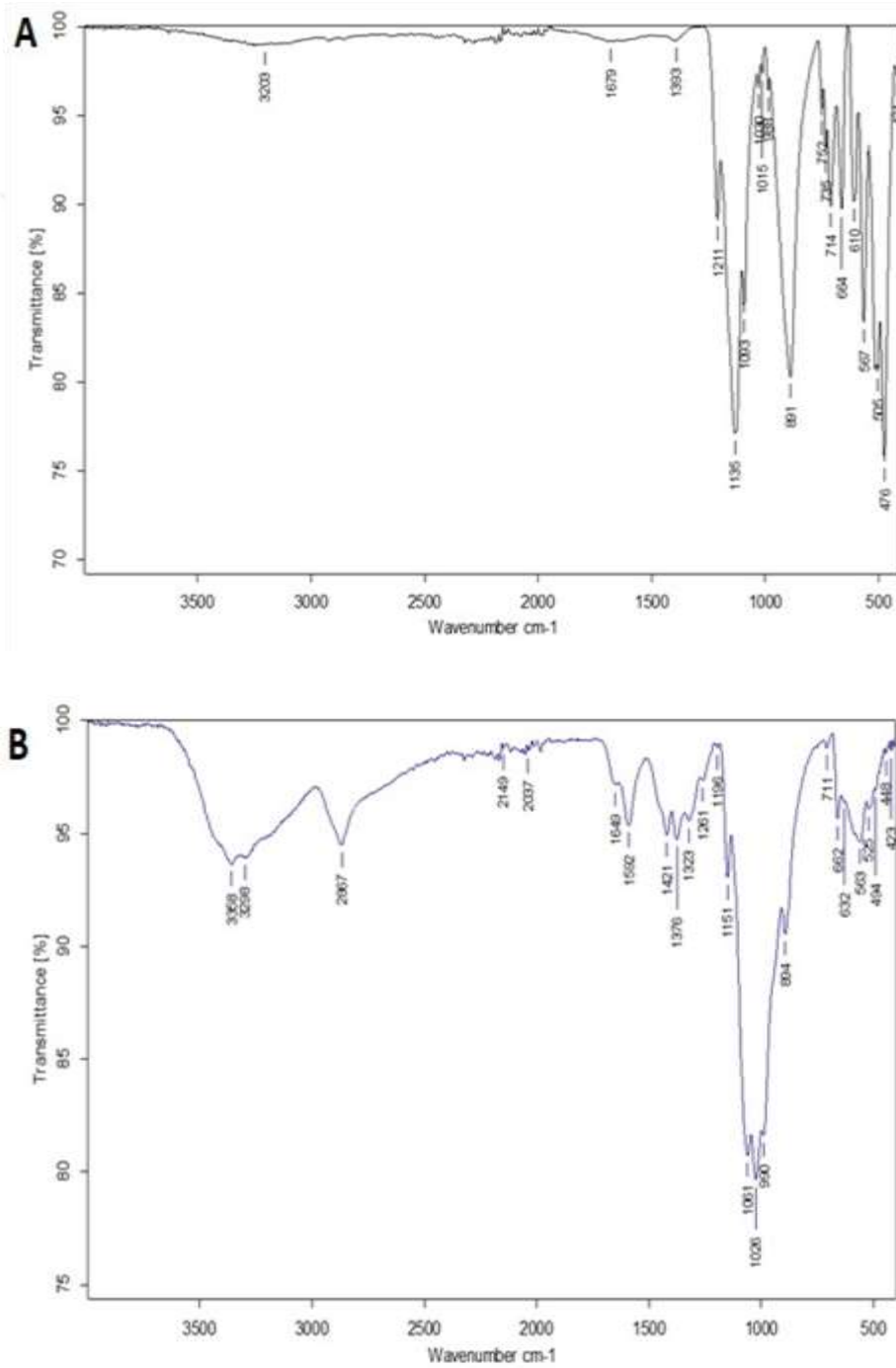
Şekil 4.1. Kitosan nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi

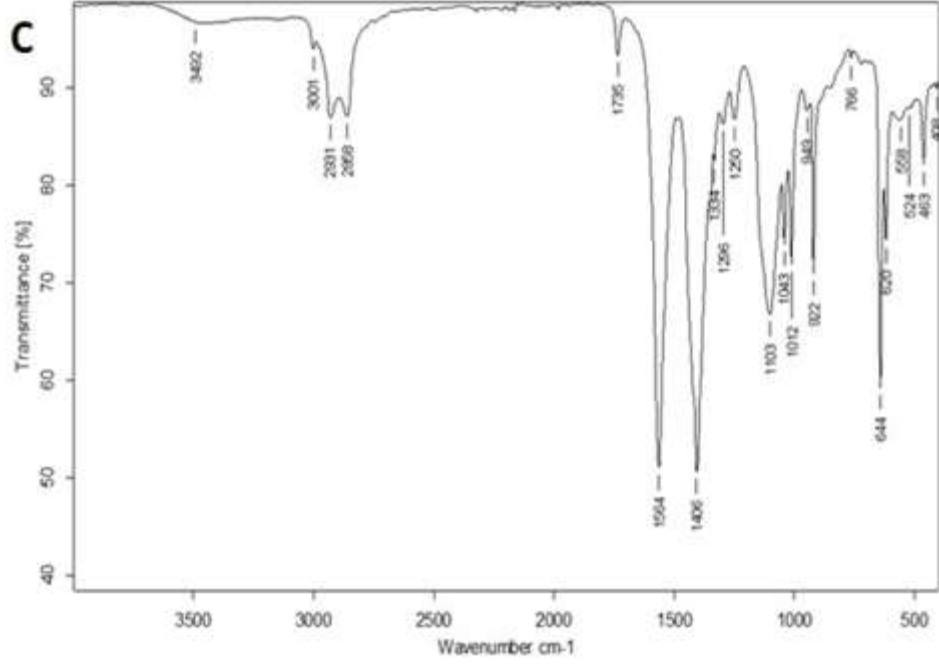


Şekil 4.2. Kitosan nanopartiküllerin boyut analizi

4.1.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Kimyasal Yapısının Belirlenmesi (FTIR Analizi)

Nanopartiküllerin kimyasal yapısının belirlenmesi için kullanılan FTIR analizi, bileşik karşılaştırması amacıyla numunenin moleküler bağ karakterizasyonunu ve fonksiyonel grup analizini belirlemek için kullanılır. Tez kapsamında yapılan FTIR analizinde; Kitosan, TPP ve Kitosan-TPP nanopartiküllerinin kimyasal yapılarına ait spektrumları analiz edilmiştir (Şekil 4.3).



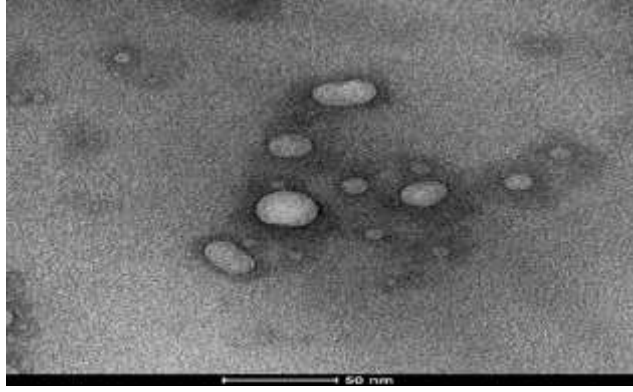


Şekil 4.3. (A) TPP molekülünün, (B) Kitosan molekülünün, (C) Kitosan-TPP nanopartiküllerinin FTIR spektrumları

Kitosan-TPP nanopartiküllerinde, 2868 cm^{-1} 'deki pik $-\text{CH}_2$ gerilme titreşimlerini, 1735 cm^{-1} 'deki pik $\text{C}=\text{O}$ gruplarının gerilme titreşimlerini göstermektedir. Kitosan molekülünde 1592 cm^{-1} 'deki pik, Kitosan/TPP nanopartikülünde amino gruplarının fosfat anyonu ile çapraz bağlandığını ispatlayarak 1564 cm^{-1} 'de yeni bir tepe olarak belirlemiştir ve bu pik $\text{C}=\text{C}$ bağının gerilme titreşimlerini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar benzer bir çalışmada verilen sonuçlarla tutarlı olacak şekilde analiz edilmiştir [136].

4.1.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi ile sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojilerinin pürüzsüz yüzeyli ve küresel formda olduğu gözlemlenmiştir. TEM analizi sonucunda nanopartiküllerin boyutlarının 50 nm den küçük olduğu görüntülenmiştir. Nanopartiküllerin 50 nm den küçük olması hücre içine alımında önemli bir rol oynayabilir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kitosan nanopartiküllerinin TEM görüntüleri

4.2. Agaroz Jel Elektroforezi ile Kitosan Nanopartiküllerinin siRNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanopartikül ve siRNA komplekslerinin %1'lik agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek, siRNA'nın nanopartiküllere bağlanıp bağlanmadığı UV ışığı altında incelenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Nanopartikül-siRNA agaroz jel görüntüsü

100 nM siRNA; **1)** Serbest siRNA, **2)** 8 μ L siRNA + 2 μ L NP, **3)** 6 μ L siRNA + 4 μ L NP, **4)** 4 μ L siRNA + 6 μ L NP, **5)** 5 μ L siRNA + 5 μ L NP.

200 nM siRNA; **6)** Serbest siRNA, **7)** 8 μ L siRNA + 2 μ L NP, **8)** 6 μ L siRNA + 4 μ L NP, **9)** 4 μ L siRNA + 6 μ L NP, **10)** 5 μ L siRNA + 5 μ L NP.

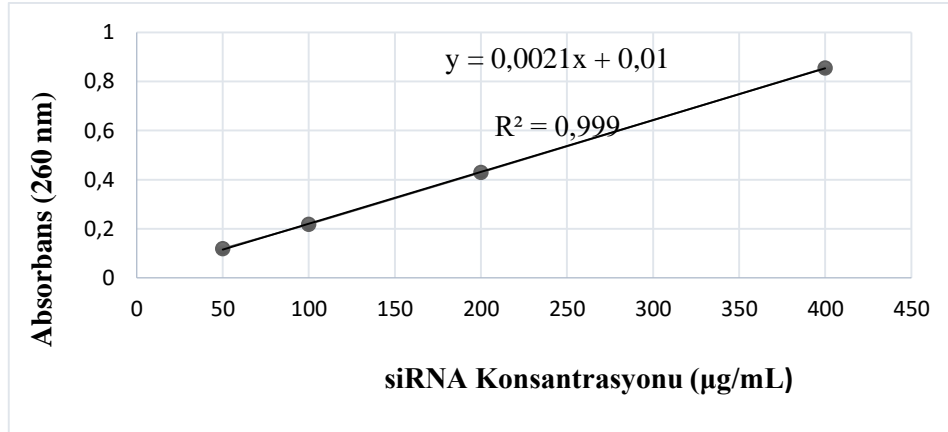
Agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen veriler incelendiğinde, 1. ve 6. örneklerde görünen en parlak bölgeler nanopartikül ile muamele edilmemiş çıplak siRNA'dır. Partikül/siRNA oranları değiştikçe parlaklığın da azaldığı görülmektedir. 5. ve 10. örneklerde (5µL siRNA/5 µL partikül) ise parlaklığın en az olduğu, dolayısıyla bağlanma veriminin arttığı gözlenmiştir ve bağlanma verimi en fazla olan oran olarak seçilmiştir.

4.3. Enkapsülasyon Verimi Sonuçları

Farklı seyreltme oranlarında hazırlanan siRNA'nın absorbans değerleri ve saflık derecesi spektrofotometrik yöntemle 260 nm ve 280 nm dalga boylarında tayin edilmiştir. Bu çalışmamızda 100 nM siRNA içeren nanopartikülün enkapsülasyon verimi %39,5 ve 200 nM siRNA içeren nanopartikülün enkapsülasyon verimi %45,5 olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan bir çalışma ile de benzer sonuçlar sergilemektedir. Aktürk ve Çağdaş [137], lazer ablasyonu ile sentezlenmiş levan kaplı altın nanoparçacıkların siRNA transfeksiyon ajanı olma potansiyeli üzerine yaptıkları bir çalışmada çöktürme yöntemi ile enkapsüllenen siRNA miktarının %48 civarında olduğunu tespit etmişlerdir. A260/A280 oranı ise RNA'nın saflığını göstermektedir. Saf RNA çözeltilerinin A260/A280 oranı 1,9-2,1 arasındadır [107]. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre siRNA'nın saf olduğu ispatlanmıştır. Farklı siRNA konsantrasyonlarında ölçülen 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri Çizelge 4.1'de ve konsantrasyon değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği ise Şekil 4.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı siRNA konsantrasyonlarında ölçülen 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri

siRNA konsantrasyonu (nM)	400 nM	200 nM	100 nM	50 nM
A260	0,855	0,433	0,218	0,119
A260/A280	2,02	1,99	1,92	2,12
Kitosan siRNA konsantrasyonu		0,61	0,369	
Serbest siRNA konsantrasyonu (Santrifüj Sonrası)		0,332	0,223	
% Enkapsülasyon oranı		45,5	39,5	



Şekil 4.6. Enkapsülasyon verimi kalibrasyon grafiği

4.4. MTT Test Sonuçları

Bu çalışmada kitosan nanopartikülü ile 100 nM ve 200 nM konsantrasyonlarındaki siRNA'nın etkileşimi sonucu farklı konsantrasyonlarında (12,5, 25, 50, 100 ve 200 µL) hazırlanan örneklerin HeLa hücreleri üzerinde ki sitotoksik etkileri MTT testiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen konjugatların farklı konsantrasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksosite sonuçları

Konsantrasyon (µL)	HeLa Hücre Hattındaki Canlı Hücre Yüzdesi (%)				
	Kitosan Nanopartikül	100 nM siRNA	200 nM siRNA	100 nM siRNA + Kitosan Nanopartikül	200 nM siRNA + Kitosan Nanopartikül
Kontrol	100±4	100±4	100±4	100±4	100±4
12,5	97,55±2	73,66±2	71,25±2	75,45±2	78,33±2
25	94,57±2	69,87±4	68,66±5	73,51±3	75,41±3
50	91,42±3	65,41±3	61,43±2	58,47±2	59,63±2
100	87,78±2	63,57±3	59,87±2	51,97±2	55,21±1
200	82,79±4	60,25±2	57,55±3	43,55±2	49,47±2

Elde edilen verilere göre, kitosan nanopartiküllerinin HeLa hücre hattında toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 200 µL) sırasıyla %87 ve %82 olan hücre canlılığı, düşük konsantrasyonlarda (12,5 µL) %97,5 hücre canlılığı göstermiştir.

HeLa hücre hattına uygulanan 100 nM ve 200 nM serbest siRNA'ların benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre hücre canlılığında belirgin bir azalış gözlenirken, düşük konsantrasyonlarda 100 nM siRNA (12,5 µL) %73,66 hücre canlılığı gösterirken, 200 nM siRNA (12,5 µL) %71,25 hücre canlılığı göstermiştir.

siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin sitotoksik etkisi incelendiğinde ise; yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrole göre %43,55-%55,21 hücre canlılığı sergilerken, konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığı artmıştır. 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin en düşük dozunda (12,5 µL) %75,45 hücre canlılığı gözlenirken, 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin en düşük dozunda %78,33 hücre canlılığı gözlenmiştir. Katas ve Alpar'ın [97] yaptığı bir çalışmada siRNA yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin çin hamster yumurtalık hücreleri ve insan embriyonik böbrek hücrelerindeki sitotoksikite aktivitesi değerlendirilmiştir. Sitotoksikite testleri sonuçları, kitosan nanopartikülleri ile tedavi edilen hücrelerin canlılığında önemli bir azalmanın gözlemlenmediğini, ancak siRNA yüklü nanopartiküller ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranında %18-40'luk bir azalma olduğunu göstermiştir.

4.5. Apoptoz-Nekroz İkili Boyama Sonuçları

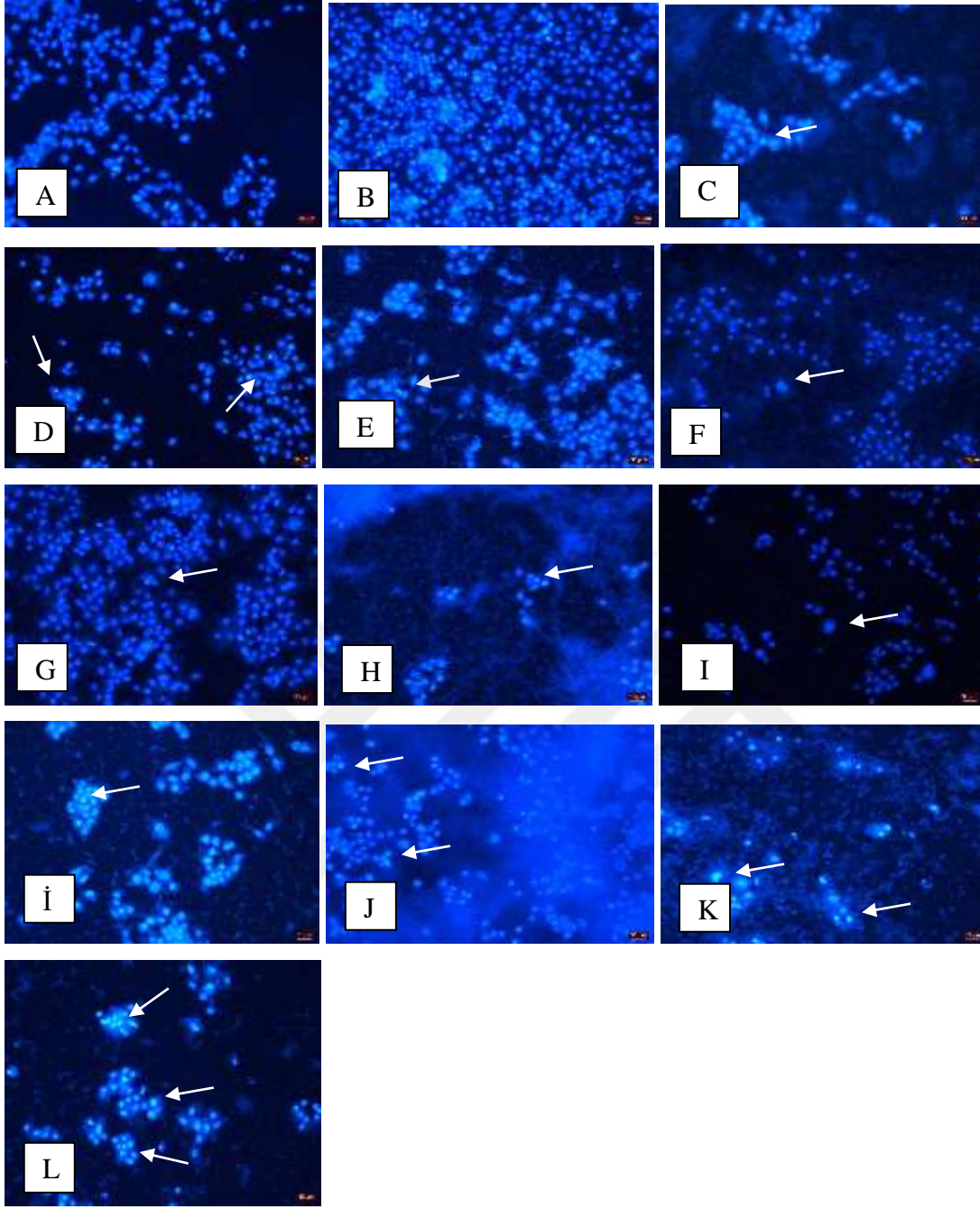
HeLa hücre hattında, kitosan nanopartikül, serbest E6-siRNA ve E6-siRNA yüklü kitosan nanopartikül formülasyonlarının apoptotik ve nekrotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla Hoechst 33342 ve propidyum iyodür boyalarının kullanıldığı ikili boyama testi yapılmış ve floresan mikroskopla incelenmiştir. Uygulama sonrası elde edilen % apoptoz ve nekroz indeksleri Çizelge 4.3 de verilmiştir. Ayrıca ikili boyama sonucu elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre fotoğrafları Şekil 4.7 ve 4.8 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Kitosan nanopartikül, 100 ve 200 nM E6-siRNA ve E6-siRNA yüklü nanopartiküllerin HeLa hücre kültürü ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen % apoptoz ve nekroz indeksleri.

Örnekler ve Konsantrasyonlar	%Apoptoz İndeksleri	%Nekroz İndeksleri
200 µL NP	2,7	0,96
100 µL NP	2,3	0,57
50 µL NP	1,8	0,28
25 µL NP	1,47	0,2
100 nM siRNA (200 µL)	12,6	10,11
100 nM siRNA (100 µL)	7,85	4,28
100 nM siRNA (50 µL)	5,66	6,58
100 nM siRNA (25 µL)	4,52	4,2
100 nM siRNA + NP (200 µL)	15,49	8,2
100 nM siRNA + NP (100 µL)	14,92	6,53
100 nM siRNA + NP (50 µL)	11,12	5,98
100 nM siRNA + NP (25 µL)	7,08	4,04
200 nM siRNA (200 µL)	38,9	3,3
200 nM siRNA (100 µL)	33,51	1,21
200 nM siRNA (50 µL)	29,42	2,94
200 nM siRNA (25 µL)	19,3	3, 17
200 nM siRNA + NP (200 µL)	15,08	17,56
200 nM siRNA + NP (100 µL)	13,61	15,55
200 nM siRNA + NP (50 µL)	54,3	14,02
200 nM siRNA + NP (25 µL)	56,84	3,69
Negatif Kontrol	0,5	0
Pozitif Kontrol	94,25	96,4

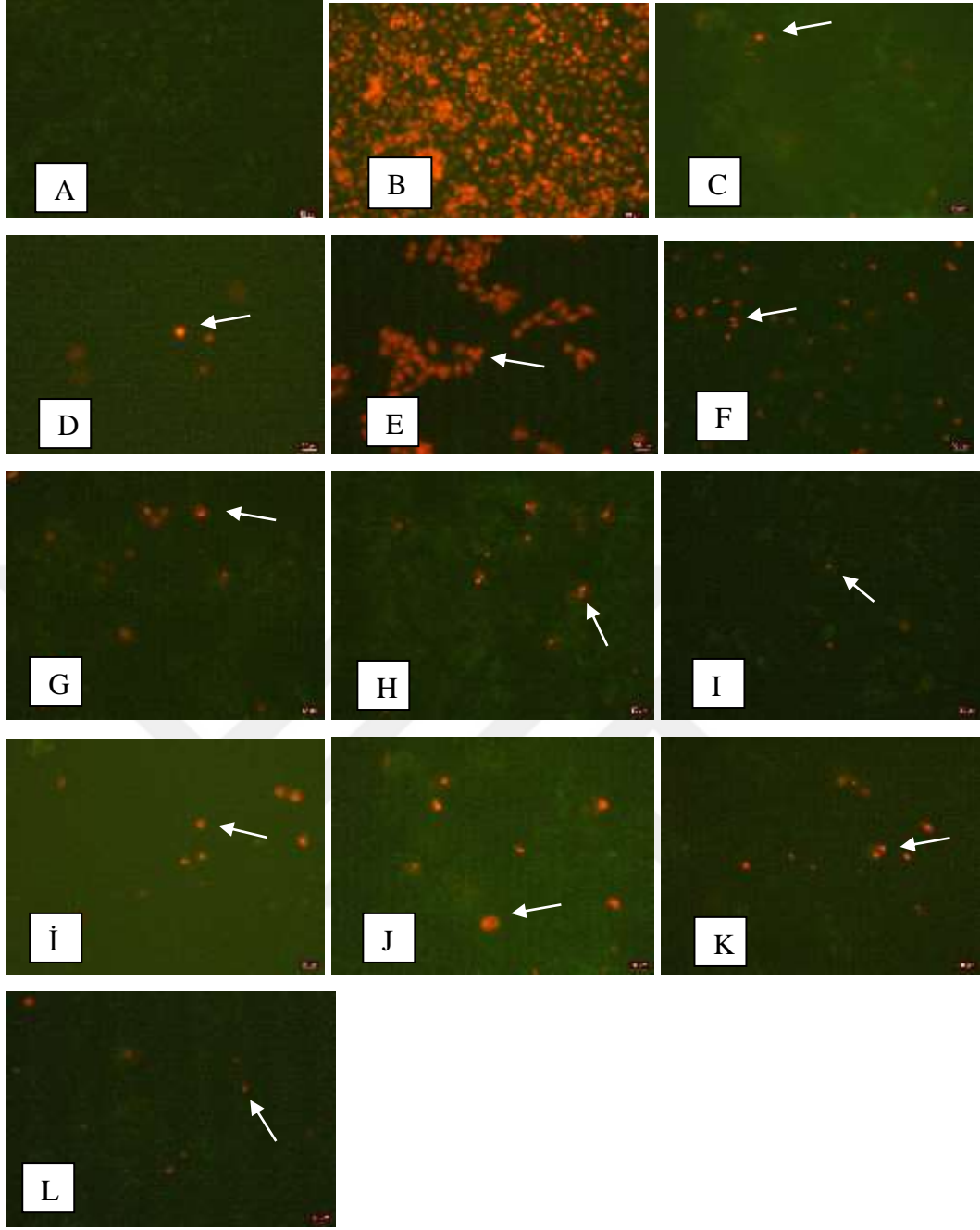
Elde edilen sonuçlara göre kitosan nanopartikülünün tek başına uygulandığı hücrelerde apoptotik ve nekrotik indeksin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonucun sitotoksosite sonuçlarımızla da uyumlu olduğu görülmektedir. Sitotoksosite sonuçlarımıza göre de kitosan nanopartikülü yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru gidildikçe yüksek canlılık oranı (%97,55) göstermiştir.

100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin hücreler üzerindeki apoptotik indeksinin, kitosan nanopartikül ve siRNA'nın tek başlarına hücreler üzerindeki apoptotik indeksinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin 200 µL'lik konsantrasyonunda %15,49'luk bir apoptoz indeksi gözlenirken 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülünün 50 µL ve 25 µL'lik dozlarında sırasıyla %54,3 ve %56,84 apoptotik indeks tespit edilmiştir. Ayrıca bu dozların sırasıyla %14 ve %3,69 oranında düşük nekrotik indeks gösterdikleri için en uygun dozlar olarak seçilebileceği görülmektedir. Elde edilen bu verilere göre siRNA'nın kitosan nanopartiküller ile hedeflenip hücrelere daha iyi transfer edilerek apoptotik ve nekrotik etki yarattığı söylenebilir. Hücre ölümlerinin ise bir kısmının apoptotik, bir kısmının nekrotik mekanizma ile gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Hoechst 33342 ve PI boyları ile HeLa hücrelerinin ikili boyama sonucu elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları

A) Negatif Kontrol, B) Pozitif Kontrol, C) NP, D) 100 nM siRNA, E) 100 nM siRNA + NP (200 μ L), F) 100 nM siRNA + NP (100 μ L), G) 100 nM siRNA + NP (50 μ L), H) 100 nM siRNA + NP (25 μ L), I) 200 nM siRNA, İ) 200 nM siRNA + NP (200 μ L), J) 200 nM siRNA + NP (100 μ L), K) 200 nM siRNA + NP (50 μ L), L) 200 nM siRNA + NP (25 μ L)



Şekil 4.8. Hoechst 33342 ve PI boyaarı ile HeLa hücrelerinin ikili boyama sonucu elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları

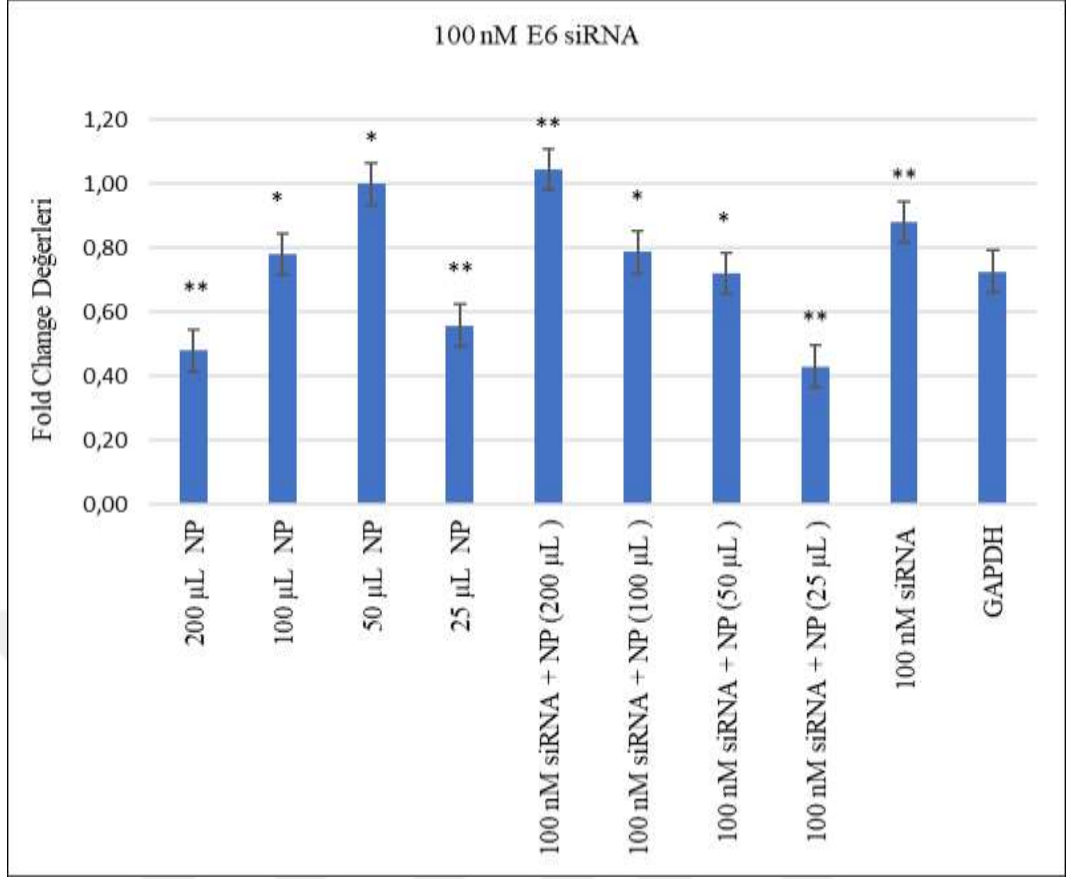
A) Negatif Kontrol, B) Pozitif Kontrol, C) NP, D) 100 nM siRNA, E) 100 nM siRNA + NP (200 μ L), F) 100 nM siRNA + NP (100 μ L), G) 100 nM siRNA + NP (50 μ L), H) 100 nM siRNA + NP (25 μ L), I) 200 nM siRNA, İ) 200 nM siRNA + NP (200 μ L), J) 200 nM siRNA + NP (100 μ L), K) 200 nM siRNA + NP (50 μ L), L) 200 nM siRNA + NP (25 μ L)

4.6. RT-PCR Sonuçları

Kitosan nanopartikülleri içerisine kapsüllenmiş E6-siRNA'nın, E6 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiştir ve veriler üç değerlerin ortalaması olacak şekilde belirlenmiştir.

Her RNA örneği için internal (endojen) kontrol olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın (GAPDH) gen ekspresyonu da ölçülmüştür. Ayrıca gen ifadesi olmayan negatif kontrol (NC) kullanılmıştır. E6 ve GAPDH genlerinin ekspresyonunun incelenmesiyle elde edilen CT değeri, $\Delta\Delta CT$ değeri olarak hesaplanmıştır. Bu değerlendirme; GAPDH CT değerinin E6'nın CT değerinden çıkarılması ve bu değer $\Delta\Delta CT$ $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi formülüne yerleştirilmesiyle yapılmıştır [138]. E6 siRNA yüklü nanopartiküller ile muamele edilmiş hedef genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da görülmektedir.

RT-PCR analizine göre kat değişim değeri olan GAPDH "0,73" olarak bulunmuştur, bu değer kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Muamele edilmiş numunelerde kat değişim değeri, $< 0,73$ ise, kontrol siRNA (GAPDH) grubuna göre gen ekspresyon seviyesinin azaldığını, $> 0,73$ değerleri ise kontrol siRNA (GAPDH) grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.



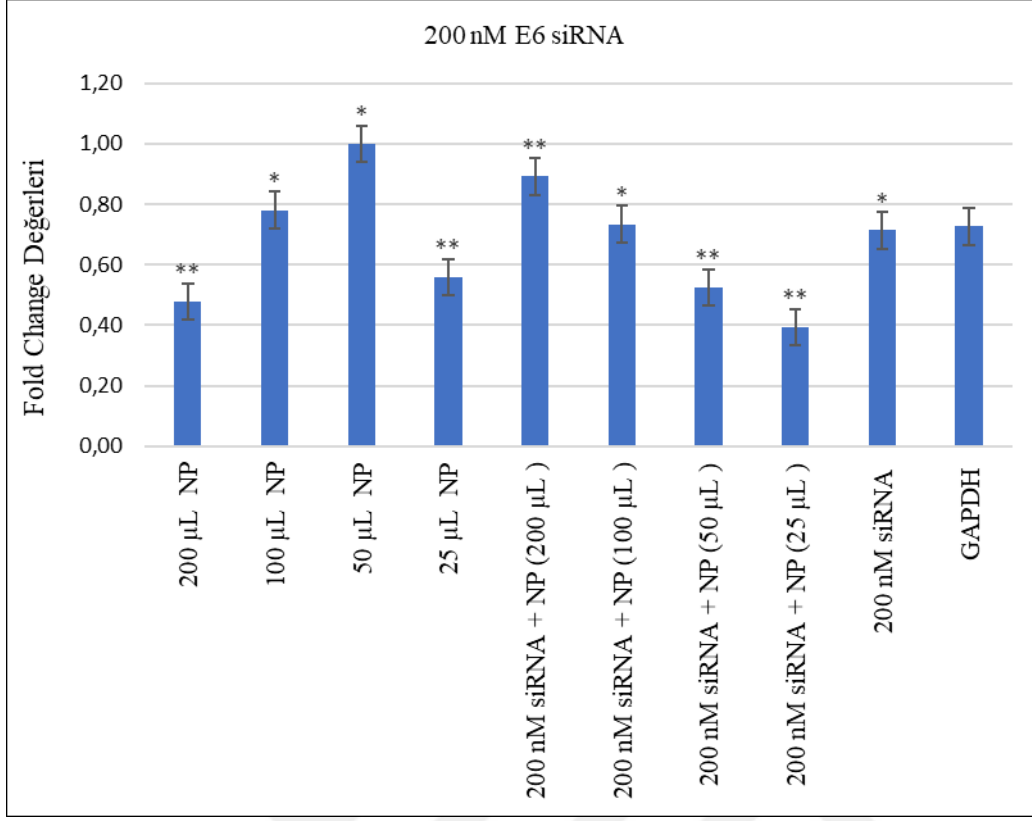
Şekil 4.9. 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa hücrelerindeki E6 geninin ekspresyon değerleri

*GAPDH kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

**GAPDH kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,01$) ifade etmektedir.

100 nM E6 siRNA gen ekspresyonunun değerlendirilmesi, GAPDH değerine bakılarak yapılmıştır. Serbest siRNA'nın E6 genini baskılamadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni hücre membranının siRNA geçirgenliğinin çok düşük olması ya da siRNA'nın hücre içinde dağılabilmesi olarak düşünülmektedir. Chono ve arkadaşlarının [139] yaptığı çalışmada da serbest siRNA'nın gen susturulması üzerindeki etkisi araştırılmış ve çalışma sonucunda serbest siRNA'nın gen inhibasyonu etkisi görülmemiştir.

Elde edilen verilere göre 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülünün 50 µL ve 25 µL'lik dozlarında sırasıyla %1,4 ve %41,1 oranlarında E6 gen ifadesinde azalma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa hücrelerindeki E6 geninin ekspresyon değerleri

*GAPDH kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

**GAPDH kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,01$) ifade etmektedir.

200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülünün 50 µL ve 25 µL'lik dozlarında sırasıyla ve %28,8 ve %46,6 oranlarında E6 gen ifadesinde azalma olduğu görülmüştür. Aynı zamanda apoptoz-nekroz sonuçlarına göre ise düşük derişimlerdeki 200 nM siRNA ve kitosan kompleksinin, siRNA ve kitosan nanopartiküllerin tek başına hücreler üzerindeki apoptotik etkisine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre başarılı bir E6 gen inhibisyonu için en uygun dozun 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülün 25 µL'lik konsantrasyonunda olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında rahim ağzı kanseri tedavisinde verimli siRNA taşınımı için pozitif yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmiş, sentezlenen kitosan nanopartikülleri karakterize edilmiş, elde edilen nanopartiküllere E6-siRNA transfer edilerek HeLa hücre hattına aktarılmış ve hedeflenen E6 geninin ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

siRNA'nın hedeflenen hücre ve dokuya etkili bir şekilde iletilmesi amacıyla ve ideal bir siRNA taşıyıcı olarak kitosan nanopartikülü üretmek için iyonik jelyasyon yöntemi kullanılmıştır. siRNA tek başına bir hücreye dahil edildiğinde, ortamdaki nükleazlar tarafından parçalanabilir. Genellikle oligonükleotidlerin serbest formda uygulanmasının en az etkili uygulama yolu olduğu gözlemlenmiştir [140]. Genetik materyali nükleazlardan korumak, stabil tutmak ve hedef hücrelere güvenli bir şekilde taşımak için çeşitli taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Çalışmamızda taşıyıcı sistem olarak siRNA ile yüksek bağlanma potansiyelinden dolayı katyonik yapılu kitosan nanopartikülleri kullanılmıştır. Çalışma kapsamında sentezlediğimiz nanopartiküllerin karakterizasyon sonuçlarına göre nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutunun 178 nm, yüzey yükünün +21 mV, PDI değerinin ise 0,3 olduğu tespit edilmiştir. TEM analizine göre ise nanopartiküllerin büyüklüğünün 50 nm'den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Rudzinski ve arkadaşları tarafından [87] yapılan bir çalışmada 100-200 nm boyutlarında sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin, siRNA'yı taşıma sırasında bozulmadan koruduğunu ve nükleik asitlerin hücre içine daha verimli aktarıldığı belirtilmiştir. Kitosan nanopartiküllerin PDI değeri ise, parçacık boyut dağılımı değerini vermektedir ve bu değer 0,5'ten küçük olması dar çaplı ve uygun nanopartikül boyut dağılımını göstermektedir [141]. Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarda daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile benzer ve istenilen karakterizasyon özelliklerine sahip nanopartikül üretildiğini göstermektedir. Çalışma kapsamında çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP, anyonik yükü, düşük toksisitesi ve hızlı jelleşme yeteneği nedeniyle uygun bir çapraz bağlayıcıdır. FTIR spektrumundan yararlanarak çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP molekülünün amino gruplarının fosfat anyonu ile çapraz bağlandığı belirlenmiştir. Kitosan-TPP

nanopartikülleri, küçük boyutları, yüksek yakalama ve bağlanma affiniteleri nedeniyle siRNA iletimi için idealdir. Dhandapani ve arkadaşları tarafından [142] yapılan bir çalışmada kitosan-TPP nanopartiküllerinin, kitosan-siRNA komplekslerine göre daha iyi siRNA iletim araçları olduğu ve kompleksin hücreler tarafından daha kolay alındığı gösterilmiştir. Seyreltilmiş asetik asit içinde karıştırılan kitosan ve TPP molekülleri, pozitif yüzeyle yüklenmiş nanopartiküller oluşturur ve yüzey yükünün yoğunluğu ölçülen zeta potansiyel değerleriyle tespit edilmektedir [143]. Çalışma sonucunda elde edilen kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyeli de beklenildiği gibi pozitif yüzeyle yüklenmiştir. siRNA'nın pozitif yüklü kitosan nanopartikülleri ile hangi oranda daha etkili tutunup tutunmadığını gözlemek için siRNA ve kitosan nanopartikülleri farklı derişimlerde bir araya getirilmiş agaroz jel elektroforezi yapılarak en uygun konsantrasyon miktarı belirlenmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin yüzey morfolojileri ve büyüklükleri ise TEM analizi ile değerlendirilmiştir. Morfolojik incelemeler sonucunda kitosan nanopartiküllerinin morfolojilerinin pürüzsüz yüzeyli, düzgün ve küresel formda olduğu gözlemlenmiştir. TEM analizi sonucunda siRNA yüklü nanopartiküllerinin boyutları 50 nm den küçük olarak görüntülenmiştir. Zeta analizi ile TEM analizi sonuçları arasındaki nanopartikül boyut farkının olması; zeta analizi ölçümü sırasında parçacıkların sulu ortamda şişmeleri ve birbirleri ile yapışmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin, serbest siRNA'nın ve kitosan-siRNA komplekslerinin HeLa hücre hattındaki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT metodu kullanılmıştır. Kitosan nanopartiküllerinin HeLa hücre hattında toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (12,5 µL) %97,5 hücre canlılığı tespit edilmiştir. HeLa hücre hattına uygulanan düşük konsantrasyonlardaki 100 nM serbest siRNA (12,5 µL) %73,66 hücre canlılığı gösterirken, 200 nM serbest siRNA (12,5 µL) %71,25 hücre canlılığı göstermiştir. siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi incelendiğinde ise; 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin en düşük dozunda (12,5 µL) %75,45 hücre canlılığı gözlenirken, 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin en düşük dozunda %78,33 hücre canlılığı gözlenmiştir.

Elde edilen kitosan nanopartiküllerinin, serbest siRNA ve siRNA yüklü nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki morfolojik etkileri ve apoptotik-nekrotik oran

indeksleri ikili boyama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Apoptoz-nekroz sonuçları değerlendirildiğinde nanopartikül ve siRNA'nın tek başlarına hücreler üzerindeki apoptotik ve nekrotik indekslerinin, siRNA ile nanopartiküller birlikte verildiği uygulamaya kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin hücreler üzerindeki apoptotik indeksinin 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin apoptotik indeksinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre siRNA'nın kitosan nanopartiküller ile hedeflenip hücrelere daha iyi transfer edilerek apoptotik ve nekrotik etki yarattığı söylenebilir. Yang ve arkadaşlarının [43] yapmış oldukları çalışmada kitosan/HPV16 E7 nanopartiküllerinin servikal kanser hücre hattı üzerindeki apoptoz etkisini incelemişler ve apoptotik hücreler tespit etmişlerdir. Kitosan/HPV16 E7 nanopartikülleri ile tedavi edilen hücrelerde, kitosan ve serbest siRNA partikülleri ile tedavi edilen hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha fazla sayıda apoptotik hücre tespit etmişlerdir ve dolayısıyla kitosan/HPV16 E7 siRNA nanopartiküllerinin in vivo olarak hücrelere iletilmesinin, servikal kanser tedavisi için umut verici bir tedavi olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca Sima ve arkadaşları [144] HPV16 E7 siRNA'nın E6 ve E7 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve p53, p21 ve Rb aktivasyonu yoluyla kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Javadi ve arkadaşları [145]'nın HeLa hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise E6-siRNA ve sisplatinin birlikte verildiği bir tedavide, apoptoz indüksiyonunun arttığını göstermişlerdir.

- Çalışmada elde edilen kitosan nanopartikülleri, serbest siRNA ve kitosan-siRNA komplekslerinin HeLa kanser hücre hattındaki E6 hedef gen ifadesi üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla RT-PCR analizi yöntemi kullanılmış ve GAPDH housekeeping geninin ifadesi ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre E6 gen ifadesinin, 100 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülünün 25 µL'lik dozunda % 41,1 oranında azalma olduğu görülürken, 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülünün 25 µL'lik dozunda % 46,6 oranında bir azalma olduğu görülmüştür. Dolayısıyla elde edilen sonuçlara göre başarılı bir E6 gen inhibisyonu için en uygun dozun 200 nM siRNA yüklü kitosan nanopartikülün 25 µL'lik konsantrasyonunun olduğu söylenebilir. Yapılan bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar E6 gen ifadesinin susturulması ile ilgili literatürde yapılan benzer çalışmalarla da paralellik göstermektedir. Bu çalışmalara örnek olarak, Karin Butz ve

arkadaşları [146] tarafından yapılan bir çalışmada E6'geninin siRNA'lar tarafından moleküler olarak hedeflenmesinin, HPV pozitif kanserlere ve displazilere karşı spesifik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için umut verici yeni bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Rasi ve arkadaşları [147] tarafından yapılan başka bir çalışmada da spesifik siRNA'lar kullanarak HPV E6 onkogeninin susturulmasının servikal kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen bulgular sonucunda E6 geninin susturulmasının, apoptoz indüksiyonunun belirgin şekilde artırılması yoluyla serviks kanseri hücrelerinin sağkalım oranında önemli bir azalmaya ve p53 ekspresyonunun ise önemli ölçüde artmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre, spesifik siRNA'lar kullanılarak E6 ekspresyonunun baskılanması, servikal kanser için bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülebilmektedir. E6 onkogenleri sadece servikal dokularda ifade edildiğinden ve normal dokuda bulunmadığından, serviks kanserini önlemede E6 genini hedeflemek, serviks kanseri gelişimini ve normal doku hasarını önlemek için uygun bir strateji olabilir. Aghbash ve arkadaşları [148] tarafından yapılan bir çalışmada ise E6 genine özgü siRNA ile oksaliplatin kombinasyonunun E6 onkogen ifadesindeki değişimi incelenmiştir. E6 geni ile ilişkili olarak p53, MMP9, Nanog ve kaspaz ekspresyonu gibi hücre genler kantitatif gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak E6-siRNA ve oksaliplatin kombinasyonunun servikal kanser hücrelerinin oksaliplatine duyarlılığını artırdığını ve sağkalım oranını, proliferasyonu ve metastazı azalttığını ve sonuç olarak apoptozis oranını artırdığını, G1 evresinde hücre döngüsünün durmasını indüklediğini ve kemoterapi ilacı dozajını azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca Jung ve arkadaşlarının [149] yapmış oldukları bir çalışmada E6/E7 siRNA'ların radyoterapi ile kombine tedavisinin serviks kanseri hücreleri üzerindeki etkisini araştırmışlar ve siRNA ve ışınlama ile kombine tedavinin insan servikal kanser hücresi nakledilmiş farelerin tümörlerinde tümör büyümesini etkili bir şekilde azalttığını ve servikal kanser hücrelerinin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Sanchez-Meza ve arkadaşlarının [150] yapmış oldukları çalışmada da lipozomal siRNA komplekslerinin E6 geni ve p53 proteini üzerindeki etkisini incelemişler ve elde ettikleri sonuçlara göre, 160 ve 200 nM siRNA'ların kullanımının serviks kanseri hücrelerinde E6 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltırken, p53 ekspresyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışma ile kitosan nanopartikülleri ile taşınan siRNA'nın HeLa hücre hattındaki E6 genini hedefleyerek, serviks kanseri için olası bir terapötik yaklaşım olabileceği belirlenmeye çalışılmıştır ve yapılacak daha sonraki çalışmalara katkıda bulunacaktır. Ancak deneylerin geliştirilerek tekrarlanması gerektiği, daha fazla sayıda housekeeping genin kullanılması ve in vitro olarak elde edilen bu sonuçların in vivo olarak da desteklenmesi gerektiği önerilmektedir.



KAYNAKÇA

- [1] Judasz, E., Lisiak, N., Kopczyński, P., Taube, M., Rubiś, B. (2022). The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 1-13.
- [2] Tafazzoli-Shadpour, M., Mohammadi, E., Torkashvand, E. (2020). Chapter Six - Mechanics Actin Filaments in Cancer Onset and Progress. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 355, 205–243.
- [3] Fontham, E. T. H., Wolf, A. M. D., Church, T. R., Etzioni, R., Flowers, C. R., Herzig, A., Guerra, C. E., Oeffinger, K. C., Shih, Y.-C. T., Walter, L. C., Kim, J. J., Andrews, K. S., DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., Wender, R. C., Smith, R. A. (2020). Cervical Cancer Screening for Individuals at Average Risk: 2020 Guideline Update from the American Cancer Society. *A Cancer Journal for Clinicians*, 70(5), 321–346.
- [4] Yin, W., Wang, J., Jiang, L., James Kang, Y. (2021). Cancer and Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(16), 1791–1801.
- [5] Ebrahimi, N., Manavi, M. S., Nazari, A., Momayezi, A., Faghihkhorsani, F., Rasool Riyadh Abdulwahid, A.-H., Rezaei-Tazangi, F., Kavei, M., Rezaei, R., Mobarak, H., Aref, A. R., Fang, W. (2023). Nano-Scale Delivery Systems for siRNA Delivery in Cancer Therapy: New Era of Gene Therapy Empowered by Nanotechnology. *Environmental Research*, 239(2), 117263. <https://doi.org/10.1016/j.envres>
- [6] Mirzaei, S., Paskeh, M. D. A., Entezari, M., Bidooki, S. H., Ghaleh, V. J., rezaei, S., Hejazi, E. S., Kakavand, A., Behroozaghdam, M., Movafagh, A., Taheriazam, A., Hashemi, M., Samarghandian, S. (2023). siRNA and Targeted Delivery Systems in Breast Cancer Therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 25(5), 1167–1188.
- [7] Itani, R., Al Faraj, A. (2019). siRNA Conjugated Nanoparticles-A Next Generation Strategy to Treat Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1-15.
- [8] Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X.-J. (2020). Therapeutic siRNA: State of the Art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–25.
- [9] Li, X., Le, Y., Zhang, Z., Nian, X., Liu, B., Yang, X. (2023). Viral Vector-Based Gene Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 1-21.

- [10] Mainini, F., Eccles, M. R. (2020). Lipid and Polymer-Based Nanoparticle siRNA Delivery Systems for Cancer Therapy. *Molecules*, 25(11), 1-18.
- [11] Bholakant, R., Qian, H., Zhang, J., Huang, X., Huang, D., Feijen, J., Zhong, Y., Chen, W. (2020). Recent Advances of Polycationic siRNA Vectors for Cancer Therapy. *Biomacromolecules*, 21(8), 2966–2982.
- [12] Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Mitchell, S. G., Matteis, L. D., Fuente, J. M. (2019). Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules*, 24(14), 1-34.
- [13] Schatz, C., Delas, T. (2021). Fundamental and Practical Aspects in the Formulation of Colloidal Polyelectrolyte Complexes of Chitosan and siRNA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2282, 297–327.
- [14] Alioğlu, İ. (2019). ZN(II) kompleksinin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin kanser hücrelerinde araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa.
- [15] Javadi, H., Lotfi, A. S., Hosseinkhani, S., Mehrani, H., Amani, J., Soheili, Z. S., Hojati, Z., Kamali, M. (2018). The Combinational Effect of E6/E7 siRNA and Anti-miR-182 on Apoptosis Induction in HPV16-Positive Cervical Cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(2), 727–736.
- [16] Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I. (2021). The Ever-Increasing Importance of Cancer as a Leading Cause of Premature Death Worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030.
- [17] Masoudi-Nejad, A., Bidkhorji, G., Ashtiani, S. H., Najafi, A., Bozorgmehr, J. H., Wang, E. (2015). Cancer Systems Biology and Modeling: Microscopic Scale and Multiscale Approaches. *Seminars in Cancer Biology*, 30, 60–69.
- [18] National Institutes of Health (NIH) (2007). Understanding Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/> Erişim Tarihi: 04.06.2024
- [19] Akhtar, M. J., Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Alrokayan, S. A., Kumar, S. (2014). Targeted Anticancer Therapy: Overexpressed Receptors and Nanotechnology. *Clinica Chimica Acta*, (436), 78–92.
- [20] Tan, M. L., Choong, P. F. M., Dass, C. R. (2009). Cancer, Chitosan Nanoparticles and Catalytic Nucleic Acids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(1), 3–12.
- [21] Lheureux, S., Denoyelle, C., Ohashi, P. S., Bono, J. S. D., Mottaghy, F. M. (2017). Molecularly Targeted Therapies in Cancer: A Guide for the Nuclear Medicine Physician. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(1), 41-54.

- [22] Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., Sankaranarayanan, R. (2021). Cancer of the Cervix Uteri: 2021 Update. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 155(S1), 28–44.
- [23] Yetmen, Ö., Aktaş, C., Bakkal, B. H. (2012). Serviks Kanserinde Radyoterapi Tedavisinin Yeri ve Önemi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 11(2), 36-38.
- [24] Memorial Sağlık Grubu (2024). <https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberi/vajinal-akinti-nedir-vajinal-akinti-tedavi-yontemleri/> Erişim Tarihi: 04.02.2024.
- [25] Tarhan İ. (2021). Rahim Ağzı Kanseri. <https://www.irfantarhan.com/rahim-agzi-kanseri/> Erişim Tarihi: 11.07.2024.
- [26] Ma, B., Roden, R., Wu, T. C. (2010). Current Status of Human Papillomavirus Vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*, 109(7), 481–483.
- [27] Sun, Y. S., Thakur, K., Hu, F., Zhang, J. G., Wei, Z. J. (2020). Icariside II Inhibits Tumorigenesis via Inhibiting AKT/Cyclin E/ CDK 2 Pathway and Activating Mitochondria-Dependent Pathway. *Pharmacological Research*, 12, 1-10.
- [28] Waggoner, S. E. (2003). Cervical Cancer. *Lancet*, 361(9376), 2217–2225.
- [29] Güner, H., Taşkıran, Ç. (2007). Epidemiology Of Cervical Cancer And The Role Of Human Papilloma Virus. 4(1), 11–19.
- [30] Olusola, P., Banerjee, H. N., Philley, J. V., Dasgupta, S. (2019). Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells* 2019, 8(6), 1-12.
- [31] Sahin, K., Tuzcu, M., Basak, N., Caglayan, B., Kilic, U., Sahin, F., Kucuk, O. (2012). Sensitization of Cervical Cancer Cells to Cisplatin by Genistein: The Role of NFκB and Akt/mTOR Signaling Pathways. *Journal of Oncology*, 2012(1), 1-6.
- [32] Andersson, S., Rylander, E., Larsson, B., Strand, A., Silfversvärd, C., Wilander, E. (2001). The Role of Human Papillomavirus in Cervical Adenocarcinoma Carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 37(2), 246–250.
- [33] Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17.
- [34] Szymonowicz, K. A., Chen, J. (2020). Biological and Clinical Aspects of HPV-Related Cancers. *Cancer Biology & Medicine*, 17(4), 864–878.
- [35] Morgan, E. L., Wasson, C. W., Hanson, L., Kealy, D., Pentland, I., McGuire, V., Scarpini, C., Coleman, N., Arthur, J. S. C., Parish, J. L., Roberts, S., Macdonald, A. (2018). STAT3 Activation by E6 Is Essential for

- the Differentiation-Dependent HPV18 Life Cycle. *PLOS Pathogens*, 14(4), 1-33.
- [36] Okunade, K. S. (2019). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. 40(5), 602-608. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>.
- [37] Doorbar, J. (2006). Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525–541.
- [38] Muñoz, N., Castellsagué, X., González, A. B. de, Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the Etiology of Human Cancer. *Vaccine*, 24(3), 1-10.
- [39] Okay A., Aydın SS., Akın L. (2022). İnsan Papilloma Virüsü (HPV) ve Aşılarının Kullanımı Sonrası Toplumsal Etkileri. *Abant Medical Journal*, 11(1), 143-151.
- [40] Tewari, K. S., Taylor, J. A., Liao, S. Y., DiSaia, P. J., Burger, R. A., Monk, B. J., Hughes, C. C. W., Villarreal, L. P. (2000). Development and Assessment of a General Theory of Cervical Carcinogenesis Utilizing a Severe Combined Immunodeficiency Murine-Human Xenograft Model. *Gynecologic Oncology*, 77(1), 137–148.
- [41] Lee, S. J., Kim, M. J., Kwon, I. C., Roberts, T. M. (2016). Delivery Strategies and Potential Targets for siRNA in Major Cancer Types. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1(104), 2–15.
- [42] Zaimy, M. A., Saffarzadeh, N., Mohammadi, A., Pourghadamyari, H., Izadi, P., Sarli, A., Moghaddam, L. K., Paschepari, S. R., Azizi, H., Torkamandi, S., Tavakkoly-Bazzaz, J. (2017). New Methods in the Diagnosis of Cancer and Gene Therapy of Cancer Based on Nanoparticles. *Cancer Gene Therapy*, 24(6), 233–243.
- [43] Yang, J., Li, S., Guo, F., Zhang, W., Wang, Y., Pan, Y. (2013). Induction of Apoptosis by Chitosan/HPV16 E7 siRNA Complexes in Cervical Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, 7(3), 998–1002.
- [44] Araujo-Arcos, L. E., Montañó, S., Bello-Rios, C., Garibay-Cerdenares, O. L., Leyva-Vázquez, M. A., Illades-Aguilar, B. (2022). Molecular Insights into the Interaction of HPV-16 E6 Variants against MAGI-1 PDZ1 Domain. *Scientific Reports*, 12(1), 1-14.
- [45] Zhang, L., Li, M., Yuan, F., Jiang, J., Zhang, X. (2024) The difference of transcriptome of HPV-infected patients contributes more to the occurrence of cervical cancer than the mutations of E6 and E7 genes in HPV16. *Medicine*, 103(3), 1-7.
- [46] Cho, J. S., Lee, S.-W., Kim, Y.-M., Kim, D., Kim, D.-Y., Kim, Y.-T. (2015). Long (27-Nucleotides) Small Inhibitory RNAs Targeting E6 Protein Eradicate Effectively the Cervical Cancer Cells Harboring Human Papilloma Virus. *Obstetrics & Gynecology Science*, 58(3), 210-216.

- [47] Kim, D. H., Lee, H. W., Park, H. W., Lee, H. W., Chun, K. H. (2020). Bee Venom Inhibits the Proliferation and Migration of Cervical-Cancer Cells in an HPV E6/E7-Dependent Manner. *BMB Reports*, 53(8), 419–424.
- [48] “HPV and Cervical Cancer: An Immunological Aspect Singh S, Tripathy S, Rai MK, Misra DP, Agarwal V - J Curr Oncol.”<https://journalofcurrentoncology.org/article.asp?issn=2589-8892;year=2021;volume=4;issue=2;spage=108;epage=114;aulast=Singh;type=3>/Erişim Tarihi: 17.01.2024.
- [49] “Surgery for Cervical Cancer”,
<https://www.cancer.org/cancer/types/cervical-cancer/treating/surgery.html>.
Erişim Tarihi: 22.03.2024
- [50] N. R., Tabrez, S., Ashraf, G. M., Shakil, S., Damanhour, G. A., Kamal, M. A. (2012). Nanotechnology-Based Approaches in Anticancer Research. *International Journal of Nanomedicine*, 2012(7), 4391-4480.
- [53] Meistrich, M. L. (2013). The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. *Fertility and Sterility*, 100(5), 1180–1186.
- [54] Memorial Sağlık Grubu. (2024).
<https://www.memorial.com.tr/hastaliklar/rahim-agzi-kanseri-hakkindaki-gercekler-ve-tedavi-yontemleri/> Erişim Tarihi:14.12.2023.
- [55] Oylar, Ö., ve Tekin, İ. (2011). Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 16(1), 147-153.
- [56] Masood, F.(2016). Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapy. *Materials Science and Engineering*: 60, 569–578.
- [57] Martin, O. A., Martin, R. F. (2020). Cancer Radiotherapy: Understanding the Price of Tumor Eradication. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1-5.
- [58] Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., Yeoh, K. W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199.
- [59] Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- [60] Özlük, A. A., Oytun, G., Güneç, D. (2017). Kanser İmmünoterapisi. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 2(1), 21-23.
- [61] Haanen, J. B. A. G. (2014). Immunotherapy of Cancer: Towards a New Era. *EMJ Oncol Oncology* 2014, 2(1), 76–82.

- [62] Li, Y., Li, X., Zhou, F., Doughty, A., Hoover, A. R., Nordquist, R. E., Chen, W. R. (2019). Nanotechnology-Based Photoimmunological Therapies for Cancer. *Cancer Letters*, 442, 429–438. doi:10.1016/j.canlet.2018.10.044.
- [63] Zhu, S., Zhang, T., Zheng, L., Liu, H., Song, W., Liu, D., Li, Z., Pan, C. Xian. (2021). Combination Strategies to Maximize the Benefits of Cancer Immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology 2021*, 14(1), 1–33.
- [64] Blattman, J. N., Greenberg, P. D. (2004). Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science*, 305(5681), 200–205.
- [65] Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of Cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(5), 309-335.
- [66] Qiu, H., Min, Y., Rodgers, Z., Zhang, L., Wang, A. Z. (2017). Nanomedicine Approaches to Improve Cancer Immunotherapy. *Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(5), 1-23.
- [67] Hu, H., Wang, Z., Xue, L., Zhang, T., Jing, Y., & Li, Y. (2024). Effects of neoadjuvant chemotherapy combined with radical laparoscopic surgery with quality nursing care on clinical efficacy and sex hormones in patients with cervical cancer. *American Journal of Translational Research*, 16(2), 477.
- [68] DeSouza, K., Savva, C. (2016). Management of Immunotherapy Related Adverse Effects. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 6(1), 381-386.
- [69] Agostinis, P., Vantieghe, A., Merlevede, W., Witte, P. A. M. D. (2002). Hypericin in Cancer Treatment: More Light on the Way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(3), 221–241.
- [70] Kiesslich, T., Krammer, B., Plaetzer, K. (2006). Cellular Mechanisms and Prospective Applications of Hypericin in Photodynamic Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 13(18), 2189–2204.
- [71] Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). The Present and Future Role of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment. *Lancet Oncology*, 5(8), 497–508.
- [72] Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., Schlag, P. (2002). Hyperthermia in Combined Treatment of Cancer. *The Lancet Oncology*, 3(8), 487–497.
- [73] Brade, A. M., Ngo, D., Szmítko, P., Li, P. X., Liu, F. F., Klamut, H. J. (2001). Heat-Directed Gene Targeting of Adenoviral Vectors to Tumor Cells. *Cancer Gene Therapy*, 7(12), 1566–1574.
- [74] Zhao, Q. Q., Chen, J. L., Lv, T. F., He, C. X., Tang, G. P., Liang, W. Q., Tabata, Y., Gao, J. Q. (2009). N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a

Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(4), 706–710.

- [75] Samsunlu, E. T., Üniversitesi, A. K., Fakültesi, V., Dalı, M. B. ve G. A. (2021). Gen Terapisinde CRISPR-Cas9 CRISPR-Cas9 In Gene Therapy. Review Article, 8(3), 574–580.
- [76] Ashrafizadeh, M., Delfi, M., Hashemi, F., Zabolian, A., Saleki, H., Bagherian, M., Azami, N., Farahani, M. V., Sharifzadeh, S. O., Hamzehlou, S., Hushmandi, K., Makvandi, P., Zarrabi, A., Hamblin, M. R., Varma, R. S. (2021). Biomedical Application of Chitosan-Based Nanoscale Delivery Systems: Potential Usefulness in siRNA Delivery for Cancer Therapy. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117809.
- [77] Al-Dosari, M. S., Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*, 11(4), 671–681.
- [78] Tomasina, J., Lheureux, S., Gauduchon, P., Rault, S., Malzert-Fréon, A. (2013). Nanocarriers for the Targeted Treatment of Ovarian Cancers. *Biomaterials*, 34(4), 1073–1101.
- [79] Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A., Anderson, D. (2013). Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nature Materials* 2013, 12(11), 967–977.
- [80] Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A., Hu, J. (2020). Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review. *International Journal of Medical Sciences*, 17(18), 2964-2973.
- [81] Lammers, T., Hennink, W. E., Storm, G. (2008). Tumour-Targeted Nanomedicines: Principles and Practice. *British Journal of Cancer*, 99(3), 392–397.
- [82] Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D. M. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316.
- [83] “Prof. Dr. Bilsen Beşergil: Nanopartiküller; Terapötik Amaçlı (Nanoparticles for Therapeutic Use),” <https://bilsenbesergil.blogspot.com/p/nanopartikuller-terepatik-amacl.html/> Erişim Tarihi: 11.06.2024.
- [84] Dragojevic, S., Ryu, J. S., Raucher, D., Rades, T., Grohgan, H., Löbmann, K. (2015). Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules*, 20(12), 21750-21769.
- [85] Warnock, J. N., Daigne, C., Al-Rubeai, M. (2011). Introduction to Viral Vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 737, 1–25.
- [86] Reischl, D., Zimmer, A. (2009). Drug Delivery of siRNA Therapeutics: Potentials and Limits of Nanosystems. *Biology and Medicine*, 5(1), 8–20.

- [87] Rudzinski, W. E., Aminabhavi, T. M. (2010). Chitosan as a Carrier for Targeted Delivery of Small Interfering RNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 399(1-2), 1–11.
- [88] Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B., Ma, B. (2007). Cationic Lipids and Polymers Mediated Vectors for Delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, 123(1), 1–10.
- [89] Ünal, E., Tahmaz, I., Toroslu, İ. H., Serin, G. C., Yılmaz, A. (2023). Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması ve Kullanım Alanları. <https://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/464/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm15/15.P10.pdf> Erişim Tarihi:26.12.2023.
- [90] Bonferoni, M. C., Gavini, E., Rassa, G., Maestri, M., Giunchedi, P. (2020). Chitosan Nanoparticles for Therapy and Theranostics of Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Liver-Targeting. *Nanomaterials*, 10(5), 1-19.
- [91] Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104(12), 6017–6084.
- [92] Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E. (2011). Chitosan-A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014.
- [93] Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K., Kwon, I. C. (2010). Targeted Delivery of Low Molecular Drugs Using Chitosan and Its Derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 28–41.
- [94] Çakır, Ş. (2019). Development of a Kidney Targetted Nanocarrier Formulation Against Sısplatin Induced Nephrotoxicity, Yüksek Lisans Tezi, *Abdullah Gül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri.
- [95] Jain, T., Kumar, S., Dutta, P. K. (2015). Chitosan in the Light of Nanobiotechnology: A Mini Review. *Journal of Biomedical Technology and Research*, 1(1), 101-107.
- [96] Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. K. (2006). Strong Electronic Charge as an Important Factor for Anticancer Activity of Chitooligosaccharides (COS). *Life Sciences*, 78(20), 2399–2408.
- [97] Katas, H., Alpar, H. O. (2006). Development and Characterisation of Chitosan Nanoparticles for siRNA Delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 115(2), 216–225.
- [98] Abdul Ghafoor Raja, M., Katas, H., Jing Wen, T. (2015). Stability, Intracellular Delivery, and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. *Plos One*, 10(6), 1-19.
- [99] Miele, D., Xia, X., Catenacci, L., Sorrenti, M., Rossi, S., Sandri, G., Ferrari, F., Rossi, J. J., Bonferoni, M. C. (2021). Chitosan Oleate Coated PLGA

- Nanoparticles as siRNA Drug Delivery System. *Pharmaceutics*, 13(10), 1-17.
- [100] Afrin, H., Geetha Bai, R., Kumar, R., Ahmad, S. S., Agarwal, S. K., Nurunnabi, M. (2023). Oral Delivery of RNAi for Cancer Therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 42(3), 699–724.
- [101] Leung, R. K. M., Whittaker, P. A. (2005). RNA Interference: From Gene Silencing to Gene-Specific Therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 222–239.
- [102] Conte, D., MacNeil, L. T., Walkout, A. J. M., Mello, C. C. (2015). RNA Interference in *Caenorhabditis Elegans*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 109(1), 1-39.
- [103] Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S., Deb, J. K. (2004). RNA Interference: Potential Therapeutic Targets. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 649–657.
- [104] Xu, C. fei, Wang, J. (2015). Delivery Systems for siRNA Drug Development in Cancer Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1–12.
- [105] Nawrot, B., Sipa, K. (2006). Chemical and Structural Diversity of siRNA Molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(9), 913–925.
- [106] Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J. P., Passirani, C. (2013). A Review of the Current Status of siRNA Nanomedicines in the Treatment of Cancer. *Biomaterials*, 34(27), 6429–6443.
- [107] Şalva, E., Ekentok, C., Turan, S. Ö., Akbuğa, J., Şalva, E., Ekentok, C., Turan, S. Ö., Akbuğa, J. (2016). Non-Viral siRNA and shRNA Delivery Systems in Cancer Therapy. *RNA Interference*, 201-222.
- [108] “Small-İnterfering RNA (siRNA)”. <https://www.gene-quantification.de/si-rna.html/> Erişim Tarihi:14.12.2023
- [109] “Hücre Ölümü-Genel Bakış, ScienceDirect Konuları.” <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/cell-death/> Erişim Tarihi: 10.06.2024
- [110] Tonnus, W., Belavgeni, A., Beuschlein, F., Eisenhofer, G., Fassnacht, M., Kroiss, M., Krone, N. P., Reincke, M., Bornstein, S. R., Linkermann, A. (2021). The Role of Regulated Necrosis in Endocrine Diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(8), 497–510.
- [111] Erekat, N. S. (2022). Programmed Cell Death in Cerebellar Purkinje Neurons. *Journal of Integrative Neuroscience*, 21(1), 1-15.
- [112] Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., Kerr, J. F. (1988). Patterns of Cell Death. *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, 13, 18–54.

- [113] Khehra, N., Padda, I. S., Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). *StatPearls*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>Erişim Tarihi: 08.06.2024.
- [114] McDonald, C., Taylor, D., Linacre, A. (2024). PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes*, 15(4), 1-22.
- [115] Kocaman, M., Tekin, K. (2020). Pre-PCR Processing, PCR Facilitators and Stabilizer Additives. *Journal of Molecular Virology and Immunology*, 1(2), 11–18.
- [116] Ghannam, M. G., Varacallo, M. (2023). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. *StatPearls*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>Erişim Tarihi:17.07.2024
- [117] Pfaffl, M. W. (2001). A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 1-6.
- [118] Rentería-Solís, Z., Nguyen-Ho-Bao, T., Taha, S., Dauschies, A. (2020). A SYBR Green I Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Detection and Quantification of *Trichomonas Gallinae*. *Parasitology Research*, 119(11), 3909–3913.
- [119] Harshitha, R., Arunraj, D. R. (2021). Real-Time Quantitative PCR: A Tool for Absolute and Relative Quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800–812.
- [120] Chen, M., Wang, Z., Hao, Z., Li, H., Feng, Q., Yang, X., Han, X., Zhao, X. (2023). Screening and Validation of Appropriate Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR under PEG, NaCl and ZnSO₄ Treatments in *Broussonetia Papyrifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 1-16.
- [121] Unat, İ. (2022). Different Types and Modifications of Polymerase Chain Reaction. *Journal of Molecular Virology and Immunology*, 3(4), 159-176. <https://doi.org/10.46683/jmvi.2022.60>
- [122] Turgut, A. O., Korkmaz Agaoglu, O. (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Uygulamalarında Kullanılan RNA'ların Kalite Kontrolleri ve Önemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 334–341.
- [123] Nunes, R., Sousa, Â., Simaite, A., Aido, A., Buzgo, M. (2020). Sub-100 Nm Chitosan-Triphosphate-DNA Nanoparticles for Delivery of DNA Vaccines. *Proceedings*, 78(1), 1-7.
- [124] Agarwal, M., Agarwal, M., Shrivastav, N., Pandey, S., Das, R., Gaur, P. (2018). Preparation of Chitosan Nanoparticles and Their In-Vitro Characterization. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 4(2), 1713–1720.

- [125] Abdul Ghafoor Raja, M., Katas, H., Jing Wen, T. (2015). Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *Plos One*, 10(6), 1-19.
- [126] Akçali, A. (2010). Araştırmalarda Tanımlanmış Hücre Hatlarının Kullanılmasının Önemi The Importance of Utilization of Authenticated Cell Lines in Researches. *Derleme / Türk Onkoloji Dergisi*, 25(3), 119–123.
- [127] Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., Steinmetz, L. M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(8), 1213–1224.
- [128] Özdoğan M. “HeLa Hücreleri: Kanserde Yeni Tedavi Arayışlarını Destekleyen Ölümsüz Bir Kadının Hikayesi”, <https://www.drozdogan.com/hela-hucreleri-kanserde-yeni-tedavi-arayislarini-destekleyen-olumsuz-bir-kadinin-hikayesi/>Erişim Tarihi: 14.11.2023
- [129] “HeLa - CCL-2 | ATCC.” <https://www.atcc.org/products/ccl-2/>Erişim Tarihi: 17.10.2023.
- [130] Wolinetz, C. D., Collins, F. S. (2020). Recognition of Research Participants’ Need for Autonomy: Remembering the Legacy of Henrietta Lacks. *Jama*, 324(11), 1027–1028.
- [131] Boyraz, M. Ü., Shekhany, B., Süzergöz, F. (2021). Cellular Imaging Analysis of MTT Assay Based on Tetrazolium Reduction. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1), 95–99.
- [132] Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., Thao, D. T. P. (2020). Optimization and Application of MTT Assay in Determining Density of Suspension Cells. *Analytical Biochemistry*, 610, 113937. doi:10.1016/j.ab.2020.113937.
- [133] Karatop, E. U., Cimenci, C. E., Aksu, A. M., Karatop, E. U., Cimenci, C. E., Aksu, A. M. (2022). Colorimetric Cytotoxicity Assays. *Cytotoxicity - Understanding Cellular Damage and Response*, <https://www.intechopen.com/chapters/83164/>Erişim Tarihi:25.01.2024
- [134] Çolak, M. (2017). Kanser Hücre Hattında Altın Nanopartikülleri ile siRNA Taşımını, Yüksek Lisans Tezi. *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırıkkale.
- [135] Martins, A. F., de Oliveira, D. M., Pereira, A. G. B., Rubira, A. F., Muniz, E. C., (2012). Chitosan/TPP Microparticles Obtained by Microemulsion Method Applied in Controlled Release of Heparin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1127–1133.
- [136] Azhary, S. Y., Purnama, D., Florena, F. F., Vanitha, M., Muchtaridi, Panatarani, C., Joni, I. M. (2019). Synthesis and Characterization of

Chitosan:SiO₂ Nanocomposite by Ultrasonic Spray Drying. *Conference Series: Materials Science and Engineering*, 550(1), 1-7.

- [137] Aktürk, Ö., Tunali, B. Ç. (2022). Lazer Ablasyonu ile Sentezlenmiş Levan Kaplı Altın Nanoparçacıkların siRNA Transfeksiyon Ajanı Olma Potansiyeli Üstüne Çalışma. *International Journal of Engineering Research and Development*, 14(1), 282–298.
- [138] Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- [139] Chono, S., Li, S. D., Conwell, C. C., Huang, L. (2008). An Efficient and Low Immunostimulatory Nanoparticle Formulation for Systemic siRNA Delivery to the Tumor. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 131(1), 64–69.
- [140] Rettig, G. R., Behlke, M. A. (2012). Progress Toward In Vivo Use of siRNAs-II. *Molecular Therapy*, 20(3), 483–512.
- [141] Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M. R., Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A., Rezayat, M. (2012). Preparation and in Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Mesobuthus Eupeus Scorpion Venom as an Antigen Delivery System. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1), 44–52.
- [142] Dhandapani, R. K., Gurusamy, D., Howell, J. L., Palli, S. R. (2019). Development of CS-TPP-dsRNA Nanoparticles to Enhance RNAi Efficiency in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes Aegypti*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- [143] Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., McCarron, P. (2005). Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan–TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2), 65–73.
- [144] Sima, N., Wang, W., Kong, D., Deng, D., Xu, Q., Zhou, J., ... & Ma, D. (2008). RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis*, 13, 273-281.
- [145] Javadi, H., Lotfi, A. S., Hosseinkhani, S., Mehrani, H., Amani, J., Soheili, Z. S., Kamali, M. (2018). The combinational effect of E6/E7 siRNA and anti-miR-182 on apoptosis induction in HPV16-positive cervical cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(2), 727-736.
- [146] Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, F. (2003). siRNA Targeting of the Viral E6 Oncogene Efficiently Kills Human Papillomavirus-Positive Cancer Cells. *Oncogene*, 22(38), 5938–5945.

- [147] Rasi, F., Zarredar, H., Amini, M., Onori, H., Dadashzadeh, K., Khanmohammadi, M., Vahedi, L., Mokhtarzadeh, A., Baradaran, B., Bannazadeh Baghi, H. (2023). Suppression of E6 Oncogene Induces Apoptosis in CaSki Cervical Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(10), 3389–3395.
- [148] Aghbash, P. S., Hemmat, N., Baradaran, B., Bannazadeh Baghi, H. (2023). siRNA-E6 Sensitizes HPV-16-Related Cervical Cancer through Oxaliplatin: An in Vitro Study on Anti-Cancer Combination Therapy. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 1-13.
- [149] Jung, H. S., Rajasekaran, N., Song, S. Y., Kim, Y. D., Hong, S., Choi, H. J., ... & Shin, Y. K. (2015). Human papillomavirus E6/E7-specific siRNA potentiates the effect of radiotherapy for cervical cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12243-12260.
- [150] Sánchez-Meza, L. V., Bello-Rios, C., Eloy, J. O., Gómez-Gómez, Y., Leyva-Vázquez, M. A., Petrilli, R., ... & Illades-Aguiar, B. (2024). Cationic Liposomes Carrying HPV16 E6-siRNA Inhibit the Proliferation, Migration, and Invasion of Cervical Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 16(7), 1-19.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma Erdal
Doğum Tarihi : 13.06.1995
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

Lisans: Kırıkkale Üniversitesi-Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans: Kırıkkale Üniversitesi-Biyomühendislik Bölümü-Devam Ediyor

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar :

T.C Cumhurbaşkanlığı Külliyesi - Covid 19 Tanı Laboratuvarı - Biyolog (TÜSEB Tarafından Görevlendirme) - 2020/2022

Medismart Klinik Araştırmalar – Saha Koordinatörü - 2023

Yayınlar:

Erdal Ş., Polat G., Çelebi Keskin A. (2024). Gen Terapide Verimli siRNA Taşınımı İçin Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Optimizasyonu. *Bursa 2. Uluslararası Matematik ve Mühendislik Kongresi*, Bursa, 10-12 Mayıs.