

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAPK6 GENİNİ HEDEFLEYEN siRNA YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE
HATTINDA ANTİKANSER ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ceyhun TORUNTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Ocak, 2023



T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAPK6 GENİNİ HEDEFLEYEN siRNA YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE
HATTINDA ANTİKANSER ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ceyhun TORUNTAY tarafından hazırlanan tez çalışması 19.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emel ORDU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Birsen ELİBOL, Üye
İstanbul Medeniyet Üniversitesi



Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “MAPK6 Genini Hedefleyen siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Antikanser Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ceyhun TORUNTAY

İmza





Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2022-4887 numaralı projesi ile desteklenmiştir.





Aileme,



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca fikirlerime sonsuz bir destek ile yaklaşp bilgi ve birikimi ile her daim bana yardımcı olmaya çalışan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Gerek akademik gerekse sosyal hayatta fikirlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Emrah YÜCESAN'a,

Gerçekleştirdiğim tez çalışmam boyunca laboratuvar olanaklarını sunarak yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Birsen ELİBOL'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca katkılarını eksik etmeyen, aynı laboratuvarda birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Seda SÜSGÜN ve Arş. Gör. Nur Damla KORKMAZ'a,

En yoğun zamanında bile büyük bir özveri ile tez çalışmamda bana yardımcı olan Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de dostluğunu eksik etmeyen Ozan GÜNGÖR'e,

Hayatım boyunca aldığım her kararda sonsuz güvenle beni destekleyen, her koşulda yanımda olan, gerçekleştirdiğim tüm başarıların gizli kahramanları ve bana sundukları karşılıksız sevgi ile bugün olduğum insan olmamı sağlayan annem Filiz TORUNTAY, babam İsmail TORUNTAY ve ablam Ceyda ALTUNÖZ'e,

Bana daima sevgi ve hoşgörü ile yaklaşan ve her daim kalbimde biriktirdiği güzel anılarda yaşayacak olan anneannem Döne ADİLLER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a,

Bugünlere gelmemde katkısı olan herkese sonsuz teşekkürler.

Ceyhun TORUNTAY



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kanser	5
2.1.1 Proto-Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler.....	6
2.1.2 Kanserin Ayırt Edici Özellikleri.....	7
2.1.3 Kanser Türleri	9
2.1.4 Mevcut Kanser Tedavi Seçenekleri.....	9
2.1.5 Meme Kanseri	12
2.1.6 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı	13
2.2 RNA İnterferans (RNAi).....	15
2.2.1 Küçük Mücadeleci RNA (siRNA).....	16
2.3 Taşıma Sistemler.....	19
2.3.1 Nanopartiküller.....	19
3 MATERYAL VE METOT	22
3.1 Materyal	22
3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	22
3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler.....	23
3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler.....	24
3.1.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	25
3.2 Metot	27
3.2.1 siRNA Moleküllerinin Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması	27
3.2.2 İkili Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi	27
3.2.3 siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	29



3.2.4	Hücre Kültürü Çalışmaları	31
3.2.5	MTT Testi ile Sitotoksisite Analizi	33
3.2.6	MAPK6 Gen Ekspresyon Analizi	33
3.2.7	MAPK6 Protein Ekspresyon Analizi.....	37
3.2.8	Yara İyileşme Deneyi ile Migrasyon Analizi.....	38
3.2.9	İmmünohistokimyasal Prolifere Hücre Nükleer Antijen (PCNA) Boyaması ile Proliferasyon Analizi	38
3.2.10	Koloni Formasyon Analizi.....	40
3.2.11	Akış Sitometrisi ile Apoptoz Analizi.....	40
3.2.12	İstatistiksel Analiz	41
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1	siRNA Moleküllerinin Kalibrasyon Eğrileri	42
4.1.1	MAPK6 siRNA Kalibrasyon Eğrisi	42
4.1.2	Scrambled (Negatif Kontrol) siRNA Kalibrasyon Eğrisi	42
4.2	PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi.....	43
4.3	PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	44
4.3.1	Enkapsülasyon Etkinliği	45
4.3.2	Reaksiyon Verimi	45
4.3.3	İlaç Yükleme Kapasitesi	46
4.3.4	Nanopartiküllerin Boyut, Dağılım ve Zeta Potansiyel Analizi	47
4.3.5	Nanopartiküllerin SEM Analizi.....	50
4.3.6	Nanopartiküllerin AFM Analizi	54
4.3.7	Nanopartiküllerin FTIR Analizi	55
4.3.8	Nanopartiküllerin In Vitro Salımının Belirlenmesi	57
4.4	MTT Testi ile Sitotoksisite Analizi	58
4.5	MAPK6 Gen Ekspresyon Analizi.....	62
4.6	MAPK6 Protein Ekspresyon Analizi	66
4.7	Yara İyileşme Deneyi ile Migrasyon Analizi.....	70
4.8	İmmünohistokimyasal PCNA Boyaması ile Proliferasyon Analizi.....	74
4.9	Koloni Formasyon Analizi	78
4.10	Akış Sitometrisi ile Apoptoz Analizi	81
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	89
	KAYNAKÇA	96
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	110



SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
rpm	Dakikada dönme hızı
°C	Derece santigrat
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
nM	Nanomolar
n	Örneklem büyüklüğü
sa	Saat
W	Watt
xg	Yer çekimi
%	Yüzde



KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Ago2	Argonaute2
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
Boş NP	Boş PLGA Nanopartikülü
bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
CO ₂	Karbondioksit
DL	İlaç Yükleme Kapasitesi
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
dsRNA	Çift Zincirli RNA
ds-siRNA	Çift Zincirli Küçük Mücadeleci RNA
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ELISA	Enzime Bağlı İmmünoSorbent Analiz
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ER	Östrojen Hormon Reseptörü
ERK	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ERK3	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz 3
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi



H ₂ O	Su
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HRP	Horseradish Peroksidaz
IC ₄₀	%40 İnhibe Edici Konsantrasyon
IC ₅₀	%50 İnhibe Edici Konsantrasyon
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MAPK6	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 6
MAPK6 siRNA NP	MAPK6 siRNA Yüklü PLGA Nanopartikülü
miRNA	MikroRNA
MTT	3-4,5-Dimetil-Tiyazolil-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NP	Nanopartikül
PAK	p21 Proteinle Aktive Olan Kinaz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PR	Progesteron Hormon Reseptörü
PTGS	Post-Transkripsiyonel Gen Susturma
PVA	Polivinil Alkol
RISC	RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA İnterferans
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RY	Reaksiyon Verimi
Scrambled siRNA NP	Scrambled siRNA Yüklü PLGA Nanopartikülü



SD	Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
shRNA	Kısa Saç Tokası RNA
siRNA	Küçük Mücadeleci RNA
ssRNA	Tek Zincirli RNA
ss-siRNA	Tek Zincirli Küçük Mücadeleci RNA
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TRBP	TAR RNA bağlayıcı protein
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole ve Görünür Işık



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Mutasyona uğramış bir hücreden başlayan kanserleşme aşamaları	6
Şekil 2.2	Kanserin Ayırt Edici Özellikleri	9
Şekil 2.3	İnvert mikroskop ile elde edilmiş yüksek yoğunlukta MCF-7 hücre hattı görüntüsü (40X)	13
Şekil 2.4	MAPK sinyal yolağı	14
Şekil 2.5	A. mRNA-siRNA etkileşimi B. mRNA-miRNA etkileşimi	17
Şekil 2.6	siRNA biyogenezi	18
Şekil 2.7	Viral ve viral olmayan taşıma sistemleri	19
Şekil 4.1	MAPK6 siRNA molekülünün suya karşı kalibrasyon eğrisi	42
Şekil 4.2	Scrambled siRNA molekülünün suya karşı kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 4.3	MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği	47
Şekil 4.4	Scrambled siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği	47
Şekil 4.5	Boş PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği	48
Şekil 4.6	MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği	48
Şekil 4.7	Scrambled siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği	49
Şekil 4.8	Boş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği	49
Şekil 4.9	MAPK6 siRNA NP'lerin 10 kV'da 20000X (A) ve 60000X (B) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri	51
Şekil 4.10	Scrambled siRNA NP'lerin 10 kV'da 20000X (A) ve 60000X (B) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri	52
Şekil 4.11	Boş NP'lerin 10 kV'da 20000X (A) ve 60000X (B) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri	53
Şekil 4.12	MAPK6 siRNA NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü	54
Şekil 4.13	Scrambled siRNA NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü	55
Şekil 4.14	Boş NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü	55
Şekil 4.15	Boş PLGA NP, MAPK6 siRNA NP ve scrambled siRNA NP'lerin FTIR spektrumları	56
Şekil 4.16	MAPK6 siRNA NP'lerin <i>in vitro</i> MAPK6 siRNA salım (%) grafiği	57
Şekil 4.17	Scrambled siRNA NP'lerin <i>in vitro</i> scrambled siRNA salım (%) grafiği	57
Şekil 4.18	MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda MAPK6 siRNA NP, scrambled siRNA NP ve boş NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre canlılıkları (%)	59
Şekil 4.19	MCF-7 hücrelerine 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda MAPK6 siRNA NP, scrambled siRNA NP ve boş NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre canlılıkları (%)	60



Şekil 4.20	MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen rölatif MAPK6 gen ekspresyon yüzdeleri	62
Şekil 4.21	MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen MAPK6 protein ekspresyon yüzdeleri	66
Şekil 4.22	Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde ve boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde oluşturulan yaranın 0., 24., 48., 72. ve 96. saat mikroskop görüntüleri.....	70
Şekil 4.23	Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde ve boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde yara kapanma yüzdesinin zamana bağlı değişimi	71
Şekil 4.24	Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP ile 24 ve 48 saat muamele sonrası immünohistokimyasal PCNA boyaması gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinin 4X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri	74
Şekil 4.25	MCF-7 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen PCNA işaretlenmiş hücre yüzdesi.....	75
Şekil 4.26	MCF-7 hücrelerine 8 gün boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulandıktan sonra kristal viyole ile boyanan MCF-7 hücre kolonileri	78
Şekil 4.27	MCF-7 hücrelerine 8 gün boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre koloni sayıları	79
Şekil 4.28	Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri.....	82
Şekil 4.29	Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri.....	83
Şekil 4.30	Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve <i>scrambled</i> siRNA NP ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri.....	84
Şekil 4.31	MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve	



scrambled siRNA NP uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile belirlenen canlı hücre yüzdeleri.....85

Şekil 4.32 MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdeleri.....86



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Dizayn edilen primerler hakkında bilgiler	34
Tablo 3.2 RT-PCR bileşenleri	36
Tablo 3.3 RT-PCR kondisyonları	36
Tablo 4.1 PLGA nanopartiküllerinin sentez parametreleri	43
Tablo 4.2 Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin belirlenen ağırlığı, enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi	44
Tablo 4.3 Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin belirlenen ortalama boyutu, çoklu dağılım indeksi ve zeta potansiyeli	49



MAPK6 Genini Hedefleyen siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Antikanser Etkilerinin Değerlendirilmesi

Ceyhun TORUNTAY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Meme kanseri, kadınlarda yaşam kalitesini oldukça düşüren ve fazla sayıda ölüme yol açan bir hastalıktır. Mevcut tedavi yöntemleri, etkili tedaviyi minimum yan etki ile sağlama bakımından istenilen düzeyden fazlasıyla uzaktır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, Mitojenle aktive olan protein kinaz 6 (*MAPK6*) geninin aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Küçük mücadeleci RNA'lar (siRNA), RNA interferans mekanizması aracılığıyla hedef genin ekspresyonunu etkili şekilde baskılayabilmektedir. Ancak, siRNA'ların negatif yükleri nedeniyle düşük hücresel alımı, hücrede kısa yarı ömürleri ve enzimatik aktiviteye karşı savunmasız olmaları siRNA bazlı terapötik stratejilerin önünde duran başlıca engellerdir. Yüksek biyouyumluluk sergileyen nanopartiküler taşıma sistemleri, bu engellerin ortadan kaldırılması açısından sıklıkla tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasında, *MAPK6* genini hedefleyen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve bu nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki olası antikanser etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. *MAPK6* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri (*MAPK6* siRNA NP), *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri (*scrambled* siRNA NP) ve boş PLGA nanopartikülleri (boş NP) ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve nanopartiküller enkapsülasyon



etkinliği, boyut, şekil, yüzey özellikleri ve salım profili gibi özellikler bakımından uygun bulunmuştur. MAPK6 siRNA NP'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile incelenmiştir. MAPK6 siRNA NP için IC₄₀ değeri 24 saat muamele sonrası 20 µg/mL, 48 saat muamele sonrası 30 µg/mL olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulamasının, *MAPK6* gen ve protein ekspresyonunu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Ardından, bu baskılamanın olası antikanser etkileri çeşitli analizler ile test edilmiştir. Analiz sonuçları, MAPK6 siRNA NP'nin, MCF-7 hücrelerinin migrasyonunu, proliferasyonunu ve koloni oluşturma yeteneğini anlamlı düzeyde azalttığını ve MCF-7 hücrelerinin apoptozunu anlamlı düzeyde artırdığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, MCF-7 hücrelerinde MAPK6 siRNA NP ile *MAPK6* geninin baskılanmasının antikanser etkiye neden olduğunu belirlenmiştir. Bu durum, MAPK6'yı aday terapötik hedef haline getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: MAPK6, siRNA, PLGA nanopartikül, meme kanseri, antikanser



ABSTRACT

Evaluation of Anticancer Effects of siRNA-Loaded PLGA Nanoparticles Targeting the MAPK6 Gene in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Ceyhun TORUNTAY

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Breast cancer is a disease that significantly reduces the quality of life and causes a high number of deaths in women. Current treatment methods are far from the desired level in terms of providing effective treatment with minimum side effects. Mitogen-activated protein kinase 6 (*MAPK6*) gene is known to be overexpressed in MCF-7 breast cancer cells. Small interfering RNAs (siRNA) may effectively suppress the expression of the target gene by RNA interference mechanism. However, the low cellular uptake of siRNAs due to their negative charge, their short half-life in the cell, and their vulnerability to enzymatic activity are major obstacles to siRNA-based therapeutic strategies. Nanoparticle transport systems with high biocompatibility are often preferred to eliminate these barriers. In this thesis, it was aimed to synthesize siRNA-loaded PLGA nanoparticles targeting the *MAPK6* gene and to investigate the possible anticancer effects of these nanoparticles on the MCF-7 breast cancer cell line. PLGA nanoparticles loaded with *MAPK6* siRNA (*MAPK6* siRNA NP), PLGA nanoparticles loaded with *scrambled* siRNA (*scrambled* siRNA NP) and blank PLGA nanoparticles (blank NP) were synthesized by double emulsion solvent evaporation technique. The characterization of the synthesized nanoparticles was carried out, and the nanoparticles were found to be



suitable in terms of properties such as encapsulation efficiency, size, shape, surface properties and release profile. The cytotoxic effect of MAPK6 siRNA NP on MCF-7 cells was investigated by MTT assay. The IC₄₀ value for MAPK6 siRNA NP was determined as 20 µg/mL after 24 hours of treatment and 30 µg/mL after 48 hours of treatment. It was determined that MAPK6 siRNA NP administration significantly reduced the expression of the *MAPK6* gene and protein compared to the control group. Subsequently, the possible anticancer effects of this suppression were tested by various analysis. According to these results, MAPK6 siRNA NP significantly decreased the migration, proliferation and colony formation ability of MCF-7 cells and significantly increased apoptosis of MCF-7 cells. In conclusion, it was determined that suppression of *MAPK6* gene with MAPK6 siRNA NP in MCF-7 cells produced an anticancer effect. This makes MAPK6 a candidate therapeutic target.

Keywords: MAPK6, siRNA, PLGA nanoparticle, breast cancer, anticancer



1.1 Literatür Özeti

Kanser, yaşam kalitesini ciddi düzeyde düşüren ve ölüme yol açan hastalıklar arasında yerini uzun yıllardır korumaktadır [1]. Kanserler, tümör yapısını oluşturan hücre türü ve köken aldıkları organ baz alınarak sınıflandırılabilir. Kanserler, köken aldıkları organ baz alınarak meme kanseri, pankreas kanseri, mesane kanseri gibi sınıflandırılabilir [2]. Meme kanseri, kadınlarda en sık teşhisi konulan ve en fazla sayıda ölüme neden olan kanser türü olarak dikkati çekmektedir [1]. Meme kanseri vakalarının %95'i adenokarsinomdur [3]. Kanser tedavisinde sıklıkla cerrahi müdahale, kemoterapi ve ışın tedavisi tercih edilmektedir. Ancak bu tedavi yöntemlerinin, tüm kanser türlerine uygulanabilir olmaması, kanserin heterojen yapısı nedeniyle çok etkili tedavisel sonuç sağlayamaması ve neden olabildiği çeşitli yan etkiler nedeniyle bugüne dek kanser tedavisinde istenen ilerleme sağlanamamıştır [4-8].

Çeşitli sinyal yolları ve bu yollarda yer alan kinazlar, kanserleşmenin başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkilidir. En bilinenlerinden bir tanesi Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ve MAPK'lerdir [9]. MAPK sinyal yolağı çoğalma, farklılaşma, programlı hücre ölümü, hücrel stres tepkileri ve hücrel hareketler gibi çok çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde büyük pay sahibidir [10-12]. MAPK'lerin, meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde anormal ekspresyon sergilediği belirlenmiştir [9]. Memeli hücrelerinde, farklı görevleri üstlenen 14 farklı MAPK bulunmaktadır [13]. Bunlar arasında, diğer MAPK'lere kıyasla daha az karakterize edilebilmiş atipik bir MAPK olan MAPK6 (ERK3) da yer almaktadır [10]. MAPK6'nın meme kanseri ve akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese edildiği ve bu durumun migrasyon ve invazyonu artırdığı belirlenmiştir [14-16]. Ek olarak, *MAPK6* geninin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında da aşırı eksprese edildiği bilinmektedir [17].

RNA interferans (RNAi), hedeflenen bir genin ekspresyonunun, tek veya çift zincirli küçük kodlamayan RNA molekülleri tarafından etkili bir şekilde baskılandığı bir biyolojik süreçtir. Bu RNAi mekanizmasını, mikroRNA'lar (miRNA), kısa saç tokası



RNA'lar (shRNA) ve küçük mücadelecı RNA'lar (siRNA) gibi çeşitli RNAi substratları düzenleyebilmektedir. Bu moleküller arasında, siRNA'lar sağladıkları düşük hedef dışı etki ve kolayca dizayn edilebilme gibi avantajlar ile ön plana çıkmaktadır [18, 19]. siRNA'lar, çeşitli organizmalarda endojen olarak üretilebilmelerinin yanı sıra, eksojen olarak da sentezlenebilen yapılardır. Eksojen olarak sentezlenen siRNA'lar, genellikle 21-25 baz çifti (bp) uzunluğunda yapılardır. siRNA'lar, verildikleri hücrede miRNA biyogenez aşamalarını takip ederek benzer bir süreçten geçmektedir. Bu sürecin sonunda ise, siRNA molekülü hedef genin ekspresyonunu geçici olarak etkili bir şekilde baskılamaktadır [18, 20, 21].

siRNA moleküllerinin zayıf hücresel alımı ve enzimatik degradasyonu gibi sorunlar, bu moleküllerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda terapötik aktivitelerini ciddi düzeyde olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, siRNA uygulamasında taşıma sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [22, 23]. Taşıma sistemleri viral ve viral olmayan sistemler olarak ikiye ayrılmaktadır [24]. Viral sistemler, yol açabileceği genoma entegrasyon gibi yan etkiler nedeniyle, hedef hücrenin güvenliğine yönelik endişelere yol açmaktadır. Dolayısıyla, günümüzde hedef hücre ve organizma sağlığı açısından daha güvenli görülen viral olmayan sistemler daha sık tercih edilmektedir [18]. siRNA ve diğer çeşitli terapötik maddelerin taşınmasında en sık tercih edilen viral olmayan taşıma sistemi nanopartiküllerdir. Nanopartiküller, 10-1000 nm boyutunda sentezlenen yapılardır [25]. Sık tercih edilmelerinde, yüksek taşıma kapasiteleri, uygulamaya oldukça uygun küçük boyutları, düşük düzeyde toksisite ve immünojenisiteye neden olmaları ve yüksek biyoyumluluk sergilemeleri gibi sağladıkları avantajlar rol oynamaktadır. Nanopartiküller, farklı maddeler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Terapötik uygulamalarda en sık tercih edilen nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller ve inorganik nanopartiküllerdir [26, 27].

Polimerik nanopartiküller, kontrollü salım sergileme, farklı boyut ve yapıdaki maddeleri enkapsüle edebilme gibi avantajları dolayısıyla sıklıkla kullanılmaktadır [18]. Nanopartikül sentezinde en sık tercih edilen polimerlerden bir tanesi, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) onaylı Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'dır [28]. PLGA nanopartikülleri, yüksek düzeyde biyoyumluluk sergilemesi, biyoyararlanımı artıran çözücü gücü, kontrollü ve sürekli salım gerçekleştirme yeteneği, küçük boyutlarda sentezlenebilmesi ve kolayca sentezlenebilmesi gibi özellikleri



nedeniyle siRNA başta olmak üzere çeşitli terapötik maddelerin taşınmasında sıklıkla tercih edilmektedir [28, 29].

Tüm bu nedenlerle, siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* tedavi çalışmalarında sıklıkla denenmektedir. Bu denemeler sonucunda da PLGA nanopartikülleri aracılığıyla hücreye verilen siRNA moleküllerinin, yüksek düzeyde hedef gen baskılamasına neden olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar sonucunda, hedef genin siRNA ile baskılanmasının çeşitli hastalıklarda hücresel düzeyde anlamlı terapötik katkı sağladığı belirlenmiştir [30, 31].

1.2 Tezin Amacı

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, *MAPK6* genini hedefleyen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve sentezlenen bu nanopartiküllerin *MAPK6* geninin aşırı eksprese edildiği MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki olası antikanser etkilerinin *in vitro* test edilmesi amaçlanmıştır. *MAPK6* siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün hedef geni baskılama etkisinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve bu durumun protein ekspresyonuna etkisinin de enzime bağlı immünosorbent analiz (ELISA) ile değerlendirilmesi planlanmaktadır. *MAPK6* siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün MCF-7 hücre hattı üzerindeki antikanser etkilerinin ise MTT testi, yara iyileşme deneyi, immünositokimyasal PCNA boyaması, koloni formasyon analizi ve akış sitometrisi gerçekleştirilerek tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış kontrol), boş PLGA nanopartikülü, çıplak *MAPK6* siRNA molekülü ve *scrambled* (negatif kontrol) siRNA yüklü PLGA nanopartikülü uygulamasına kıyasla değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

RNA interferans mekanizması aracılı hedef gen ekspresyonunun baskılanmasını sağlayan siRNA molekülleri, kanser başta olmak üzere çok çeşitli hastalıkların tedavisinde umut vadeden bir potansiyele sahiptir. Ancak hücre zarının negatif yüklü siRNA moleküllerine karşı sergilediği düşük geçirgenlik, siRNA moleküllerinin hücrede kısa yarı ömürleri ve enzimatik aktiviteye karşı dirençsiz yapıları siRNA bazlı tedavilerin önünde duran engellerden başlıcalarıdır. Bu çalışmada, *MAPK6* genini hedefleyen siRNA moleküllerinin PLGA nanopartiküllerine yüklenerek, siRNA bazlı terapötik uygulamaların önünde duran bu engellerin aşılması ve PLGA nanopartiküllerinin sağladığı kontrollü salım ve yüksek biyoyoumluluk gibi avantajların etkili bir biçimde



kullanılması planlanmaktadır. Oluşturulan siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin, öncelikle *in vitro* uygulamalarda kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi adına karakterizasyonu gerçekleştirilecektir. MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün, MAPK6 genini aşırı eksprese eden MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antikanser etkisi, tamamlanmış besiyer, boş PLGA nanopartikülü, çıplak MAPK6 siRNA ve *scrambled* (negatif kontrol) siRNA yüklü PLGA nanopartikülü ile kıyaslamalı olarak incelenecektir. Bu çalışma, meme kanseri hücre hattında MAPK6 siRNA yüklü nanopartiküllerin uygulandığı ve antikanser etkinin değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Bu nedenle, MCF-7 hücrelerinde MAPK6 siRNA nanopartikülleri aracılı MAPK6 geninin baskılanmasının, antikanser etkiye neden olup olmadığına dair sonuçların, kanser tedavisinde siRNA yüklü nanopartiküllerin kullanımı açısından aydınlatıcı ve yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmanın atipik bir MAPK olan MAPK6'nın kanserleşmedeki rolüne yönelik de literatüre katkı sağlayacak çıktılar ortaya koyması beklenmektedir.



2 GENEL BİLGİLER

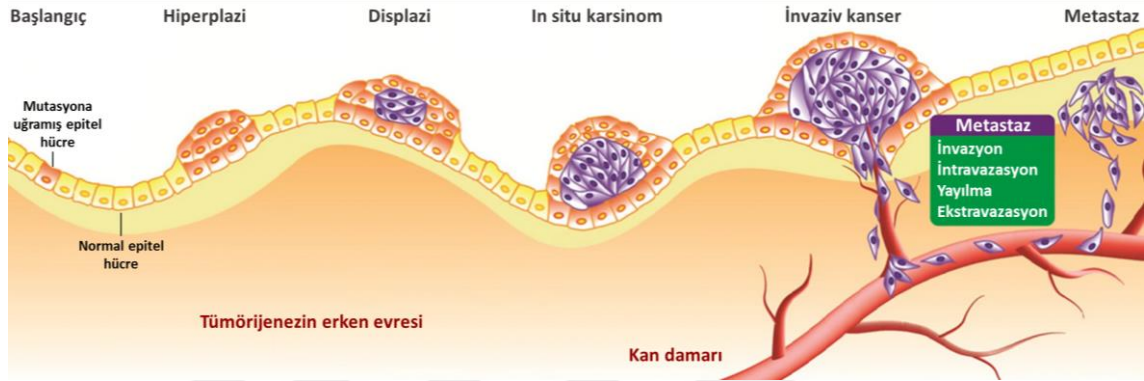
2.1 Kanser

Kanser, dünyanın neredeyse her yerinde en önde gelen ölüm nedenlerinden bir tanesidir ve yaşam kalitesini artırmanın önünde yer alan önemli bir sorundur. Yayınlanan son istatistiklere göre, 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vaka tanısı konulmuştur. Ayrıca, 2020 yılında, kanser tanısı almış yaklaşık 10 milyon kişi hayatını kaybetmiştir [1]. Sağlıklı hücrelerde, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin aktiviteleri arasında bir denge mevcuttur. Hücrenin canlılığına sağlıklı devam etmesinde bu genlerin aktivite dengesine ek olarak apoptotik genlerin aktivitesi de büyük önem arz etmektedir [32].

Sağlıklı bir hücrede onkojenik mutasyonun meydana gelmesi, hücreyi olağan işleyişinden uzaklaştırır. Mutasyonların gerçekleşmeye devam etmesi ve birikmesi sonucunda, bu hücreler kendilerini büyüme, bölünme ve ölüme dair pek çok hücresel sinyale kapalı hale getirir. Böylece, kanserleşme başlar [32, 33]. Memelilerde hücre döngüsü, hücresel büyüme düzenleyici sinyalleri ve genetik hasar tespiti yapan proteinlerden gelen sinyalleri içeren oldukça kompleks ve organize bir süreçtir [34]. Bu sürecin başından sonuna dek, çeşitli kontrol noktaları mevcuttur. Mutasyon sonucunda, bu kontrol noktalarının birkaçında veya tamamında işlev kayıpları meydana gelmektedir. Böylece mutasyonlu hücreler, öncelikle hücre döngü sürecinde yer alan bu sorunlu kontrol aşamalarından ve ardından ise programlı hücre ölümünden kaçır [33]. Kanser hücresi, meydana gelen mutasyonlar sonucu normalden uzak kendi bölünme trendini oluşturur ve kendisine, sağlıklı hücrelere kıyasla bölünme avantajı sağlayan bu trendi takip eder. İlk olarak, kanser hücresinin bulunduğu dokuda sağlıklı hücrelerle benzer görünümde olan hücre sayısında artış meydana gelir ve bu durum hiperplazi olarak adlandırılır. Kanser hücresinin bölünmesiyle meydana gelen yavru hücreler de köken aldıkları hücre gibi anormal bölünme modeli gösterir. Hiperplazi sonrası, yavru hücrelerde meydana gelen diğer mutasyonların da etkisiyle normal görünümlü hücrelere ek olarak anormal görünümlü hücre sayısında da artış meydana gelir ve bu durum displazi olarak adlandırılır. Devam eden bölünmeler sonrası, dokuda anormal görünümlü mutant hücre



sayısı artmaya devam eder ve oluşan hücre kümesi *in situ* karsinom olarak adlandırılır. Kanserin erken evrelerinde, tümörler iyi huyludur ve oluştukları dokuda bulunurlar. Ancak tümör büyüdükçe, hücrelerde meydana gelen ek mutasyonların da etkisiyle kötü huylu hale gelir. Kötü huylu tümörler, çevre dokulara direkt olarak yayılarak invazyon yapabilir ve uzak dokulara kan ve lenf sistemi aracılığıyla metastaz yapabilir. İnvaziv kanser olarak adlandırılan bu durum, ikincil tümörlerin oluşumuna neden olmaktadır [32, 35]. Tüm bu kanserleşme sürecinin şematik özeti Şekil 2.1’de yer almaktadır.



Şekil 2.1 Mutasyona uğramış bir hücreden başlayan kanserleşme aşamaları [35]’ten uyarlanmıştır

2.1.1 Proto-Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Kanserin başlangıcında ve gelişiminde çeşitli genetik mutasyonlar büyük rol oynamaktadır. Bu noktada, iki gen sınıfı öne çıkmaktadır: Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler [36]. Retrovirüslerde yer alan onkogenlerin homologlarının ökaryotik hücrelerde bulunduğu keşfedilmiştir. Proto-onkogenler isimlerini bu keşiften ve aktif formlarının hücrede neden olduğu değişimlerden almıştır [37]. Proto-onkogenler, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler hücre bölünmesini teşvik ederken, hücresel farklılaşmayı ve programlı hücre ölümünü ise engellemektedir. Proto-onkogenler, nokta mutasyonu, insersiyon mutasyonu, delesyon mutasyonu, kromozomal translokasyon ve gen amplifikasyonu gibi mekanizmalar aracılığıyla aktif formu olan onkogenlere dönüşür [38, 39]. Proto-onkogenlerde meydana gelen bu mutasyonlar işlev kazancı mutasyonudur [36]. Söz konusu bu aktivasyon, sentezlenen onkoproteinde meydana gelen yapısal değişiklik kaynaklıdır. Aktif form onkogenler, düzenleyici sinyallere kendilerini kapatmışlardır. Artan sayıda sürekli aktif onkoproteinler sentezlenir. Bunun sonucunda da hücre bölünmesi artar, hücresel farklılaşma ve hücre ölümü azalır [38, 39].

Onkoproteinler genel olarak protein kinazlardan oluşmaktadır. Ras ve c-myc kinazları, en bilinen ve çoğu kanserde rol oynayan onkoproteinlerdendir [40].

Tümör baskılayıcı genler ise, isimlerini sentezledikleri proteinlerin fonksiyonlarından almıştır. Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü, hücre bölünmesi, DNA onarımı gibi hücresel süreçleri düzenleyen proteinleri kodlamaktadır [41]. Bu proteinler hücre döngüsünde yer alan kontrol noktalarının aktivasyonunu sağlamakta ve hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Ek olarak, tümör baskılayıcı proteinler DNA onarımını ve programlı hücre ölümünü teşvik etmektedir. Onkoproteinlerin aksine, tümör baskılayıcı proteinlerin tüm bu fonksiyonları tümör oluşumunu baskılayıcı özelliktedir [42]. Tümör baskılayıcı genlerde, anlamsız mutasyon, insersiyon mutasyonu ve delesyon mutasyonu gibi işlev kaybı mutasyonları meydana gelebilmektedir. Bu mutasyonlar sonrası, doğal işlevlerini yerine getiremeyen mutant tümör baskılayıcı proteinler sentezlenmektedir [41]. Dolayısıyla, hücre bölünmesi artar, hücre döngüsü esnasında gerekli kontroller sağlanamaz, hasarlı hücrelerde DNA onarımı gerçekleşemez ve onarılamayan hücreler programlı hücre ölümüne yönlendirilmez. PTEN, p53 ve BRCA2 proteinleri, en bilinen ve çoğu kanserde mutasyona uğramış olduğu belirlenmiş tümör baskılayıcı proteinlerdendir [43].

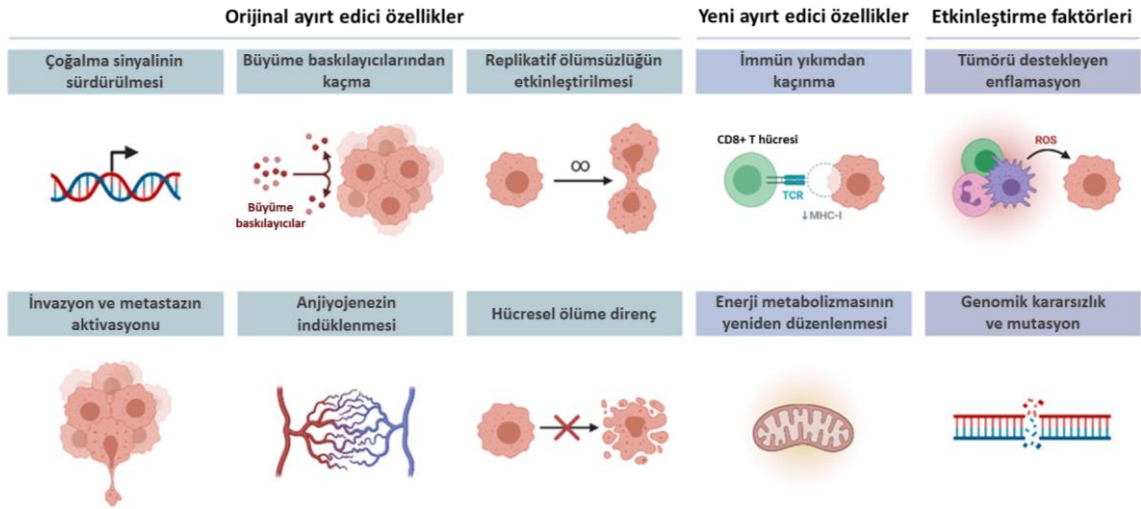
2.1.2 Kanserın Ayırt Edici Özellikleri

21. yüzyılın hemen başında Hanahan ve Weinberg, anormal bölünme paterni sergileyen mutasyonlu bir hücreden kanserin neoplastik aşamasına geçişte kazanılan biyolojik yetenekleri içeren "kanserin ayırt edici özellikleri"ni tanımlamıştır. Kanserın ayırt edici özellikleri, hastalığın neoplastik aşamasının mekanizmasal karmaşıklığını açığa kavuşturma konusunda büyük katkı sağlamıştır [44]. Bu ayırt edici özelliklerin kanserleşmeye sağladıkları katkıları anlamak, doğru terapötik yaklaşımları gerçekleştirmek adına oldukça önemlidir.

Kanserleşmede en büyük pay kimyasal madde veya UV gibi dış faktörler aracılı meydana gelen veya kalıtılan mutasyonlardır. Bu noktada DNA tamir mekanizmalarında yer alan enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar ise oldukça kritiktir. Diğer ayırt edici özelliklerin tamamının genetik arka planında da bu ve benzeri mutasyonlar yer almaktadır. Diğer ayırt edici özellikler ise şu şekildedir: Bölünme için dış kaynaklı sinyallere ihtiyaç duyan normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri sürekli olarak proliferatif sinyalleşmeye sahiptir. Belirli bir büyüklüğe ulaştığında dış sinyaller aracılı

olarak büyümeyi durduran normal hücrelerin aksine, kanser hücrelerinde bu dış sinyallerin bağlanacağı reseptörler hasarlıdır ve böylece bu büyüme engelleyici dış sinyallerden kaçınır. Telomerlerin kısalması durumu kaynaklı olarak sınırlı bir bölünme yeteneğine sahip normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri sahip oldukları artırılmış telomerase aktivitesi ile bu kısalma durumunun önüne geçerler ve sınırsız bölünme yeteneği sergiler. Normal hücrelerin immün sistem hücreleri tarafından tanınmasını ve yıkımdan kaçınmasını yüzeylerinde yer alan proteinler sağlamaktadır; kanser hücreleri de bu proteinleri taklit ederek immün hücrelere kendilerini normal hücre gibi tanıtır ve immün yıkımdan kaçınır [44, 45].

Tümör ortamı, kanser hücreleri dışında enflamasyon ilişkili hücreleri de barındırmaktadır. Bu hücreler, reaktif oksijen türleri üreterek DNA hasarına neden olmaktadır. Bu DNA hasarları da kanserleşmeyi indüklemektedir. Buna ek olarak, enflamasyon ilişkili hücreler, invazyonu ve anjiyogenezi de desteklemektedir. Hücreler, besin ve oksijen ihtiyaçlarını damarlar aralığıyla gidermektedir. Kanser hücrelerinde bu ihtiyaç normal hücrelere kıyasla çok daha fazladır ve mevcut damarlanma yetersiz kalmaktadır. Her ne kadar erişkin bireylerde damar oluşturma yeteneği düşük olsa da kanser hücreleri bu bakımdan da sağlıklı hücrelerden ayrılmaktadır. Kendilerini destekleyecek yeni damar oluşumlarını (anjiyogenezi) sağlarlar. Köken aldıkları dokudan genellikle ayrılmayan normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri belirli bir büyüme seviyesine ulaştığında geçirdikleri mutasyonlar kaynaklı olarak başka dokulara göç etmektedir. Herhangi bir DNA hasarı meydana geldiğinde DNA hasar tamir mekanizmalarını aktive eden veya hasar düzeltilemeyecek boyutta ise programlı hücre ölümüne yönlendirilen normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri programlı hücre ölümüne yönlendirilmez ve hücre ölüm direnci sergiler. Son olarak ise, kanser hücreleri ihtiyaç duydukları yüksek besini sağlamak adına hücre enerjiyi kendi çıkarlarına olacak şekilde yeniden düzenleyebilmektedir [44, 45]. Kanser hücrelerine ait tüm bu ayırt edici özellikler Şekil 2.2’de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.2 Kanserın Ayırt Edici Özellikleri [46]'dan uyarlanmıştır

2.1.3 Kanser Türleri

Kanserler, köken organa veya dokuya ve/veya tümörü oluşturan hücre tipine göre sınıflandırılmaktadır. Köken organına göre kanserler meme kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri şeklinde sınıflandırılabilir [2]. Tümörleri oluşturan hücre tipine göre ise, 3 ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar: karsinomalar, sarkomalar ve lenfomalar/lösemilerdir. Karsinomalar, epitel hücrelerden köken almaktadır ve insan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. İnsan kanserlerinin %10'unu ise daha nadir kanser türleri olan sarkomalar, lenfomalar ve lösemiler oluşturmaktadır. Sarkomalar, bağ dokulardan; lenfomalar B ve T immün hücrelerinden; lösemiler ise kan üreten hücrelerden köken almaktadır [43]. Bu iki sınıflandırma genellikle, tümörü oluşturan hücre tipini ve tümörün lokasyonunu belirtmek adına birlikte kullanılmaktadır. Örneğin, meme karsinomu ve fibrosarkom.

2.1.4 Mevcut Kanser Tedavi Seçenekleri

Kanser, dinamik yapısı sebebiyle oldukça heterojen bir hastalıktır. Tümörler, farklı moleküler yapıya sahip çeşitli hücreler içerebilmektedir. Bu hücrelerin, herhangi bir tedavisel yaklaşıma tepkileri farklı olabilmektedir [47]. Bu nedenle, standart ve tüm kanser tipleri için etkili bir tedavi stratejisi oluşturulması şu ana dek pek mümkün olmamıştır. En yaygın ve alışlagelmiş kanser tedavileri, cerrahi müdahale, kemoterapi ve ışın tedavisidir [48]. Uygulanacak tedavinin belirlenmesinde, kanserin türü, lokasyonu, evresi ve metastaz durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır [4]. Kanser tedavisinde sıklıkla tercih edilen bu tedavi seçenekleri sayesinde, 2006 yılı

öncesine kıyasla vaka sayısındaki artış hızı oldukça azalmış ve kansere dayalı ölüm sayılarında da azalma meydana gelmiştir [5]. Bu alışlagelmiş tedavi seçenekleri, tek olarak uygulanabilmektedir ancak sıklıkla kanserin durumu da göz önünde bulundurularak kombine olarak uygulanmaktadır.

Cerrahi müdahale, uygulanmış ve başarı sağlamış kanser tedavilerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Cerrahi müdahale, tümör ve nüksetme ihtimalini azaltmak adına tümör çevresindeki sağlıklı dokunun vücuttan çıkarılmasıdır. Lokal bir tedavi seçeneğidir ve erken teşhis durumunda tümörün metastaz yapmadan vücuttan uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Cerrahi müdahale, kanserin ilk evrelerinde ve genellikle tümör katı olduğunda ilk tercih edilen tedavi seçeneklerindendir. Oldukça ilerlemiş ve vücudun çeşitli bölümlerine metastaz yapmış kanserlerde etkili değildir [5, 6]. Genellikle cerrahi müdahale ile kombine şekilde kullanılan diğer yaygın tedavi seçenekleri ise kemoterapi ve ışın tedavisidir.

Işın tedavisi, batı ülkelerinde görülen kanser vakalarının büyük çoğunluğunun tedavisinde ve dünya genelinde görülen kanser vakalarının ise yaklaşık yarısının tedavisinde kullanılmaktadır [49, 50]. Işın tedavisi, tümör bölgesine yüksek fiziksel enerjili radyasyon uygulanmasına dayanmaktadır. Uygulanan bu radyasyon, tümörü oluşturan kanser hücrelerini, hücrelerde DNA hasarına yol açarak öldürür ve tümör yapısının küçülmesine neden olmaktadır [50, 51]. Işın tedavisi de tıpkı cerrahi müdahale gibi lokal bir tedavi seçeneğidir. Erken evre bazı karsinomların (prostat, serviks vb.) ve erken evre lenfomaların tedavisinde tek olarak uygulanabilmektedir. Ancak, meme karsinomu gibi bazı karsinomların, ileri aşama lenfomaların ve sarkomaların tedavisinde tek uygulanması yeterli değildir ve diğer tedavi yöntemleriyle kombine olarak uygulanabilmektedir [49, 51]. Tümör yapısına yönelik uygulanan ışın tedavisi, çevre dokulardaki sağlıklı hücreleri de etkileyebilmektedir [4]. Ek olarak, ışın tedavisi esnasında meydana gelen DNA hasarına karşı, tamir mekanizmalarının devreye girmesi gibi etkenler kaynaklı olarak tümörde ışın tedavisine karşı direnç oluşabilmektedir. Oluşan bu direnç, tedavinin etkisini sınırlandırmakta ve hatta kanserin nüksetmesine zemin hazırlayabilmektedir. Cerrahi müdahale ve ışın tedavisi genel olarak katı ve normal tümörlere karşı etkili olabilen tedavi seçenekleridir ve etkileri lokaldir [6, 52].

Kemoterapi, tekli veya kombine uygulanması durumunda, en etkili kanser tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir [53]. Kemoterapi, sitotoksik kemoterapi ajanlarının etken madde olarak uygulandığı ilaç bazlı bir tedavi yöntemidir. Cerrahi müdahale ve ışın

tedavisinin aksine, kemoterapi lokal değil sistemik bir tedavidir. Bu ilaçlar terapötik etkilerini, hücre döngüsünde yer alan proteinleri etkileyerek veya doğrudan DNA hasarına yol açarak göstermektedir. Her iki durumun sonunda da hedef hücreler apoptoza yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır [9, 54]. FDA onaylı kemoterapi ilaçlarından bilinen ve yaygın kullanılanlardan bazıları şunlardır: Docetaxel, paclitaxel, mitoxantrone ve 5-fluorouracil. Kemoterapi, katı doku tümörlerine ek olarak, lösemi gibi hematolojik kanserlerde ve metastaz yapmış ileri evre kanserlerde de etkilidir. Her ne kadar sitotoksik kemoterapi ajanları genel olarak yüksek bölünme hızına sahip hücreleri hedefleyerek spesifik olarak kanser hücrelerini ortadan kaldırıyor gibi algılansa da başta yüksek bölünme hızına sahip kıl folikül hücreleri ve kemik iliği hücreleri gibi sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir [9, 54]. Uygulama sistemik olduğundan, bu ve benzeri yan etkiler vücudun farklı bölgelerinde meydana gelebilmektedir. Ayrıca, hastalar tedavi esnasında bu kemoterapi ajanlarına direnç geliştirebilmektedir. Bu durumda, tedavinin etkisi oldukça azalacaktır ve tedavi süreci ciddi bir şekilde sekteye uğrayacaktır [52].

Bu alışlagelmiş tedavilere ek olarak, gerekli onayları almış veya faz aşamasında olan çeşitli yenilikçi tedaviler de mevcuttur [4]. Bunlardan bazıları: İmmünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kök hücre tedavisidir [4, 48]. İmmünoterapi, kanser tedavisinde son yıllarda giderek artan bir uygulama sayısına sahiptir. İmmünoterapi, temel olarak immün sistem bileşenleri kullanılarak tümörün ortadan kaldırılmasıdır. Sistemik bir tedavi seçeneğidir. Tedavi yöntemi olarak çeşitlilik barındırmaktadır. Kanser hücrelerince salgılanan proteinleri hedefleyen antikorlar ve T hücreleri kullanılabilir [4, 52]. Kanser tedavisinde kullanılan FDA onaylı antikorlardan bazıları şunlardır: Trastuzumab, rituximab ve bevacizumab [48]. Alışlagelmiş tedavilere kıyasla, daha yüksek özgüllük ve etkinlik sağlayabilmektedir. Buna karşın, daha az sayıda yan etkiye yol açtığı belirlenmiştir [4, 52]. Nanoteknolojik gelişmeler ile hedefe yönelik kanser tedavisi hızla gelişmektedir. Nanoilaçlar, dizayn boyutları ve yüzey proteinleri vasıtasıyla yalnızca belirli hücreleri hedefleyebilmektedir. Dolayısıyla, belirli kanser hücrelerini özgül olarak hedefleyerek bu hücrelerin ortadan kaldırılmalarını sağlamak açısından, nanoilaçlar büyük bir potansiyel barındırmaktadır. Henüz klinik deneme aşamasında olan kök hücre tedavisi ise kanserleşmiş ve hasarlı hücrelerin, herhangi bir vücut hücresine farklılaşabilen kök hücreler kullanılarak yenilenmesine dayanmaktadır [4, 55]. Etkin ve güvenli bir tedavi olma bakımından umut vericidir.

2.1.5 Meme Kanseri

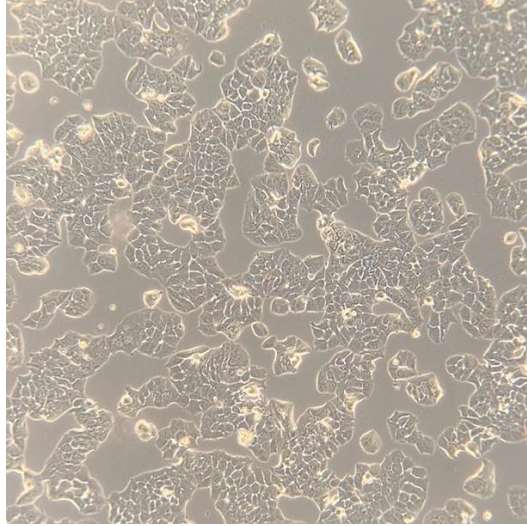
Meme kanseri kadınlarda en yaygın teşhis edilen ve oran olarak olmasa da sayı olarak en fazla ölüme yol açan kanser türüdür. 2020 yılında kadınlarda dünya genelinde gözlemlenen yeni kanser vaka sayısı 9.227.484'tür. Bu vakaların 2.261.419'u meme kanseri vakasıdır ve bu yeni vakaların %24,5'ine tekabül etmektedir. 2020 yılında kadınlarda dünya genelinde görülen kanser kaynaklı ölüm sayısı ise 4.429.323'tür. Kanser kaynaklı ölümlerin 684.996'sı meme kanseri teşhisi konulmuş kadınlardır ve bu da kanser kaynaklı ölümlerin %15,5'ine tekabül etmektedir [1]. Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu, tümörü oluşturan hücrelere göre adenokarsinom olarak sınıflandırılmaktadır [3]. Meme kanseri moleküler olarak 4 alt gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplar: Üçlü negatif meme kanseri, Luminal A meme kanseri, Luminal B meme kanseri ve HER2 pozitif meme kanseridir. Bu alt gruplar, hücre zarında veya sitozolde yer alan reseptörlere göre oluşturulmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), östrojen hormon reseptörü (ER) ve progesteron hormon reseptörü (PR) bulunmayan kanser hücrelerinden meydana gelmektedir. Luminal A meme kanseri, ER ve PR reseptörlerinden en az birini içeren ancak HER2 reseptörünü içermeyen kanser hücrelerinden meydana gelmektedir. Luminal B meme kanseri, ER ve PR reseptörlerinden en az birini içeren ve bu reseptörlere ek olarak HER2 reseptörünü de içerebilen kanser hücrelerinden meydana gelmektedir. HER2 pozitif meme kanseri ise, yalnızca HER2 reseptörü içeren kanser hücrelerinden meydana gelmektedir [56]. Meme kanseri tedavisinde, ait olduğu alt grubu da dikkate alarak mevcut kanser tedavileri tek veya kombine olarak uygulanmaktadır.

2.1.5.1 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Hücre hatları, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara yönelik tedavisel araştırmaların ilk basamaklarından olan *in vitro* incelemelerde sıklıkla kullanılmaktadır. MCF-7, MDA-MB-231 ve T-47D gibi meme kanseri hücre hatları, *in vitro* meme kanseri moleküler modellemesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [57]. Hücre hatları, tümör çalışmaları için sınırsız ve homojen materyal sağlamaktadır ve hücre hatlarına yapılan uygulamanın etkisini gözlemek için gerekli süre, *in vivo* uygulamalara kıyasla oldukça kısadır. Ancak, hücre hatlarının pasajlama aşamaları esnasında meydana gelen mutasyonları biriktirdiği de bilinmektedir. Biriken bu mutasyonlar da hücrelerin moleküler mekanizmasını ve morfolojisini etkilemektedir [57-59]. Dolayısıyla, bu

durumdaki hücrelerin terapötiklere verdiği cevap hastalığın doğal seyrini yansıtmayacaktır.

Oldukça heterojen bir hastalık olan meme kanserine yönelik tedavisel çalışmalarda, hastalığın alt tipine bağlı olarak tümörün moleküler mekanizmasını yansıtan meme kanseri hücre hatları sıklıkla tercih edilmektedir [57]. Gerçekleştirilen meme kanseri çalışmalarında, en sık kullanılan hücre hatlarından bir tanesi MCF-7'dir. MCF-7 hücre hattının morfolojisini gösteren invert mikroskop ile elde edilmiş görüntü, Şekil 2.3'te yer almaktadır. MCF-7 hücre hattı, adenokarsinom kanser hücresidir. 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz ırk bir kadının meme dokusundan izole edilmiştir [58]. MCF-7 hücre hattı düşük bir hücre göçü potansiyeline sahiptir ve invaziv olmayan bir hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattı, meme kanserinin en yaygın alt tipi olan Luminal A alt tipidir [59, 60]. Dolayısıyla, ER ve PR reseptörü bulundurmaktadır. Sitozolda yer alan bu ER reseptörü aracılı olarak, östrojeni östradiol formunda işleme gibi meme epiteline özgü çeşitli özellikleri korumaktadır. Tüm bu nedenler dolayısıyla, *in vitro* meme kanseri çalışmaları için oldukça kullanışlıdır ve sıklıkla çalışmalarda tercih edilmektedir. MCF-7 hücre hattının iki katına çıkma süresi ortalama 30 saat olsa da kültürlenmesi oldukça kolay hücre hatlarından bir tanesidir [58, 59].

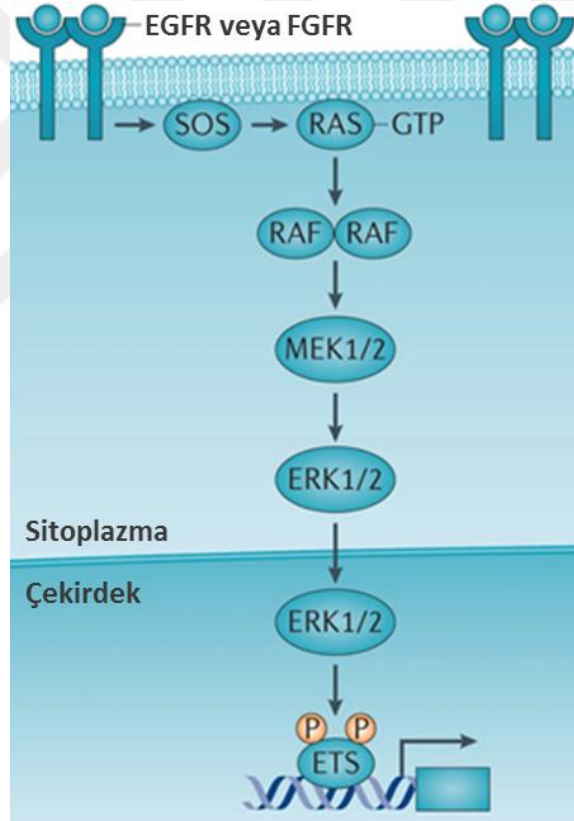


Şekil 2.3 İnvart mikroskop ile elde edilmiş yüksek yoğunlukta MCF-7 hücre hattı görüntüsü (40X)

2.1.6 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı

Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler), başta meme kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri ile ilişkilidir [9]. Memelilerde, çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen

14 farklı MAPK bulunmaktadır [10, 13]. Bu MAPK'lerden en iyi bilinenleri, evrimsel olarak korunmuş olan ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) olarak adlandırılan ERK1 ve ERK2 serin-treonin kinazlardır. ERK1 ve ERK2'nin dahil olduğu MAPK sinyal yolağı, hücrel süreçlerin düzenlenmesindeki en önemli sinyal yolağıdır. MAPK sinyal yolağı, Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK1-ERK2 sinyal yolağı olarak da adlandırılmaktadır [10, 11]. Küçük GTP bağlayıcı protein Ras tarafından aktive edilen bu yolak, proteinleri fosforilleyerek aktive olmalarına yol açan MAPK kinaz (Raf), MAPK kinaz (MEK1/2) ve MAPK (ERK1/2) adlı üç ana kinaz proteininden oluşmaktadır [9, 12, 61]. MAPK sinyal yolağı çoğalma, farklılaşma, apoptoz, hücrel hareketler ve stres tepkileri başta olmak üzere çok çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır [10-12]. MAPK sinyal yolağına dahil olan proteinler ve bu proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri şematik olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4 MAPK sinyal yolağı [62]'den uyarlanmıştır

Bu mitojenle aktive olan protein kinazlar, başta meme kanseri olmak üzere çeşitli kanser türlerinde mutasyona uğramış haldedir veya anormal ekspresyon sergilemektedir. Bu anormal ekspresyon, kanserleşmenin meydana gelmesinde ve ilerlemesinde oldukça kritik bir role sahiptir. Meme kanseri tümörlerinde, sağlıklı hücrelere kıyasla oldukça

yüksek ERK ekspresyonu tespit edilmiştir. ERK proteininin ekspresyon seviyesi, hücrel gelişim için oldukça kritiktir [9, 12]. ERK protein ekspresyon seviyesinde mutasyonlar kaynaklı meydana gelecek değişimler, ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Bunun en güzel örneklerinden bir tanesi, aşırı ERK ekspresyonu, kanser gelişimi ve ilerlemesinde görev yapmaktadır [12, 63]. Bu iyi bilinen MAPK'lere ek olarak *MAPK6* geni tarafından sentezlenen ERK3 ve *MAPK4* geni tarafından sentezlenen ERK4 gibi atipik MAPK'ler de bulunmaktadır [10].

2.1.6.1 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 6 (MAPK6)

MAPK6 geni tarafından sentezlenen ve ERK3 olarak da adlandırılan MAPK6, atipik bir MAPK'lerden bir tanesidir [10, 64]. MAPK6 ilk olarak 1991 yılında tanımlanmıştır ancak hücrel işlevi ERK1 ve ERK2'ye kıyasla çok daha az karakterize edilebilmiştir [64, 65]. *MAPK6* geni, 6 eksondan oluşmaktadır ve 15. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. MAPK6 mRNA'sı ise, 4.186 bp'den oluşmaktadır [66]. Diğer iyi bilinen ve evrimsel olarak korunmuş MAPK'lerin aksine, bitkilerde ve omurgasızlarda MAPK6'nın ortologlarını kodlayan hiçbir gen henüz bulunamamıştır [67]. MAPK6 proteini, 721 amino asitten oluşmaktadır ve sitoplazma ve çekirdekte lokalizedir [66]. MAPK6, hücre farklılaşması ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır [67].

Gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, *MAPK6* gen ekspresyonunun meme kanseri ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde yukarı regüle edildiğini ortaya koymuştur [14, 15]. Ayrıca, bu yukarı regülasyonun, tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu artırdığı belirlenmiştir [15, 16]. Al-Mahdi ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir meme kanseri çalışması, p21 proteinle aktive olan kinazların (PAK), MAPK6 ile direkt olarak etkileştiğini ortaya koymuştur. PAK'ların, hücre adezyonunu ve migrasyonunu düzenlemede kritik bir rol oynamadığı bilinmektedir [68]. Dikkat çekici olarak, *MAPK6* geni, MCF-7 meme kanseri hücre hattında aşırı eksprese edilen genler arasında yer almaktadır [17].

2.2 RNA İnterferans (RNAi)

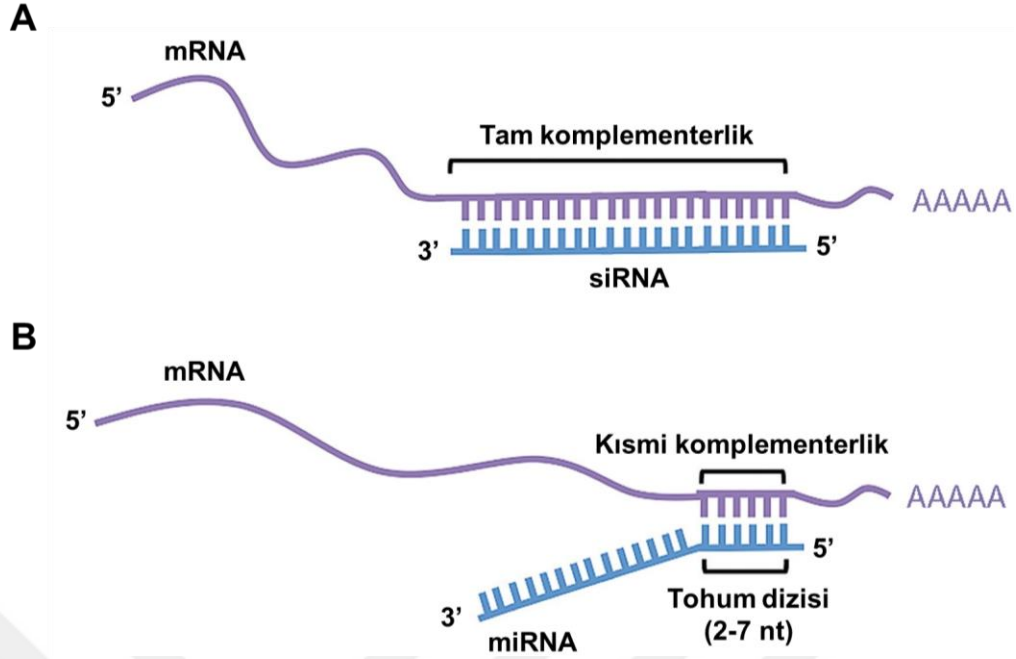
RNA interferans (RNAi) mekanizması, Fire ve Mello'nun, *Caenorhabditis elegans* model organizmasında gerçekleştirdiği eksojen RNA aracılı gen inhibisyon çalışması sonucunda tanımlanmıştır. Fire ve Mello, RNAi mekanizmasını tanımladıkları bu çalışma ile 2006 Nobel Tıp Ödülü'nü kazanmıştır [19, 69]. RNAi, hedeflenen bir genin ekspresyonunun tek veya çift zincirli küçük kodlamayan RNA (ssRNA-dsRNA) molekülleri tarafından

etkili bir şekilde baskılandığı bir biyolojik süreçtir [18, 19]. Küçük kodlamayan RNA molekülünün, dizisine karşılık gelen mRNA'yı seçici olarak hedeflemesiyle gerçekleşmektedir. Post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS) olarak da bilinmektedir [19, 70]. RNAi, hücrelerin sitoplazmasına gönderilen ssRNA'lar ve dsRNA'lar tarafından aktive edilmektedir. Bu biyolojik süreci düzenleyen anahtar RNAi substratları başlıca: MikroRNA'lar (miRNA), küçük mücadelecisi RNA'lar (small interfering RNA-siRNA) ve kısa saç tokası RNA'lardır (short hairpin RNA-shRNA). RNAi mekanizması aracılığıyla gerçekleştirilen terapötik araştırmalarda en öne çıkan RNAi substratı, sağladığı kolay dizayn ve düşük hedef dışı etki gibi avantajlar nedeniyle siRNA'dır [18, 19].

2.2.1 Küçük Mücadelecisi RNA (siRNA)

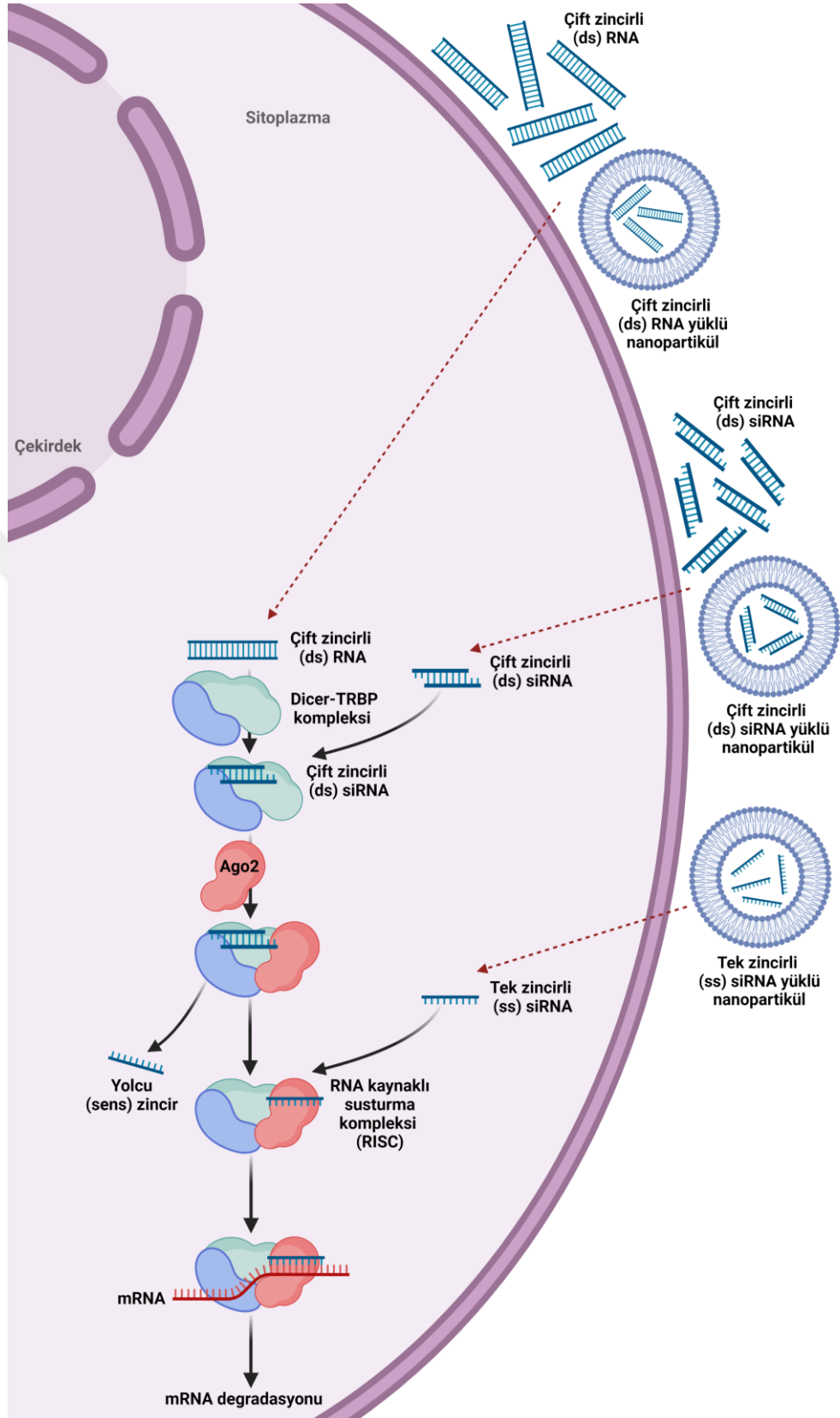
siRNA'lar ilk olarak 1999 yılında bitkilerde gen ekspresyonu inhibisyonunun araştırıldığı çalışmalar esnasında tanımlanmıştır [71]. siRNA'lar eksojen olarak sentezlenebildiği gibi, çeşitli organizmalarda endojen olarak da kodlanabilmektedir. Fire ve Mello tarafından RNAi mekanizması ortaya çıkarıldığından beri, siRNA'ların hedef genin ekspresyonu üzerine etkileri çeşitli *in vitro* çalışmalarda test edilmektedir. siRNA'lar eksojen olarak sentezlendikten sonra gönderildikleri hücre sitoplazmasında, doğal olarak yer alan miRNA biyogenez basamaklarını takip eder ve oldukça benzer hücresel işlemlerden geçer [72].

Kimyasal olarak sentezlenen kodlamayan RNA molekülü olan siRNA'lar genel olarak 21-25 bp uzunluğa sahiptir. Bu RNA molekülünün çift zincirli yapısı, 5' fosfat ucu ve 3' hidroksil ucuna sahiptir ve molekülünün 3' ucu iki nükleotitlik bir çıkıntı barındırmaktadır [18, 20]. Eksojenik siRNA'lar hedef ökaryotik hücrelerde etki mekanizması bakımından endojen miRNA'lara oldukça benzer bir prensipte çalışır. Ancak, miRNA'ların aksine siRNA'ların hedef mRNA'larına bağlanarak gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olabilmesi için tamamen bir komplementerlik gereklidir. Hedef gene ait mRNA molekülü ile bu geni hedefleyen miRNA molekülü ve bu gene spesifik dizayn edilen siRNA molekülü arasında oluşan etkileşimler, Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Bu sebeple "teorikte", siRNA'lar spesifik olarak tek bir genin ekspresyonunu baskılamalıdır. Her ne kadar teorikte beklenti böyle olsa da, siRNA molekülü yapı olarak kısa bir dizi olduğundan, çeşitli hedef-dışı etkilere neden olabilmektedir [21].



Şekil 2.5 A. mRNA-siRNA etkileşimi B. mRNA-miRNA etkileşimi [21]’den uyarlanmıştır

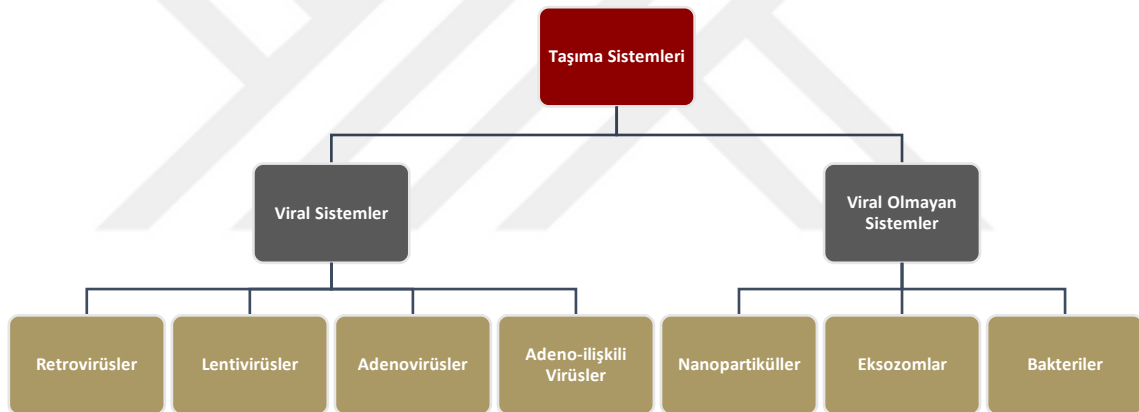
Dizayn edilen ve sentezlenen eksojen siRNA’lar öncül form olan dsRNA molekülü formunda, tek zincirli siRNA (ss-siRNA) molekülü formunda ya da çift zincirli siRNA (ds-siRNA) molekülü formunda çeşitli taşıma sistemleri aracılığıyla hedef hücrenin sitoplazmasına gönderilebilmektedir. siRNA’lar hücre sitoplazmasına yollandıkları forma bağlı olarak hedef hücrede biyogeneze dair işlemlere dahil olmaktadır. Çift zincirli RNA öncül formu, hedef hücre sitoplazmasında Dicer-TAR RNA bağlayıcı protein (TRBP) kompleksince işlenir ve sonucunda ds-siRNA yapısı oluşur. Oluşan bu ds-siRNA yapısı sens ve antisens zincirlerden oluşmaktadır ve 21-25 bp uzunluğundadır. Antisens zincir rehber zincir olarak da adlandırılmaktadır ve hedef genin mRNA dizisine komplementerdir. Sens zincir ise yolcu zincir olarak da adlandırılmaktadır ve hedef genin mRNA dizisine sahiptir. Bu ds-siRNA molekülü, bir sonraki aşamada RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) ile etkileşime girer ve bu etkileşim sonrası, RISC kompleksinin yapısında yer alan Argonaute2 (Ago2) proteini aracılığıyla sens zincir uzaklaştırılır. Bu aşamada eş zamanlı olarak, antisens zincir (ss-siRNA) RISC kompleksine yüklenir ve böylece aktif RISC kompleksi oluşur. Bu aktif RISC kompleksi, yapısında yer alan antisens zincir (ss-siRNA) aracılığıyla hedef mRNA’ya bağlanır ve mRNA’nın Ago2 proteini aracılığıyla degradasyonunu sağlar. Bunun sonucunda da hedef genin ekspresyonunun baskılanması sağlanır [18, 21, 73]. Tüm bu siRNA biyogenizi Şekil 2.6’da şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.6 siRNA biyogenezi [18]'den uyarlanmıştır

2.3 Taşıma Sistemler

In vitro ve *in vivo* çalışmalarla katedilen mesafelere rağmen, çok sayıda biyolojik bariyer siRNA molekülleri gibi terapötiklerin aktivitesini radikal biçimde azaltmakta ve hedef doku ve organlara ulaşmasını engellemektedir. *In vitro* çalışmalardaki aktivite kaybında ana etkenlerden bir tanesi, siRNA'ların negatif yüküdür. Hücre zarı da negatif yüklü olduğundan, negatif yüklü siRNA'lar zardan etkin bir biçimde geçiş sağlayamamaktadır. Bu nedenle, siRNA'ların terapötik uygulamasının önünde duran temel engellerin kaldırılması için gelişmiş taşıma sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [22, 23]. Taşıma sistemleri; viral ve viral olmayan taşıma sistemleri adı altında iki alt başlığa ayrılmaktadır. Viral sistemler, hedef organizmada neden oldukları çeşitli güvenlik endişeleri sebebiyle giderek kullanımdan düşmekte ve yerini başta nanopartiküller olmak üzere viral olmayan sistemlere kaptırmaktadır [24]. Viral ve viral olmayan sistemlerde yer alan terapötik madde taşıma araçları Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Viral ve viral olmayan taşıma sistemleri [18]'den uyarlanmıştır

2.3.1 Nanopartiküller

Viral olmayan taşıma sistemleri arasında en sık tercih edilen taşıma sistemi olan nanopartiküller, genel olarak 10-1000 nm boyutunda kimyasal olarak sentezlenen partiküllerdir [25]. Nanopartiküller, siRNA'lar başta olmak üzere çeşitli terapötik maddelerin hedef hücre veya dokulara verimli bir şekilde iletiminde büyük pay sahibidir. siRNA'ların *in vitro* ve *in vivo* uygulamalardaki verim ve stabilitesini artırma bakımından büyük bir potansiyel barındırır. Nanopartiküllerin siRNA başta olmak üzere çeşitli terapötiklerin iletiminde sık kullanılmasında sağladıkları çeşitli avantajlar rol oynamaktadır. Bu avantajlardan başlıcaları: Uygun küçük boyutları, yüksek taşıma kapasiteleri, ayarlanabilir şekilleri, spesifik hedeflemeyi mümkün kılmaları, düşük

toksositeye neden olmaları, düşük immünojenisiteye neden olmaları, yüksek biyouyumluluk sergilemeleri, kan-beyin bariyerini aşabilme yetenekleri ve suda çözünmeyen terapötikleri de taşıyabilmeleridir. Nanopartiküller, sentezlendikleri maddelere göre çok çeşitli alt gruplara ayrılabilirlerdir. Terapötik yaklaşımlarda en sık tercih edilen nanopartiküller ise; polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller ve inorganik nanopartiküllerdir [26, 27].

2.3.1.1 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, nanoilaç alanında çeşitli terapötik maddelerin hedef doku ve organlara taşınmasında sıklıkla tercih edilen taşıma stratejilerindendir [74]. Polimerik nanopartiküller, 1-1000 nm boyutlarında sentezlenen yapılardır [75]. Biyobozunur veya biyobozunmaz yapıda olan doğal, yarı-doğal ve sentetik maddeler kullanılarak sentezlenmektedir [76]. Öncelikle, polistiren ve poliakrilamid gibi biyobozunmaz malzemeler kullanılarak sentezlenen polimerik nanopartiküllerin aday taşıma sistemi olarak kullanımı denenmiştir. Ancak bu polimerik nanopartiküllerin uygulanması durumunda yüksek toksisite ve immün yanıt gözlenmiştir. Bu gözlemler sonrası, poli(D,l-laktit) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur malzemeler kullanılarak sentezlenen polimerik nanopartiküller taşıma sistemi olarak kullanılmaya başlanmıştır [77, 78]. Polimerik nanopartiküller, RNAi terapötikleri ve kemoterapötikler gibi çeşitli terapötik ajanların taşınmasında sıklıkla tercih edilmektedir [18, 78]. Bu tercihte en önemli faktör, farklı boyut, yapı ve polaritedeki terapötik maddelerin çeşitli şekillerde polimerik nanopartiküle yüklenebilmesi ve böylece etkin bir şekilde hedef doku ve organlara taşınabilmesidir [18]. Gerçekleştirilen çalışmalar, siRNA yüklü polimerik nanopartiküllerin yüksek terapötik etkinlik ve kontrollü salım sergilediğini ortaya koymuştur [79]. Genel olarak polimerik nanopartiküllerin sağladıkları avantajlar şunlardır: Kontrollü etken madde salımı, dış tehditlere karşı erken maddelere etkili koruma sağlama, biyoparçalanabilirlik ve biyobozunurluktur [75].

• Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Nanopartikülleri

Polimerik nanopartiküller, siRNA'ların hedef dokulara iletimi esnasında en sık kullanılan taşıma sistemlerinden bir tanesidir. Polimerik nanopartiküllerin üretiminde en sık tercih edilen polimerlerden bir tanesi PLGA'dır. PLGA, klinik etkileri oldukça üst düzeyde test edilmiş ve net olarak ortaya konulmuş, FDA ve EMA tarafından onaylanmış bir kopolimerdir [28]. PLGA, nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler arasında

en biyouyumlu olanıdır. Bu nedenle, PLGA nanopartikülleri, ilaç taşıma sistemi olarak oldukça yüksek biyouyumluluk sergilemektedir. PLGA'nın parçalanması ile ortaya çıkan ürünler Krebs döngüsü ile işlenerek vücuttan atılabilen ve dolayısıyla toksisiteye neden olmayan H₂O ve CO₂ ürünlerine ayrılmaktadır [29]. PLGA nanopartiküllerinin kontrollü ve sürekli terapötik madde salım özelliği, düşük toksisitesi, biyoyararlanımı artıran çözücü gücü, oldukça küçük boyutu ve yüksek biyouyumluluğu gibi faydalı özellikleri dikkate alınarak ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı FDA tarafından onay almıştır. Tüm bu olumlu özelliklere ek olarak, PLGA nanopartikülleri muadil taşıma sistemlerine kıyasla daha kolay ve daha yüksek miktarda üretilebilmektedir. Bu durum da zaman ve iş gücü açısından deneysel çalışmalarda büyük bir avantaj sağlamaktadır [28, 29].



3.1 Materyal

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

- -80°C Dondurucu - Thermo Fisher Scientific
- Akış Sitometrisi - MUSE Cell Analyzer
- Bilgisayar - Apple Macbook Pro
- Buzdolabı - Arçelik
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Elektroforez Güç Kaynağı - Consort EV265
- FT-IR Spektrometresi– Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10
- Gerçek Zamanlı PCR Cihazı- Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR
- Hassas Terazı - Shimadzu
- Invert Mikroskop - ZEISS Primo Vert
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı - Isolab
- Jel Elektroforez Tankı – Major Science ME10-7 Midi plus-1
- Karbondioksit İnkübatörü - NÜVE EC 160
- Liyofilizatör - Telstar Cryodos
- Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini - NÜVE MN 120 Class II
- Mikro Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Microfuge 20R
- Mikropipet 0,2 - 2 µL - Gilson Pipetman P2G
- Mikropipet 1 - 10 µL - Gilson Pipetman P10G
- Mikropipet 2 - 20 µL - Gilson Pipetman P20G
- Mikropipet 10 - 100 µL - Gilson Pipetman P100G
- Mikropipet 20 - 200 µL - Gilson Pipetman P200G
- Mikropipet 100 - 1000 µL - Gilson Pipetman P1000G
- Mikroplaka Spektrofotometre – Thermo Fisher Scientific Multiskan GO
- Otoklav - Hermle
- pH Metre - Hanna

- Saf Su Cihazı – Sartorius
- Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Allegra X-22R
- Sıvı Azot Tankı - International Cryogenics, Inc. 20R
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Su Banyosu – Nüve NB 9
- Termal Döngü – Bio-Rad T100 Thermal Cycler
- Ultraviyole-Görünür Işık (UV-Vis) Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- UV Görüntüleme Sistemi - FUSION FX7
- Vorteks - Velp Scientifica
- Zetasizer – Malvern ZEN 3600 Nano ZS

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler

- 3-4,5-Dimetil-Tiyazolil-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) - Thermo Fisher Scientific Invitrogen
- AEC Substrate Kit - Thermo Fisher Scientific Invitrogen
- Agaroz – Sigma-Aldrich
- cDNA Sentez Kiti - New England Biolabs ProtoScript
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) – Thermo Fisher Scientific Gibco
- DNA Marker – Abm 100bp Opti-DNA Marker
- Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (DPBS) – Thermo Fisher Scientific Gibco
- DMEM/F12 Besiyeri – Thermo Fisher Scientific Gibco
- Etil Alkol – Merck
- Fetal Sığır Serum (FBS) – Thermo Fisher Scientific Gibco
- Histostain Plus Kit - Thermo Fisher Scientific Invitrogen
- İnsan MAPK6 ELISA Kiti – BT LAB
- Kristal Viyole Toz - Merck
- MAPK6 siRNA – Qiagen FlexiTube
- Mayer's Hematoksilen – HistoPlus
- Mounting Solution - Thermo Fisher Scientific Histomount
- Muse Annexin V & Dead Cell Kit – Luminex
- Paraformaldehit – Sigma-Aldrich
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma-Aldrich
- Polivinil Alkol – Sigma-Aldrich

- Primocin – Invivogen
- Pürifiye anti-human/mouse/rat PCNA Antikoru - Biolegend
- qPCR Master Mix – New England Biolabs Luna
- Scrambled (Negatif Kontrol) siRNA – Qiagen FlexiTube
- Sodyum Hidroksit Peleti - Sigma-Aldrich
- Tripan Mavisi – Sigma-Aldrich
- Tripsin-EDTA – Thermo Fisher Scientific Gibco
- Total RNA İzolasyon Kiti – New England Biolabs Monarch

3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- 25 cc'lik Flask – Nest
- 75 cc'lik Flask – Nest
- 6 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası – Isolab
- 12 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası – Isolab
- 24 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası – Isolab
- 96 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası – Isolab
- 96 Kuyulu 0,1 mL PCR Plakası – Isolab
- 1,5 mL Santrifüj Tüpü – Isolab
- 2 mL Santrifüj Tüpü – Isolab
- 15 mL Santrifüj Tüpü – Isolab
- 50 mL Santrifüj Tüpü – Isolab
- 5 ml Serolojik Pipet – Isolab
- 10 ml Serolojik Pipet – Isolab
- Alüminyum Folyo - Koroplast
- Beher – Isolab
- Cryo Tüp – Nest
- Filtre Kağıdı - Isolab
- Hücre Kazıyıcı – Corning
- Lam – Isolab
- Parafilm - Bemis
- PCR Tüpü – Isolab
- Steril Pipet Ucu (10-100-200-1000 µl) – Gilson
- Steril. Filtreli Pipet Ucu (100-200 µl) – Isolab

- Steril 5 mL Şırınga – Isolab
- Steril Şişe – Isolab
- Thoma Lamı – Isolab
- Yapışkan PCR Plaka Filmi – Isolab
- Yuvarlak Lamel – Marienfeld

3.1.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.4.1 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **%3 Polivinil Alkol (PVA) Çözeltisi:** 3 g PVA hassas tartıda tartılmış ve steril şişeye konulmuştur. Ardından 100 mL distile su eklenmiş ve şişe manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Manyetik balık yardımıyla, çözelti 70°C’de homojen hale gelene dek karıştırılmıştır. Son olarak, %3 PVA çözeltisi filtre kağıdı kullanılarak filtrelenmiştir.
- **%0,1 PVA Çözeltisi:** 100 mg PVA hassas tartıda tartılmış ve steril şişeye konulmuştur. Ardından 100 mL distile su eklenmiş ve şişe manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Manyetik balık yardımıyla, çözelti 70°C’de homojen hale gelene dek karıştırılmıştır. Son olarak, %0,1 PVA çözeltisi filtre kağıdı kullanılarak filtrelenmiştir.

3.1.4.2 Hücre Kültürü Uygulamalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Tamamlanmış Besiyerin Hazırlanması:** Ticari olarak satın alınan DMEM/F-12 besiyeri 1:1 oranında DMEM ve Ham’s F-12’nin karışımından oluşmaktadır ve fenol kırmızısı ve L-Glutamin içermektedir. Bu besiyerin içerisine son hacimde %0,2 olacak şekilde Primocin ve son hacimde %10 olacak şekilde fetal sığır serumu (FBS) eklenerek tamamlanmış besiyer hazırlanmıştır ve çalışma boyunca 4°C’de saklanmıştır.
- **Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması:** Hücre dondurma solüsyonu %80 tamamlanmış besiyer, %10 FBS ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerecek biçimde hazırlanmıştır ve çalışma boyunca -20°C’de saklanmıştır.

3.1.4.3 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Öncelikle, 5 mg MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tartılmış ve steril şişeye konulmuştur. Ardından, 10 mL steril fosfat tamponlu salin (PBS) eklenerek MTT tamamen çözölmüştür. Son olarak, hazırlanan MTT solüsyonu 0,45 µm gözenek boyutlu PVDF filtresi kullanılarak filtrelenmiştir ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.4.4 Enzime Bağlı İmmünoSorbent Analiz (ELISA) Belirteçlerinin Hazırlanması

- **Standartların Hazırlanması:** 64 ng/mL stok standart kullanılarak standart seyreltici ile seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 0,5-1-2-4-8-16-32-64 ng/mL konsantrasyonlarda standart solüsyonlar elde edilmiştir. Standart solüsyonlar, hazırlandıkları gün içerisinde kullanılmıştır.
- **1X Wash Buffer Hazırlanması:** Steril bir şişeye 20 mL 25X Wash Buffer eklenmiştir. Üzerine 480 mL distile su eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. 1X Wash Buffer, hazırlandığı gün içerisinde kullanılmıştır.

3.1.4.5 İmmünositokimyasal Prolifere Hücre Nükleer Antijen (PCNA) Boyamasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Anti-insan PCNA Antikorumun Dilüe Edilmesi:** 8910 µL distile su steril bir santrifüj tüpüne eklenmiştir. Üzerine 90 µL anti-insan PCNA antikoru (100 µg) eklenerek karıştırılmıştır ve çalışma boyunca 4°C’de muhafaza edilmiştir.
- **Kromojenin Hazırlanması:** Invitrogen AEC Substrate Kit kullanılmıştır. Steril 1,5 mL santrifüj tüpü içerisine 2 damla 20X Substrate Buffer, 3 damla 20X Chromogen Solution ve 2 damla 20X Hydrogen Peroxide Solution eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan kromojen karanlıkta tutulmuş ve hazırlandıktan itibaren 30 dakika içerisinde kullanılmıştır.

3.1.4.6 %0,5 a/h Kristal Viyole Çözeltisinin Hazırlanması

İlk olarak, 0,5 gram kristal viyole tozu hassas tartıda tartılmış ve steril bir şişeye konulmuştur. Ardından, üzerine 80 mL distile su eklenmiştir. Kristal viyole, distile su içerisinde çözüldükten sonra 20 mL saf metanol eklenerek solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon karanlık ortamda, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.4.7 Fiksatif %4 Paraformaldehit (PFA) Çözeltisinin Hazırlanması

Öncelikle, 4 gram paraformaldehit hassas tartıda tartılmış ve steril bir şişeye konulmuştur. Ardından üzerine 100 mL steril PBS eklenmiştir. Manyetik balık yardımıyla, çözelti 60°C’de karıştırılmış ve içerisine 2 adet NaOH peleti eklenerek homojen bir çözelti elde edilmiştir. %4 PFA çözeltisi -20°C’de saklanmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 siRNA Moleküllerinin Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması

Liyofilize haldeki MAPK6 siRNA molekülü ve *scrambled* (negatif kontrol) siRNA molekülü 1 mL DNaz/RNaz içermeyen su ile çözülerek 20 nmol/mL stok siRNA çözeltileri elde edilmiştir. Stok çözeltilerin 1/10 dilüsyonu yapılarak 2 nmol/mL siRNA çözeltileri elde edilmiştir. Çözeltilerin λ_{max} değerleri spektrofotometre ile ayrı ayrı ölçülerek 259 nm olarak belirlenmiştir. Ardından bu çözeltilerin seri dilüsyonu gerçekleştirilmiş ve 2 nmol/mL – 0,125 nmol/mL çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen bu çözeltilerin 259 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri kullanılarak MAPK6 siRNA molekülünün ve *scrambled* siRNA molekülünün kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

3.2.2 İkili Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

Liyofilize siRNA molekülleri suda çözündüğünden bu çalışmada ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA nanopartiküllerinin sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 MAPK6 siRNA yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

30 mg PLGA molekülü hassas tartıda tartılmıştır ve 0,5 mL organik çözücü diklorometan içerisine eklenerek çözülmüştür. DNaz/RNaz içermeyen su ile çözülmüş 20 nmol/mL MAPK6 siRNA stoğundan ise 100 μ L (2 nmol) alınmıştır. Ardından bu iki çözelti birleştirilmiş ve pipetaj yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Organik iç fazı oluşturmak için elde edilen bu karışım, 4 mL %3 PVA çözeltisi içerisine steril şırınga yardımıyla 45 Watt güçte 90 saniye boyunca sonikasyon işlemi yapılarak buz banyosunda eklenmiştir. Ardından, 35 mL %0,1 PVA çözeltisi içeren steril beher manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur ve sonikasyon işlemi sonrası oluşan karışım, dış fazı oluşturmak için steril şırınga yardımıyla bu çözeltinin üzerine eklenmiştir. Oluşan karışım, MAPK6 siRNA molekülü ile PLGA molekülünün tamamen karışması ve içerisinde yer alan organik çözücülerin ortamdan uzaklaştırılması için manyetik karıştırıcıda, 800 rpm'de 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından, boyut ölçümü ve zeta analizi için karışımdan 50 μ L örnek, santrifüj tüpüne ayrılmıştır. Daha sonra, sentezlenen nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla karışım 10000 xg'de 40 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu çöktürme işlemi sonrası oluşan süpernatant, enkapsülasyon etkinliğinin indirekt olarak belirlenmesinde kullanılacağından steril bir behere

aktarılmıştır. Pelet ise 35 mL distile su ile süspanse edilmiştir ve 10000 xg'de 30 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir ve her santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernant, çöktürme işlemi sonrası oluşan süpernatantın bulunduğu behere eklenmiştir. Yıkama işlemi sonrası, elde edilen nanopartikül peleti 10 mL distile su ile süspanse edilmiştir. Ardından, -80°C'de kısa sürede dondurulmuş ve kurutulmak üzere liyofilizatörde 24 saat bekletilmiştir. Elde edilen liyofilize MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, çalışma boyunca -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2.2 Scrambled (Negatif Kontrol) siRNA yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

30 mg PLGA molekülü hassas tartıda tartılmıştır ve 0,5 mL organik çözücü diklorometan içerisine eklenerek çözülmüştür. DNaz/RNaz içermeyen su ile çözülmüş 20 nmol/mL *scrambled* siRNA stoğundan ise 100 µL (2nmol) alınmıştır. Ardından bu iki çözelti birleştirilmiş ve pipetaj yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Organik iç fazı oluşturmak için elde edilen bu karışım, 4 mL %3 PVA çözeltisi içerisine steril şırınga yardımıyla 45 Watt güçte 90 saniye boyunca sonikasyon işlemi yapılarak buz banyosunda eklenmiştir. Ardından, 35 mL %0,1 PVA çözeltisi içeren steril beher manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur ve sonikasyon işlemi sonrası oluşan karışım, dış fazı oluşturmak için steril şırınga yardımıyla bu çözeltinin üzerine eklenmiştir. Oluşan karışım, *scrambled* siRNA molekülü ile PLGA molekülünün tamamen karışması ve içerisinde yer alan organik çözücülerin ortamdan uzaklaştırılması için manyetik karıştırıcıda, 800 rpm'de 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından, boyut ölçümü ve zeta analizi için karışımdan 50 µL örnek, santrifüj tüpüne ayrılmıştır. Daha sonra, sentezlenen nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla karışım 10000 xg'de 40 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu çöktürme işlemi sonrası oluşan süpernatant, enkapsülasyon etkinliğinin indirekt olarak belirlenmesinde kullanılacağından steril bir behere aktarılmıştır. Pelet ise 35 mL distile su ile süspanse edilmiştir ve 10000 xg'de 30 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir ve her santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernant, çöktürme işlemi sonrası oluşan süpernatantın bulunduğu behere eklenmiştir. Yıkama işlemi sonrası, elde edilen nanopartikül peleti 10 mL distile su ile süspanse edilmiştir. Ardından, -80°C'de kısa sürede dondurulmuş ve kurutulmak üzere liyofilizatörde 24 saat bekletilmiştir. Elde edilen liyofilize *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, çalışma boyunca -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2.3 Boş PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

30 mg PLGA molekülü hassas tartıda tartılmıştır ve 0,5 mL organik çözücü diklorometan içerisine eklenerek çözülmüştür. Organik iç fazı oluşturmak için bu çözelti, 4 mL %3 PVA çözeltisi içerisine steril şırınga yardımıyla 45 Watt güçte 90 saniye boyunca sonikasyon işlemi yapılarak buz banyosunda eklenmiştir. Ardından, 35 mL %0,1 PVA çözeltisi içeren steril beher manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur ve sonikasyon işlemi sonrası oluşan karışım, dış fazı oluşturmak için steril şırınga yardımıyla bu çözeltinin üzerine eklenmiştir. Oluşan karışım, içerisinde yer alan organik çözücülerin ortamdan uzaklaştırılması için manyetik karıştırıcıda, 800 rpm'de 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından, boyut ölçümü ve zeta analizi için 50 µL örnek, santrifüj tüpüne ayrılmıştır. Daha sonra, sentezlenen boş nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla karışım 10000 xg'de 40 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu çöktürme işlemi sonrası, oluşan pelet 35 mL distile su ile süspanse edilmiştir ve 10000 xg'de 30 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrası, elde edilen nanopartikül peleti 10 mL distile su ile süspanse edilmiştir. Ardından, -80°C'de kısa sürede dondurulmuş ve kurutulmak üzere liyofilizatörde 24 saat bekletilmiştir. Elde edilen liyofilize boş PLGA nanopartikülleri, çalışma boyunca -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3 siRNA Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen liyofilize PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu için çeşitli hesaplamalar ve analizler gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi çeşitli eşitlikler kullanılarak her sentez için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Nanopartiküllerin boyutu, dağılımları ve zeta potansiyelleri Zetasizer cihazı ile analiz edilmiştir. Ardından, nanopartiküllerin yapısı, şekli ve boyutu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyinde yer alan fonksiyonel grupların analizi ise Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise, nanopartiküllerin *in vitro* salımları belirlenmiştir.

3.2.3.1 Enkapsülasyon Etkinliği

Sentezde PLGA nanopartiküllerince enkapsüle edilen siRNA moleküllerinin miktarı, çöktürme ve yıkama aşamalarında gerçekleştirilen santrifüj işlemleri sonrası toplanan süpernatantlar kullanılarak indirekt olarak belirlenmiştir. Süpernatantların 259 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri spektrofotometre aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Ardından, MAPK6 ve *scrambled* siRNA moleküllerinin oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak süpernatantta bulunan, nanopartiküllerce enkapsüle edilememiş siRNA moleküllerinin miktarı hesaplanmıştır. Hesaplanan bu miktar, sentez esnasında kullanılan siRNA miktarından çıkarılarak enkapsüle edilen miktar belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (EE), aşağıda yer alan eşitlik (3.1) aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\%EE = \frac{\text{Nanopartikül içerisine yüklenen siRNA miktarı (mg)}}{\text{Sentezde kullanılan toplam siRNA miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.2 Reaksiyon Verimi

Sentez sonucu liyofilize halde elde edilen PLGA nanopartiküllerinin ağırlıkları hassas tartı ile ölçülmüştür. Gerçekleştirilen sentez reaksiyonunun verimi, elde edilen liyofilize nanopartikül miktarının, sentez işlemi esnasında kullanılan PLGA ve etken madde miktarına oranlanması ile belirlenmiştir. Reaksiyon verimi (RY), aşağıda yer alan eşitlik (3.2) aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\%RY = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta kullanılan PLGA + siRNA miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.3 İlaç Yükleme Kapasitesi

İlaç yükleme kapasitesi, indirekt olarak hesaplanan enkapsüle siRNA moleküllerinin miktarının, liyofilize halde elde edilen PLGA nanopartiküllerinin miktarına oranlanması ile belirlenmiştir. İlaç yükleme kapasitesi (DL), aşağıda yer alan eşitlik (3.3) aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\%DL = \frac{\text{Nanopartikül içerisine yüklenen siRNA miktarı (mg)}}{\text{Üretilen liyofilize nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.3.4 Boyut, Dağılım ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin ortalama boyutu (Z-average) ve çoklu dağılım indeksi (Pdi) Zetasizer Nano ZS cihazı aracılığıyla dinamik ışık saçılım metoduyla analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ise faz analiz ışık saçılım metoduyla analiz edilmiştir. Tüm bu analizler, 25°C’de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ hassasiyet ile 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.3.5 SEM Analizi

PLGA nanopartikülleri, öncelikle yüksek vakum kullanılarak Altın-Paladyum ile kaplanmıştır. Ardından, bu nanopartiküllerin morfolojisi, şekli ve boyutu Carl-Zeiss EVO

LS10 taramalı elektron mikroskobu aracılığıyla 10 kV'da 20000X ve 60000X büyütme sonrası analiz edilmiş ve görüntülenmiştir.

3.2.3.6 AFM Analizi

PLGA nanopartiküllerinin üç boyutlu yapısı, şekli ve boyutu SHIMADZU SPM-9500J3 atomik kuvvet mikroskobu aracılığıyla, dinamik modda analiz edilmiş ve 1 x 1 µm alanda görüntülenmiştir.

3.2.3.7 FTIR Analizi

PLGA nanopartiküllerinin yüzey yapısında yer alan fonksiyonel gruplar, Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı aracılığıyla Zayıflatılmış Toplam Yansıma (ATR) ataçmanı kullanılarak analiz edilmiştir. FTIR analizleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.8 In Vitro Salım Deneyi

Sentezlenen ve diğer parametrelerce kullanıma uygun bulunan MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülünden ve *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülünden 2 mg hassas tartıda tartılmıştır. Bu liyofilize nanopartiküller 2 mL PBS tamponunda süspanse edilmiştir. Ardından, tüpler çalkalayıcıya konularak 37°C sıcaklıkta 200 rpm'de yatay olarak çalkalamaya bırakılmıştır ve 65 gün boyunca takip edilmiştir. İlk hafta her gün olmak üzere, örnekler düzenli olarak belirli aralıklarla 10000 xg'de 20 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası, süpernatantlar steril 1,5 mL santrifüj tüplerinde toplanmış ve peletin üzerine steril PBS eklenmiştir. Toplanan süpernatantların 259 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri UV-Vis spektrofotometre aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri ve oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak *in vitro* olarak salınan MAPK6 siRNA ve *scrambled* siRNA miktarı hesaplanmıştır.

3.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında ATCC'den ticari olarak satın alınmış olan 7.pasaj MCF-7 (HTB-22) meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır.

3.2.4.1 MCF-7 Hücre Hattının Açılması

İlk olarak, dikey laminar hava akışlı steril hücre kültürü kabini içinde T25 Flask içerisine 3 mL tamamlanmış besiyer eklenmiştir ve hücre açılma aşamasına dek flask 10-15 dk 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından, *cryo* tüplerinde dondurulmuş MCF-7 hücreleri sıvı azot tankından çıkarılmış ve önceden 37°C'ye

hazırlanmış su banyosunda çözündürülmüştür. Çözünmüş hücrelere, içerisinde yer alan hücre dondurma solüsyonuyla eşit hacimde (~1 mL) tamamlanmış besiyer eklenerek hafifçe pipetaj yardımıyla karıştırılmış ve homojen hale geldikten sonra 3 mL tamamlanmış besiyer içeren T25 flaska eklenmiştir. Hücre ekilen flask, 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunma durumu, morfolojisi ve yoğunluğu invert mikroskop aracılığıyla takip edilmiştir.

3.2.4.2 MCF-7 Hücre Hattının Pasajlanması

Invert mikroskop ile düzenli olarak takip edilen hücreler, flaskta %90 civarında hücre doluluk oranına ulaştığında hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, flask içerisinde bulunan besiyer yavaşça uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Böylece, tutunmamış ölü hücreler, hücresel atıklar ve besiyer kalıntısı flasktan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 1X Tripsin-EDTA (%0,25) eklenmiş ve hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 dk inkübe edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir. Yüzeyden ayrılmış halde hücrelerin üzerine eklenen Tripsin-EDTA miktarı kadar tamamlanmış besiyer eklenerek Tripsin enziminin inaktivasyonu sağlanmış ve hücreler 15 mL santrifüj tüpüne alınmıştır. Daha sonra, hücreler 300 xg'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası, süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve hücre peleti üzerine tamamlanmış besiyer eklenerek nazikçe pipetaj yapılmıştır. Ardından, hücreler pasaj işlemi öncesi hazırlanan ve yeterli miktarda tamamlanmış besiyer içeren yeni T75 flasklara eşit miktarda ekilmiştir.

3.2.4.3 MCF-7 Hücrelerinin Canlılığının Tripan Mavisi ile Kontrolü

Hücrelerin pasajlanması esnasında, hücrelerin canlılık durumunun gözden geçirilmesi adına tripan mavisi kullanılarak intakt hücre zar yapısına sahip olmayan ölü hücreler boyanmıştır. Tamamlanmış besiyerde süspanse edilen hücrelerden 20 µL alınmış ve steril 1,5 mL santrifüj tüpüne eklenmiştir. Üzerine eşit hacimde tripan mavisi eklenmiş ve pipetaj ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 10 µL alınarak Thoma lamına transfer edilmiştir. Invert mikroskopta, lamın 4 farklı bölgesinde yer alan hücreler sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Toplam canlı hücre sayısı aşağıda yer alan eşitlik (3.4) aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre Sayısı} = \frac{\text{Sayılan Canlı Hücre Sayısı}}{4} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4 \quad (3.4)$$

3.2.4.4 MCF-7 Hücre Hattının Dondurulması

Hücrelerin pasajlanması esnasında, hücrelerin bir kısmı sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere dondurularak sıvı azot tankında saklanmıştır. Pasaj esnasında, tripsinizasyon sonrası tamamlanmış besiyerde süspanse edilmiş hücrelerden yeterli miktarda alınarak *cryo* tüpe konulmuş ve üzerine 1 mL hücre dondurma solüsyonu eklenerek nazikçe pipetaj yapılmıştır. Ardından *cryo* tüp öncelikle 4°C’de 30 dakika, -20°C’de 1 saat, -80°C’de 1 gün inkübe edildikten sonra, sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.5 MTT Testi ile Sitotoksite Analizi

Çalışmada, 24 ve 48 saat muamele grupları için ikişer adet 96 kuyulu hücre kültürü plakası kullanılmıştır. 96 kuyulu plakalara her kuyuda 10000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri ve boş PLGA nanopartikülleri 2-5-10-20-30-40-50-60-70-80-90 µg/mL konsantrasyonlarda 4 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yine 4 tekrarlı olarak yalnızca tamamlanmış besiyer uygulanmıştır. Uygulama sonrası plakalar, muamele süresine göre 24 ve 48 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası, kuyuların üzerine 10 µL MTT solüsyonu eklenmiştir ve plakalar 37°C sıcaklıkta 3 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası, kuyularda bulunan tamamlanmış besiyer-MTT solüsyonu karışımı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Hemen ardından, testin son ürünü olarak oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için kuyulara 100 µL DMSO eklenmiştir ve plakalar 37°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyonun hemen ardından, Multiskan Go mikroparka spektrofotometre cihazı kullanılarak kuyuların absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Deney tüm örnekler için 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney sonrası kuyulardaki hücre canlılık oranı aşağıda yer alan eşitlik (3.5) aracılığıyla hesaplanmıştır. Hücre canlılık oranlarının hesaplanması sonrasında, IC₄₀ değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Deney Grubu } OD_{570}}{\text{Kontrol Grubu } OD_{570}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.6 MAPK6 Gen Ekspresyon Analizi

3.2.6.1 Primer Sentezi

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (RT-PCR) kullanılacak ilgili gen *MAPK6* ve referans gen *GAPDH* için *forward* ve *reverse* primerler Primer3Plus yazılım

programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerlere dair bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir. Tasarlanan primerlerin özgüllüğü, referans diziler içeren UCSC *In-Silico* PCR yazılım programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Ek olarak, ticari olarak alınan sentezlenmiş primerler, sağlıklı insan kanından izole total RNA kullanılarak sentezlenmiş komplementer DNA (cDNA) örneği ile, gradient sıcaklık aralığı 56-66°C olacak şekilde konvansiyonel PCR ile denenmiştir. PCR ürünü, %2’lik agaroz jelde 1X TAE tamponu içerisinde 120 volt, 150 mA kondisyonunda 40 dakika yürütülmüştür.

Tablo 3.1 Dizayn edilen primerler hakkında bilgiler

Primer	Primer Dizisi (5’-3’)	Uzunluk (bp)	GC İçeriği (%)	Erime Sıcaklığı (°C)
MAPK6 Forward Primer	TTTGCTGAAATGCTGACTGG	20	%45	60°C
MAPK6 Reverse Primer	ATCCATGGGGCTAAATGTCA	20	%45	60,2°C
GAPDH Forward Primer	CTGGGCTACACTGAGCACC	19	%63	66°C
GAPDH Reverse Primer	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	21	%52	65°C

3.2.6.2 Hücre Kültüründe Etken Madde Uygulanması

Çalışmada, 24, 48 ve 72 saat muamele grupları için üçer adet 6 kuyulu hücre kültürü plakası kullanılmıştır. 6 kuyulu plakalara her kuyuda 300000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA nanopartikülleri ve çıplak MAPK6 siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası plakalar, muamele süresine göre 24, 48 ve 72 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kuyularda bulunan besiyerler tamamen uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası, kuyulara PBS eklenmiş ve hücreler hücre kazıyıcı ile tamamen kazınarak 1,5 mL santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3.2.6.3 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyon işlemi Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, hücreler 500 xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pelet 600 µL *RNA Lysis Buffer* ile süspanse edilmiştir. Ardından, *gDNA Removal Column*'a aktarılmış ve 16000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. *gDNA Removal Column* uzaklaştırılmış ve *flow-through* üzerine eşit hacimde saf etanol eklenerek pipetaj yapılmıştır. Oluşan karışım *RNA Purification Column*'a aktarılmış ve aktarılmış ve 16000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. *Flow-through* uzaklaştırılmıştır ve kolona 500 µL *RNA Priming Buffer* eklenerek 16000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. *Flow-through* uzaklaştırılmıştır ve kolona 500 µL *RNA Wash Buffer* eklenerek 16000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. *Flow-through* tekrardan uzaklaştırılmıştır ve kolona 500 µL *RNA Wash Buffer* eklenerek 16000 xg'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Kolon, steril 1,5 mL santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve üzerine 50 µL nükleaz içermeyen su eklenerek 16000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Elde edilen izole RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu ölçülmüştür ve kısa süreli saklama için -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.6.4 cDNA Sentezi

Öncelikle, tüm izole RNA örneklerinin, konsantrasyon 500 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen su kullanılarak dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Dilüe total RNA örneklerinin cDNA sentezleri, ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB #E6300) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle RNA denatürasyonu için steril PCR tüpleri içerisine; 1 µL dilüe RNA örneği (500 ng), 2 µL *d(T)₂₃VN* (50 µM) ve 5 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Tüp kısa süreli vorteksenerek karıştırılmış ve PCR cihazına konularak 70°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu esnada, steril PCR tüpleri içerisine 10 µL *M-MuLV Reaction Mix* ve 2 µL *M-MuLV Enzyme Mix* eklenmiş ve pipetaj ile karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrası, hazırlanan bu 12 µL hacimli karışım denatüre edilmiş RNA örneklerini içeren tüpün üzerine aktararak hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım pipetaj ile karıştırıldıktan sonra tüpler cDNA sentez reaksiyonunun gerçekleşmesi için Termal döngü cihazına konularak 42°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, enzimlerin inaktivasyonu için tüpler Termal döngü cihazında 80°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.6.5 RT-PCR

İlk olarak, kontrol örneklerinin cDNA'larının bir kısmı 1/5, 1/10 ve 1/25 şeklinde nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek denenmiştir. Deneme reaksiyonu sonrası, 1/10 dilüsyon ile çalışılması uygun görülmüş ve tüm cDNA örneklerinin 1/10 dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ticari olarak satın alınan liyofilize *MAPK6* ve *GAPDH* primerleri gerekli hacimde nükleaz içermeyen su eklenilerek süspanse edilmiş ve 100 µM primer stok solüsyonu elde edilmiştir. Elde edilen 100 µM stok primerlerin 1/10 dilüsyon işlemi nükleaz içermeyen su ile gerçekleştirilerek 10 µM çalışma solüsyonu elde edilmiştir. RT-PCR, Luna Universal qPCR Master Mix (NEB #M3003) kullanılarak 96 kuyulu PCR plakasında her örnek 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen reaksiyonun bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarı Tablo 3.2'de, kondisyonları ise Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.2 RT-PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Luna Universal qPCR Master Mix	10 µL
Forward Primer (10 µM)	0,5 µL
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µL
cDNA (1/10 Dilüe)	1 µL
Nükleaz İçermeyen Su	8 µL

Tablo 3.3 RT-PCR kondisyonları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	60 saniye	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Uzama	60°C	30 saniye	
Erime Eğrisi	60-95°C	-	1

RT-PCR işlemi sonrası elde edilen Ct değerlerinin analizi delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Analizin ardından, rölatif *MAPK6* gen ekspresyon değerleri elde edilmiştir. Elde edilen rölatif gen ekspresyon değerleri, tedavi uygulanmamış grubun rölatif gen ekspresyon değerleri %100 varsayılarak yüzdesel olarak hesaplanmıştır.

3.2.7 MAPK6 Protein Ekspresyon Analizi

3.2.7.1 Hücre Kültüründe Etken Madde Uygulanması

Çalışmada, 24, 48 ve 72 saat muamele grupları için üçer adet 6 kuyulu hücre kültürü plakası kullanılmıştır. 6 kuyulu plakalara her kuyuda 300000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, *MAPK6* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA nanopartikülleri ve çıplak *MAPK6* siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası plakalar, muamele süresine göre 24, 48 ve 72 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kuyularda bulunan besiyerler tamamen uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası, kuyulara PBS eklenmiş ve hücreler hücre kazıyıcı ile tamamen kazınarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3.2.7.2 Enzime Bağlı İmmünoSorbent Analiz (ELISA)

MAPK6 hücre içi protein olduğundan, 15 mL santrifüj tüpünde PBS içerisinde süspanse edilmiş hücrelerin lizisi fiziksel olarak sonikasyon işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon işlemi sonrası örnekler, hücre debrisinden kurtulmak için 12000 xg'de 15 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Ardından, protein lizatını içeren süpernatantlar steril 1,5 mL santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 96 kuyulu ELISA plakasında, önceden belirlenen standart kuyularına sırasıyla 50 µL standart solüsyonlardan eklenmiştir. Örnek kuyularına ise 1,5 mL santrifüj tüplerinde yer alan protein lizatlarından 2 tekrarlı olacak şekilde 40 µL eklenmiştir. Ardından, yalnızca örnek kuyularının üzerine 10 µL Biotinlenmiş İnsan *MAPK6* antikoru eklenmiştir. Daha sonra, blank kontrol kuyusu hariç diğer kuyuların tamamının üzerine 50 µL HRP konjuge streptavidin eklenmiş ve karıştırılmıştır. Plaka yapışkan film ile kapatılarak inkübatörde 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, yapışkan film uzaklaştırılmış ve tüm kuyular 300 µL 1X Wash Buffer ile 5 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası, filtre kağıdı kullanılarak kuyular kurutulmuştur.

Kuyuların tamamına sırasıyla 50 µL *Solution A* ve 50 µL *Solution B* eklenmiştir. Plaka yapışkan film ve ardından alüminyum folyo ile kapatılarak inkübatörde 37°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, yapışkan film ve folyo uzaklaştırılmış ve tüm kuyulara 50 µL *Stop Solution* eklenmiştir. Hemen ardından, Multiskan Go mikroparka spektrofotometre cihazı kullanılarak kuyuların absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Kuyulardaki MAPK6 protein konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen standartların ölçülen absorbans değerlerine göre oluşturulan standart eğri aracılığıyla hesaplanmıştır.

3.2.8 Yara İyileşme Deneyi ile Migrasyon Analizi

Çalışmada, 24 kuyulu hücre kültürü plakası kullanılmıştır. Her kuyuda 50000 hücre olacak şekilde plakaya hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA nanopartikülleri ve çıplak MAPK6 siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulamanın ardından, kuyularda hücrelerin arasında, steril 1000 µL pipet ucu ile yara (çizik) oluşturulmuştur. 24 kuyulu plaka, çalışma boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre migrasyonunun analizi için kuyulardaki yaraların kapanma durumu, oluşturuldukları günden itibaren 4 gün boyunca takip edilmiştir. Kuyulardaki yaralara ait görseller, invert mikroskoba bağlı kamera ve bilgisayar aracılığıyla kaydedilmiştir. Kuyulardaki yara alanlarında zamana bağlı meydana gelen değişimin hesaplanması, kaydedilen görseller kullanılarak ImageJ programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.9 İmmünohistokimyasal Prolifere Hücre Nükleer Antijen (PCNA) Boyaması ile Proliferasyon Analizi

3.2.9.1 Hücre Kültüründe Etken Madde Uygulanması

Çalışmada, 24 ve 48 saat muamele grupları için üçer adet 12 kuyulu hücre kültürü plakası kullanılmıştır. Öncelikle plakadaki kuyulara steril 18 mm çapında yuvarlak lameller yerleştirilmiştir. Ardından, kuyulara yerleştirilen bu lamellerin üzerine 10000 hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA nanopartikülleri ve çıplak MAPK6 siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun

dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası plakalar, muamele süresine göre 24 ve 48 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kuyularda bulunan besiyerler tamamen uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Ardından, lamellerin üzerine buz gibi saf metanol eklenerek hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır.

3.2.9.2 İmmünohistokimyasal PCNA Boyaması

Fikse edilmiş hücreler PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası, 6 damla (lamelin üzerini tamamen kaplayacak miktarda) *Solution A (Serum Blocking Solution)* eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, solüsyon uzaklaştırılmış ve 300 µL 1/100 dilüe anti-PCNA antikor eklenmiştir. Antikor eklenildikten sonra plaka, oda sıcaklığında 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, anti-insan PCNA antikor kuyulardan uzaklaştırılmış ve kuyulardaki lameller PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanmıştır. Ardından, 6 damla *Solution B (Second Antibody)* eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, solüsyon uzaklaştırılmış ve kuyulardaki lameller PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanmıştır. 6 damla *Solution C (Streptavidin-peroxidase (HRP))* eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, solüsyon uzaklaştırılmış ve kuyulardaki lameller PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanmıştır. Ardından, kuyulara 600 µL kromojen eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, solüsyon uzaklaştırılmış ve kuyular distile su ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama sonrası, zıt boyama işlemi için kuyulara 600 µL hematoksin eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 saniye inkübe edilmiştir. Zıt boyama sonrası hematoksin kuyulardan uzaklaştırılır. Kuyular önce çeşme suyu ve akabinde distile su kullanılarak lameller berraklaşmaya dek yıkanmıştır. Berrak bir görünüm elde edildikten sonra, kuyulardaki lameller forseps ile çıkarılmış ve hücre ekili kısımları iç kısımda kalacak şekilde 1 damla *Mounting Solution* ile lamaların üzerine kapatılmıştır. Hazırlanmış bu preparatlar, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra, kameralı ışık mikroskopunda 40X ve 100X büyütmede incelenmiş ve gözlemlenen görüntüler kaydedilmiştir.

Kırmızı renkli hücreler, işaretlenmiş hücrelerdir ve proliferasyon göstermektedir. Mavi renkli hücreler ise işaretlenmemiş hücrelerdir ve proliferasyon göstermemektedir. Örneklerdeki proliferasyon yüzdesi, eşitlik (3.6) aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Proliferasyon} = \frac{\text{İşaretlenmiş hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.10 Koloni Formasyon Analizi

3.2.10.1 Hücre Kültüründe Etken Madde Uygulaması

Çalışmada, 6 kuyulu hücre kültürü plakaları kullanılmıştır. Her kuyuda 500 hücre olacak şekilde plakaya hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA nanopartikülleri ve çıplak MAPK6 siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. 6 kuyulu plakalar, çalışma boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Kuyulardaki hücrelerin koloni oluşturma durumu etken madde uygulamasından itibaren her gün invert mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir. İnkübasyonun 8. günü tamamlandığında, mikroskop altında kuyulardaki koloni oluşumları gözlenmiştir. Daha sonra, kuyularda bulunan besiyerler tamamen uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Çalışmada, 50 ve üzeri hücre içeren hücre kümeleri koloni olarak adlandırılmıştır.

3.2.10.2 Kolonilerin Fiksasyonu ve Kristal Viyole Boyaması

PBS ile yıkanmış hücrelerin üzerine 3 mL %4 PFA çözeltisi eklenmiş ve 30 dk 4°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, PFA çözeltisi kuyulardan uzaklaştırılmış ve kolonilerin görselleştirilmesi için kuyulara 3 mL %0,5 kristal viyole çözeltisi eklenmiştir. Ardından plakalar boyamanın gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kuyular çeşme suyu dolu kaba daldırılarak yıkanmıştır. Yıkama sonrası, plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuyular kuruduktan sonra, görüntüleri kaydedilmiştir. Oluşan kolonilerin sayımı, “ColonyArea” eklentisi kullanılarak ImageJ programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 Akış Sitometrisi ile Apoptoz Analizi

3.2.11.1 Hücre Kültüründe Etken Madde Uygulaması

Çalışmada, 24, 48 ve 72 saat muamele grupları için 24 kuyulu hücre kültürü plakaları kullanılmıştır. 24 kuyulu plakalara her kuyuda 50000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, boş PLGA

nanopartikülleri ve çıplak MAPK6 siRNA IC₄₀ değerine göre belirlenmiş uygun dozlarda 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Tedavi edilmemiş kontrol grubu hücrelerine ise yalnızca tamamlanmış besiyer 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası plakalar, muamele süresine göre 24, 48 ve 72 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kuyularda bulunan besiyerler tamamen uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası, kuyulara 1X Tripsin-EDTA (%0,25) eklenerek hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 dk inkübe edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Ardından, eklenen Tripsin-EDTA miktarı kadar tamamlanmış besiyer eklenerek Tripsin enzimi inaktive edilmiş ve hücreler 1,5 mL santrifüj tüpüne alınmıştır. Hücreler 2000 xg'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve besiyer uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücre peleti PBS ile süspanse edilmiş ve 2000 xg'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti üzerine 270 µL PBS eklenmiş ve hücreler pipetaj yardımıyla PBS içerisinde süspanse edilmiştir.

3.2.11.2 Akış Sitometrisi

PBS ile süspanse edilmiş hücrelerin üzerine 30 µL *Muse Annexin V & Dead Cell Reagent* eklenmiş ve pipetaj yardımıyla karıştırılmıştır. Tüpler, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinde, tüpler 10 dakikada 1 karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrası, canlı, apoptotik ve ölü hücrelerin oranı MUSE Cell Analyzer ile incelenmiştir.

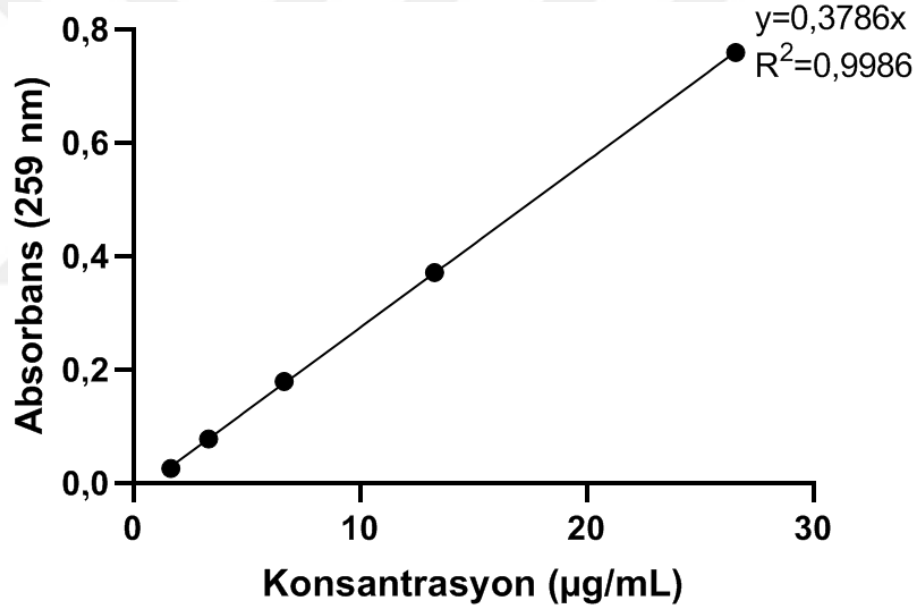
3.2.12 İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri, ortalama $\pm$ Standart Sapma (SD) şeklinde gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 8.0 programı ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıp dağılmadıkları, Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için iki yönlü ANOVA ve akabinde Tukey testi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0,01$ ise istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı kabul edilmiştir.

4.1 siRNA Moleküllerinin Kalibrasyon Eğrileri

4.1.1 MAPK6 siRNA Kalibrasyon Eğrisi

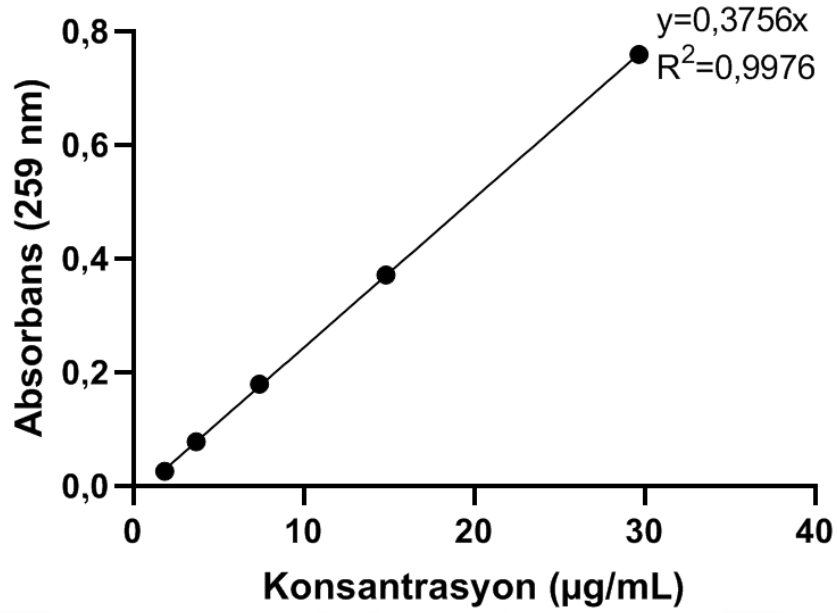
Dilüe MAPK6 siRNA çözeltilerinin, $\lambda_{\max}$ değeri olarak belirlenen 259 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak MAPK6 siRNA molekülünün kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. MAPK6 siRNA çözeltisinin, nükleaz içermeyen suya karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 MAPK6 siRNA molekülünün suya karşı kalibrasyon eğrisi

4.1.2 Scrambled (Negatif Kontrol) siRNA Kalibrasyon Eğrisi

Dilüe *scrambled* siRNA çözeltilerinin, $\lambda_{\max}$ değeri olarak belirlenen 259 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak *scrambled* siRNA molekülünün kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. *Scrambled* siRNA çözeltisinin, nükleaz içermeyen suya karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 *Scrambled* siRNA molekülünün suya karşı kalibrasyon eğrisi

4.2 PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

siRNA molekülleri nükleaz içermeyen su ile süspanse edildiğinden MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri (MAPK6 siRNA NP), *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri (*scrambled* siRNA NP) ve boş PLGA nanopartikülleri (boş NP) ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. PLGA nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan maddeler ve sentez koşulları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 PLGA nanopartiküllerinin sentez parametreleri

Nanopartikül	Bileşenler			PVA		Sonikasyon İşlemi (sn,W)
	MAPK6 siRNA (µg)	<i>Scrambled</i> siRNA (µg)	PLGA (mg)	İç Faz (mL,%)	Dış Faz (mL,%)	
MAPK6 siRNA NP	26,58 µg	-	30 mg	4 mL, %3	35 mL, %0,1	90 sn, 45 W
<i>Scrambled</i> siRNA NP	-	29,68 µg	30 mg	4 mL, %3	35 mL, %0,1	90 sn, 45 W
Boş NP	-	-	30 mg	4 mL, %3	35 mL, %0,1	90 sn, 45 W

Sentezlenen nanopartiküller, liyofilizatör aracılığıyla liyofilize hale getirilmiştir. Liyofilize hale getirilen nanopartiküllerin kuru ağırlıkları hesaplanmıştır. Sentezlenen MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP'lerin kuru ağırlığı sırasıyla 13 mg, 10,9 mg ve 10,3 mg olarak belirlenmiştir.

Elde edilen liyofilize nanopartikül miktarları, çalışma boyunca gerçekleştirilecek analizler için ilk aşamada yeterli görülmüştür. Bu nanopartiküllerin, hücre kültürü çalışmalarında kullanım uygunluğunun değerlendirilmesi adına karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

4.3 PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen liyofilize PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi çeşitli eşitlikler aracılığıyla hesaplanmıştır. Hesaplanan bu veriler Tablo 4.2'de sırasıyla verilmiştir. Nanopartiküllerin boyutu, dağılımları ve zeta potansiyelleri Zetasizer cihazı ile analiz edilmiştir. Ardından, nanopartiküllerin yapısı, şekli ve boyutu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin nanopartiküllerin yüzeyinde yer alan fonksiyonel grupların analizi ise Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise, nanopartiküllerin *in vitro* salımları belirlenmiştir.

Tablo 4.2 Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin belirlenen ağırlığı, enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi

Nanopartikül	Liyofilize nanopartikül miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%)	Reaksiyon verimi (%)	İlaç yükleme kapasitesi (%)
MAPK6 siRNA NP	13 mg	%87,75	%42,9	%0,18
<i>Scrambled</i> siRNA NP	10,9 mg	%81	%36,3	%0,22
Boş NP	10,3 mg	-	%34,33	-

4.3.1 Enkapsülasyon Etkinliği

Sentezlenen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerince enkapsüle edilen siRNA moleküllerinin miktarı, indirekt yöntem ile belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, enkapsüle edilen siRNA miktarının, sentez işlemi esnasında kullanılan siRNA miktarına oranlanması ile yüzde cinsinden belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin enkapsülasyon etkinliği %87,75 olarak hesaplanmıştır. *Scrambled* siRNA NP'lerinin enkapsülasyon etkinliği ise %81 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Enkapsülasyon etkinliği, enkapsüle edici olarak kullanılan bileşenlere ve yüklenen etken maddeye bağlı olarak değişmektedir [80]. Ek olarak, yüklenen materyal ile enkapsüle edici bileşen arasındaki uyum derecesi de oldukça önemlidir [81]. Bu iki farklı siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezinde aynı tür ve miktarda bileşen kullanılmıştır. Ayrıca, uygulanan sonikasyon işleminin gücü ve süresi aynıdır. Bu nedenle, enkapsülasyon etkinlikleri arasındaki fark MAPK6 siRNA ve *scrambled* siRNA dizileri arasındaki baz farkından veya partiküller arasındaki olası ortalama boyut farkından kaynaklanıyor olabilir. Hesaplanan bu enkapsülasyon etkinliği değerleri, literatürde yer alan siRNA yüklü PLGA nanopartikül sentez çalışmaları dikkate alındığında oldukça yüksektir [30, 82, 83]. Sentezlenen nanopartikülün enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması, terapötik uygulamalarda büyük avantajlar sağlamaktadır. Çünkü yüksek enkapsülasyon etkinliği, partikül başına daha yüksek miktarda terapötik madde ve dolayısıyla uygulama başına daha yüksek terapötik madde dozu anlamına gelmektedir. Bu oldukça önemlidir çünkü insanlardaki ve deney hayvanlarındaki çoğu uygulama şekli için enjeksiyon hacmi sınırlıdır. Ek olarak, yüksek enkapsülasyon etkinliği daha seyrek terapötik madde uygulamasını yeterli kılabilir [81]. MAPK6 siRNA NP'leri ve *scrambled* siRNA NP'leri için hesaplanan enkapsülasyon etkinlikleri oldukça yüksek ve *in vitro* uygulamalarda kullanıma uygun bulunmuştur.

4.3.2 Reaksiyon Verimi

Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin ağırlıkları ölçülmüştür. Gerçekleştirilen reaksiyonun verimi, elde edilen liyofilize nanopartikül miktarının, sentez işlemi esnasında kullanılan PLGA ve etken madde miktarına oranlanması ile yüzde cinsinden belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin reaksiyon verimi %42,9 olarak hesaplanmıştır. *Scrambled* siRNA NP'lerinin reaksiyon verimi %36,3 olarak hesaplanmıştır. Boş NP'lerin reaksiyon verimi ise %34,33 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Boş PLGA nanopartikülünün sentezi esnasında siRNA molekülü kullanılmaması haricinde, tüm bu nanopartiküller aynı yöntem ve koşullarda sentezlenmiştir. Dolayısıyla, partiküllerin reaksiyon verimleri arasındaki farkın sentez parametrelerinden ziyade, sentez esnasında gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde olası ürün kaybından kaynaklanıyor olabilir. Hesaplanan bu reaksiyon verimleri, literatürde yer alan siRNA yüklü PLGA nanopartikül sentez çalışmalarında ve diğer PLGA nanopartikül çalışmalarında belirlenen reaksiyon verimleriyle benzerdir [84, 85]. Reaksiyon verimi, terapötik uygulamadan etkinliğinden ziyade, sentez esnasında polimer ve etken maddelerin verimli kullanımına yönelik bir değerlendirme sunmaktadır. MAPK6 siRNA NP'leri ve *scrambled* siRNA NP'leri için hesaplanan reaksiyon verimleri yeterli düzeyde ve başarılı bulunmuştur.

4.3.3 İlaç Yükleme Kapasitesi

Sentezlenen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin ilaç yükleme kapasitesi, indirekt olarak hesaplanan enkapsüle siRNA moleküllerinin miktarının, liyofilize PLGA nanopartikül miktarına oranlanması ile belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin ilaç yükleme kapasitesi %0,18 olarak hesaplanmıştır. *Scrambled* siRNA NP'lerinin ilaç yükleme kapasitesi ise %0,22 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

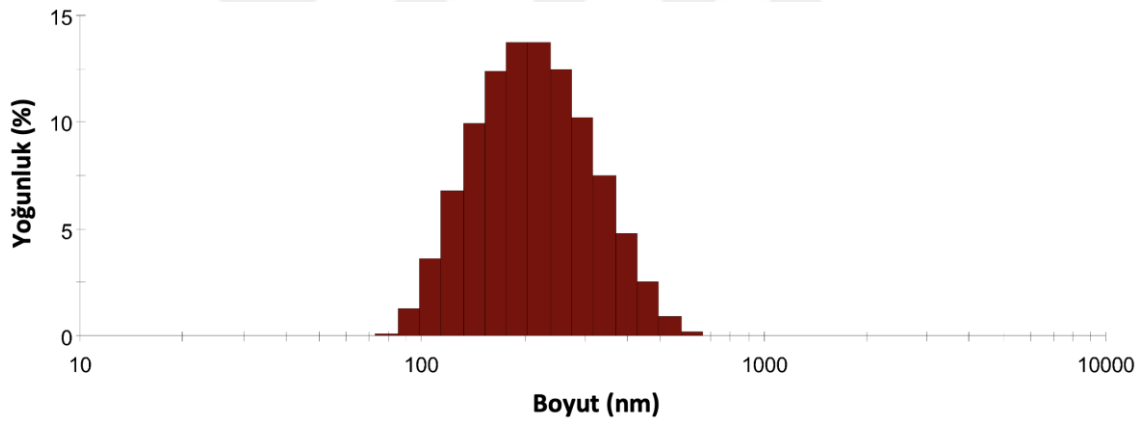
PLGA nanopartiküllerinin ilaç yükleme kapasitesi, yüklenen etken maddenin moleküler ağırlığına, polimerin yapısına, polimerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine, etken madde-polimer etkileşimine ve sentezde kullanılan etken madde miktarından etkilenmektedir [86, 87]. Nanopartiküllerin yüzde cinsinden ilaç yükleme kapasiteleri birbirine oldukça yakındır. İlaç yükleme kapasiteleri düşüktür. Bu noktada önemli etkenlerden bir tanesi, sentez esnasında kullanılan siRNA miktarının oldukça düşük olmasıdır. Ek olarak, siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi sonrası düşük ilaç yükleme kapasitesi gözlenmesi literatür ile bağdaşmaktadır. siRNA gibi düşük moleküler ağırlığa sahip maddeler, PLGA nanopartiküllerine yüklenirken oldukça sınırlı ilaç yükleme kapasitesi ortaya koymaktadır. Bu noktada, düşük moleküler ağırlığa ek olarak siRNA'ların hidrofilik karakteri ve yapısındaki elektrostatik itme kuvvetleri de düşük yükleme kapasitesi sergilenmesine yardımcı olmaktadır [82, 87]. Ek olarak, polimerik nanopartiküller de düşük ilaç yükleme kapasitesi ortaya koyma eğiliminde yapılarıdır [88]. Yüksek ilaç yükleme kapasitesi, polimerik nanopartiküllerin kontrollü salım profilini ve stabilitesini olumsuz etkileyebilmektedir [81]. Bu nedenle, ilaç yükleme kapasitesinin artması nanopartikülün verimine mutlak fayda sağlayacaktır, şeklinde bir

yorum yapılması yanlış olacaktır. MAPK6 siRNA NP'leri ve *scrambled* siRNA NP'leri için hesaplanan ilaç yükleme kapasiteleri, sentez esnasında oldukça düşük miktarda siRNA kullanıldığından beklenildiği gibi düşük bulunmuştur.

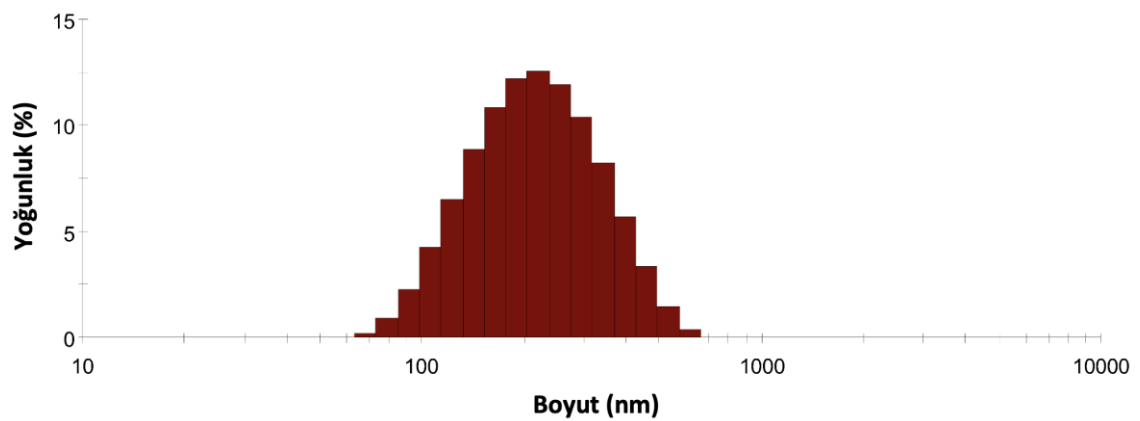
4.3.4 Nanopartiküllerin Boyut, Dağılım ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin ortalama boyutları ve çoklu dağılım indeksleri dinamik ışık saçılım metoduyla; zeta potansiyelleri ise faz analiz ışık saçılım metoduyla ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde edilen veriler Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

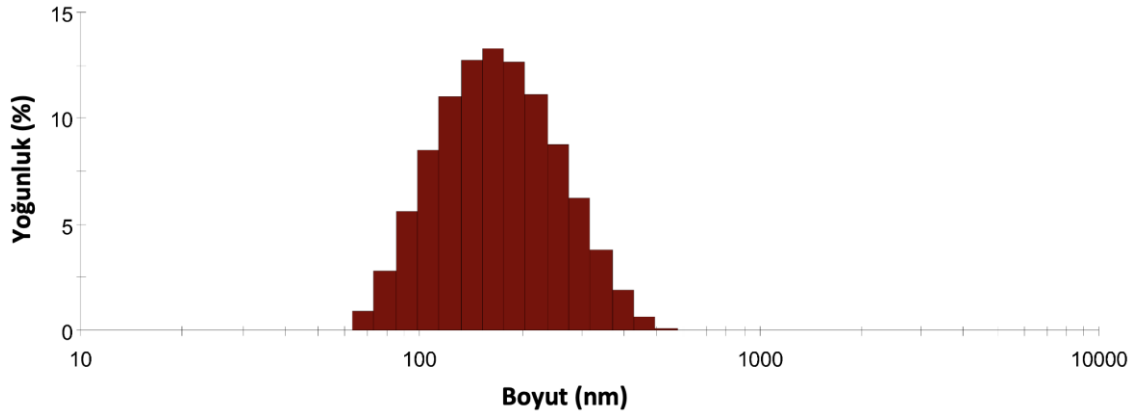
Sentezlenen MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin ortalama boyutlarına dair grafikler sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin ortalama boyutu 200,7 nm, *scrambled* siRNA NP'lerinin ortalama boyutu 192,2 nm ve boş NP'lerin ortalama boyutu 154,9 nm olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.3 MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği



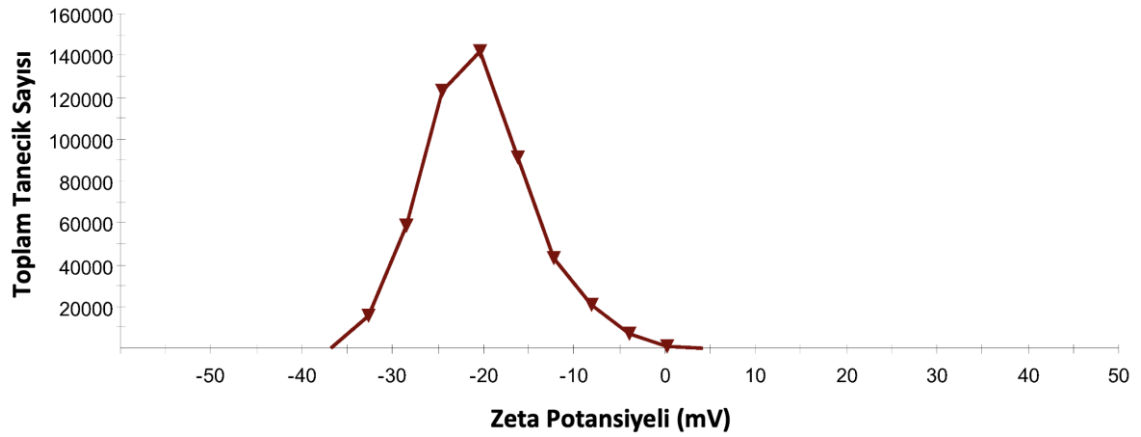
Şekil 4.4 Scrambled siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği



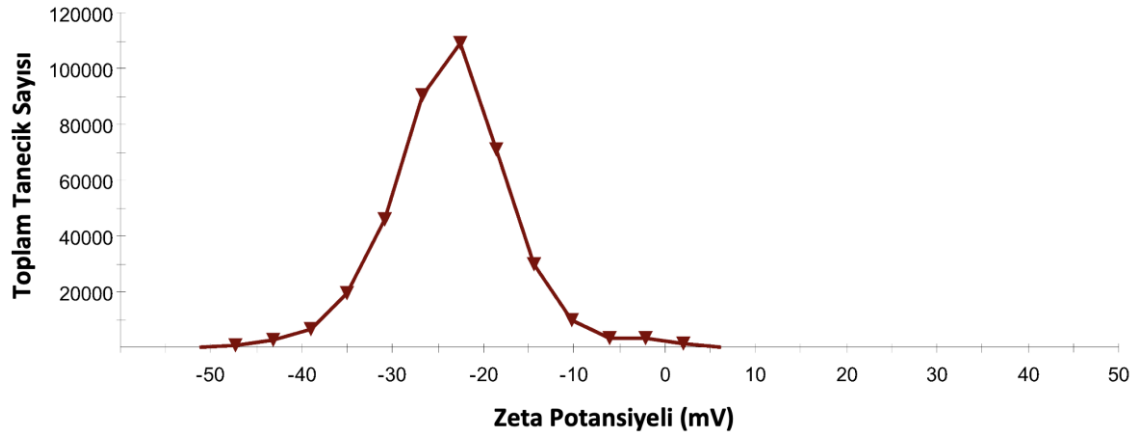
Şekil 4.5 Boş PLGA nanopartiküllerinin boyut dağılım grafiği

MAPK6 siRNA NP'lerinin çoklu dağılım indeksi 0,172, *scrambled* siRNA NP'lerinin çoklu dağılım indeksi 0,144 ve boş NP'lerin çoklu dağılım indeksi 0,128 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

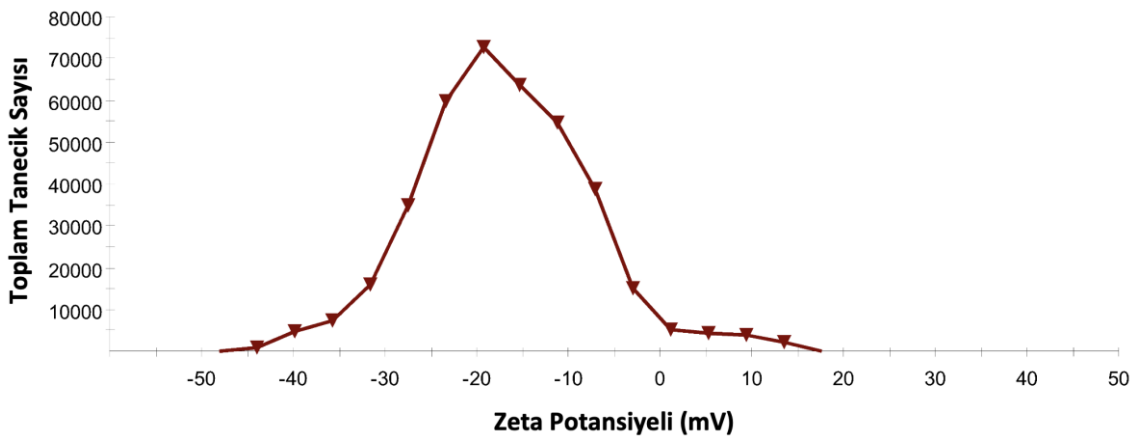
MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin zeta potansiyellerine dair grafikler sırasıyla Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin zeta potansiyeli -20,5 mV, *scrambled* siRNA NP'lerinin zeta potansiyeli -23,5 mV ve boş NP'lerin zeta potansiyeli -24,7 mV olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.6 MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.7 *Scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.8 Boş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği

Tablo 4.3 Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin belirlenen ortalama boyutu, çoklu dağılım indeksi ve zeta potansiyeli

Nanopartikül	Ortalama Boyut (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
MAPK6 siRNA NP	200,7	0,172	-20,5
<i>Scrambled</i> siRNA NP	192,2	0,144	-23,5
Boş NP	154,9	0,128	-24,7

Nanopartiküllerin ortalama boyutları 210 nm'nin altında bulunmuştur. Bu durum, sentezlenen nanopartiküllerin ortalama olarak oldukça küçük boyutta olduğunu ortaya koymaktadır. Nanopartiküllerin boyutu, *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda verimi oldukça etkilemektedir [89, 90]. Büyük boyutlu nanopartiküller, lenfatik sistemi aktive edebilmekte ve böylece hedeflenen etki sağlanamadan dolaşımdan uzaklaştırılabilmektedir [91]. Çoklu dağılım indeksi, partikül içeren çözeltinin homojenliğini test etmek için belirlenmektedir. Küçük değerde çoklu dağılım indeksi, küçük bir boyut dağılımını ifade ederken, büyük değerler homojen olmayan büyük bir boyut dağılımını ifade etmektedir [92]. Sentezlenen nanopartiküllerin çoklu dağılım indeksleri oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum, sentezlenen nanopartikülleri içeren çözeltilerin homojen küçük bir boyut dağılımı sergilediğini göstermektedir. Zeta potansiyel ölçümü, çözelti içerisinde nanopartikülü saran elektrikli çift katmandaki elektrostatik potansiyeli belirlemektedir ve bu ölçüm nanopartiküllerin stabilitesini göstermektedir [93, 94]. PLGA nanopartikülleri, yapılarında bulunan terminal karboksilik grup nedeniyle negatif zeta potansiyeli ortaya koymaktadır [95]. Yüksek düzeyde negatif zeta potansiyeli, PLGA nanopartiküllerinin yüksek düzeyde stabilite sergilediğini göstermektedir [96].

Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri, yüksek düzeyde negatiftir. Dolayısıyla bu durum, nanopartiküllerin yüksek stabilite sergilediklerini ortaya koymaktadır. MAPK6 siRNA NP'leri, *scrambled* siRNA NP'leri ve boş NP'ler ortalama boyut, boyutların homojenliği ve stabiliteleri açısından *in vitro* uygulamada kullanıma uygun bulunmuştur.

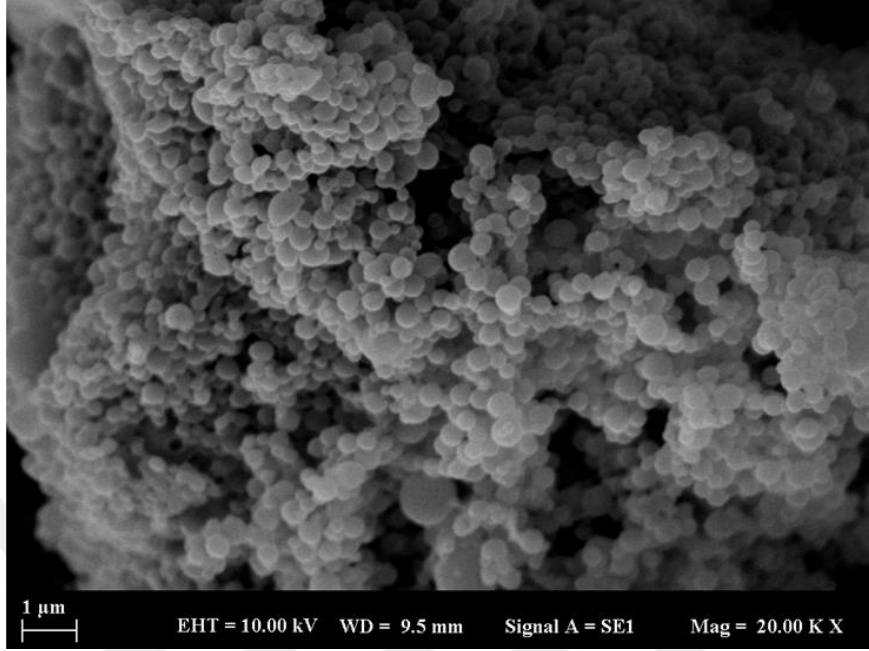
4.3.5 Nanopartiküllerin SEM Analizi

Sentezlenen ve liyofilize hale getirilen MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin morfolojileri, şekilleri ve boyutları SEM analizi ile incelenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin SEM ile 10 kV'da 20000X ve 60000X büyütme sonrası elde edilen görselleri sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

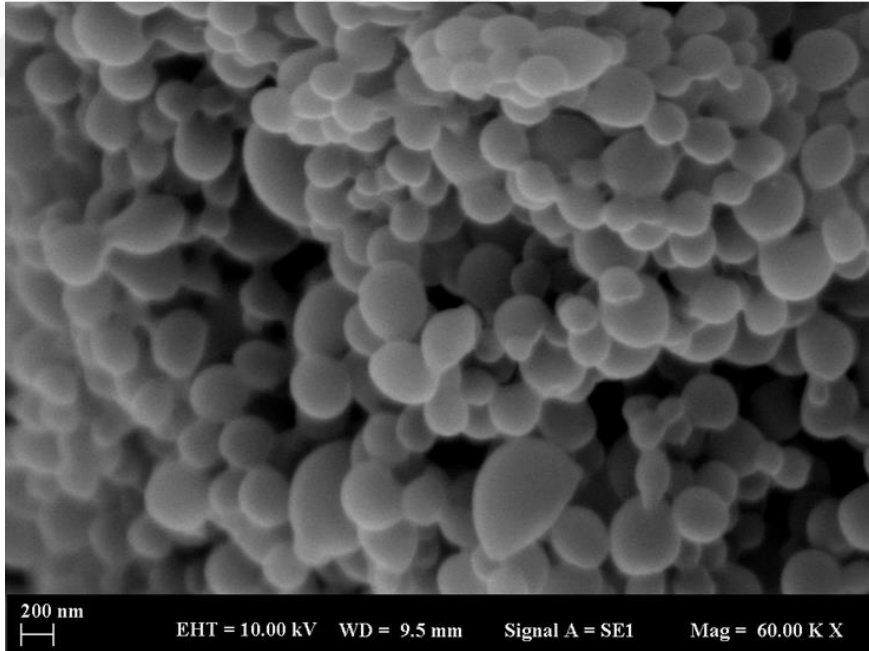
MAPK6 siRNA NP'lerin, *scrambled* siRNA NP'lerin ve boş NP'lerin küresel yapıda olduğu SEM analizi ile gözlenmiştir. Ayrıca, MAPK6 siRNA NP'lerin ortalama 200-220 nm boyutunda olduğu, *scrambled* siRNA NP'lerin ortalama 180-200 nm boyutunda

olduğu ve boş NP'lerin ortalama 150-170 nm boyutunda olduğu da SEM analizi ile belirlenmiştir.

A.

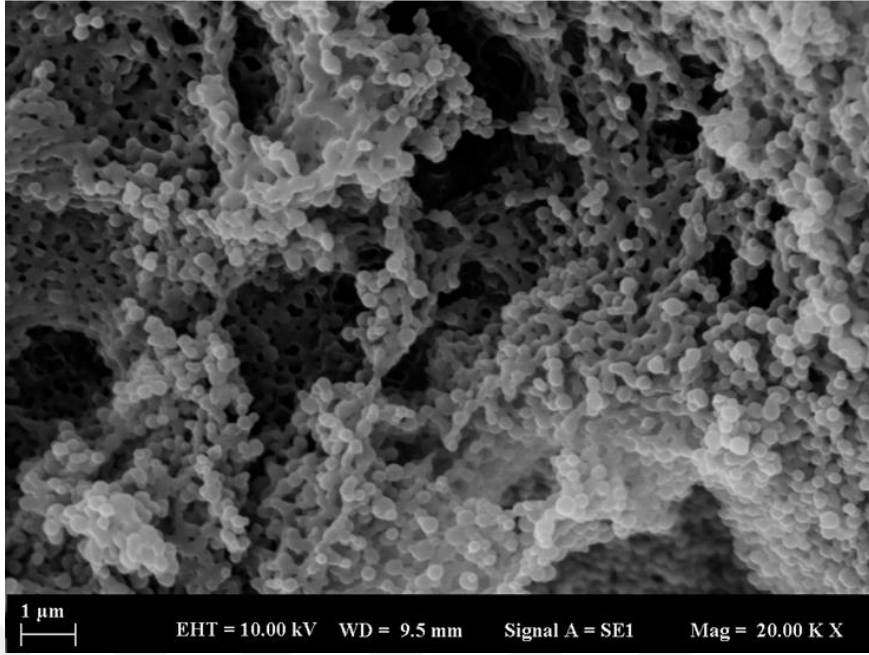


B.

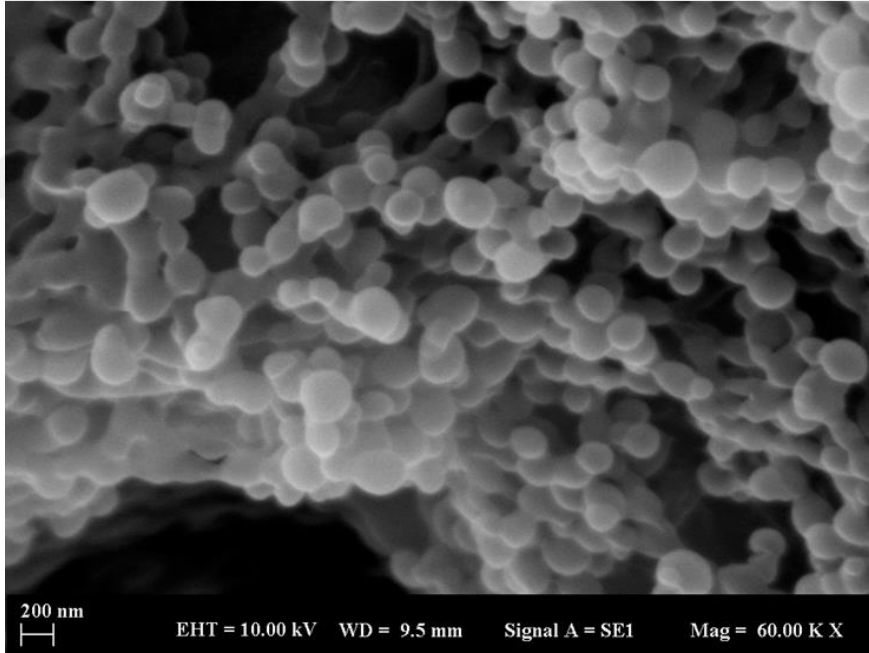


şekil 4.9 MAPK6 siRNA NP'lerin 10 kV'da 20000X (**A**) ve 60000X (**B**) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri

A.

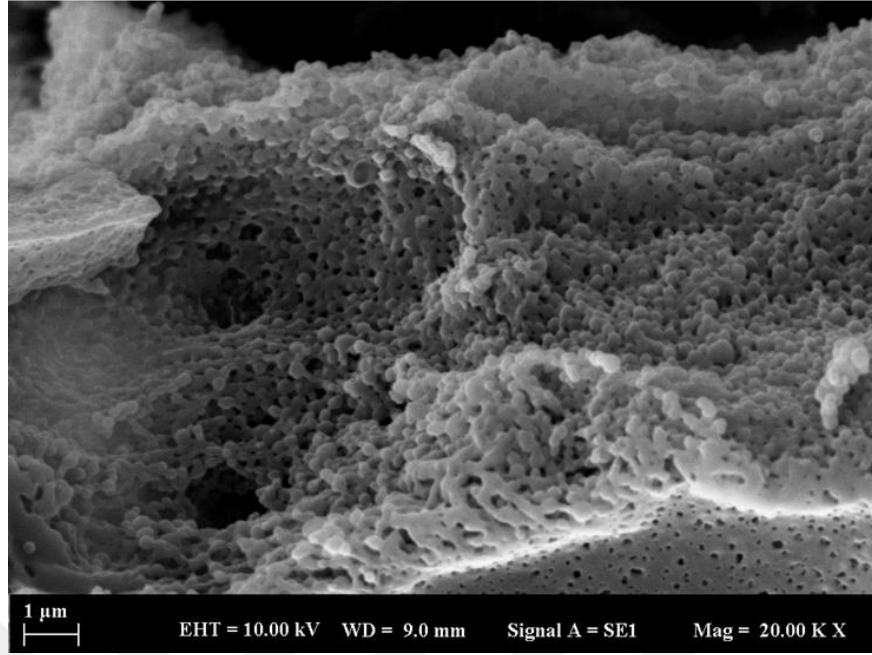


B.

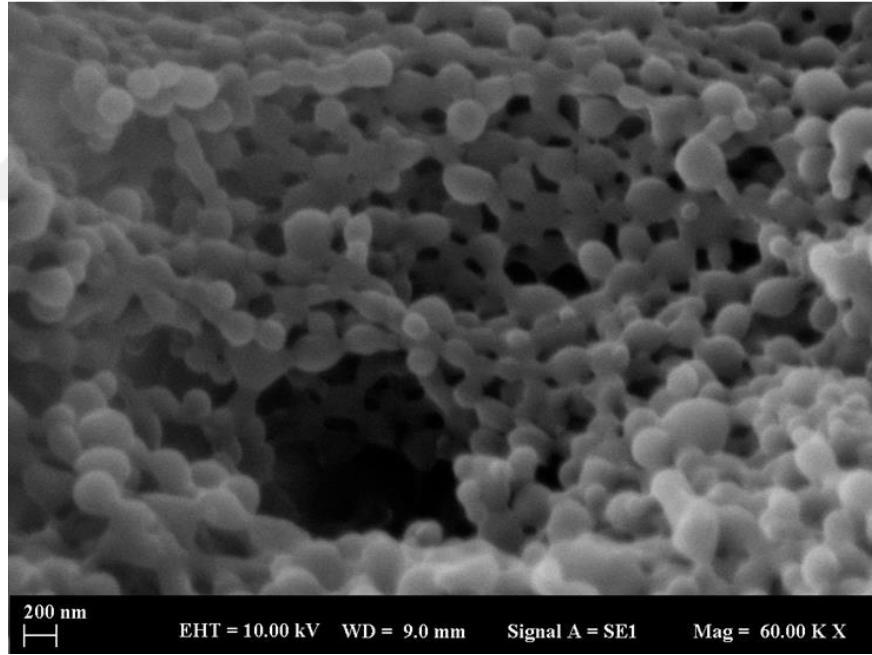


Şekil 4.10 *Scrambled* siRNA NP'lerin 10 kV'da 20000X (A) ve 60000X (B) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri

A.



B.



Şekil 4.11 Boş NP'lerin 10 kV'da 20000X (A) ve 60000X (B) büyütme oranı ile elde edilmiş SEM analiz görüntüleri

Nano taşıma sistemlerinde, nanomateriyal ve üretilen yapının boyutuna ek olarak şekli de önemlidir. Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin tamamının küresel yapıda olduğu belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar baz alındığında, ilaç taşıma sistemi olarak üretilen PLGA nanopartiküllerinin genel itibarıyla küresel yapıda olduğu görülmektedir [97]. Bu açıdan, sentezlenen küresel PLGA nanopartiküller literatüre uygun bulunmuştur.

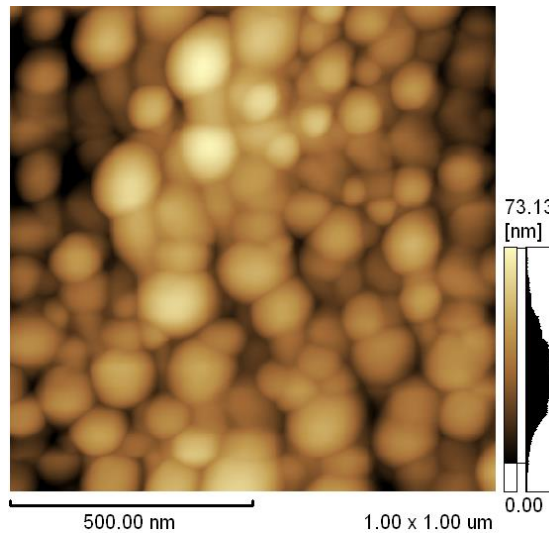
Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin SEM analizi ile belirlenen ortalama boyutları 230 nm'den küçük bulunmuştur. Her bir partikül için belirlenen ortalama boyutlar, sentezleri sonrası ZetaSizer cihazı ile belirlenen ortalama boyutlar ile örtüşmektedir. Her ne kadar terapötik madde taşıma sistemi olarak kullanılan nanopartiküller 1-1000 nm boyutları arasında üretilebiliyor olsa da genel ortalama olarak 300 nm nanopartiküller kullanılmaktadır [89, 90]. Ek olarak, yüksek partikül boyutu lenfatik sistem aktivasyonuna neden olabilmektedir ve bunun sonucunda nanopartiküller hedef bölgede etkili düzeyde salım sergileyemeden dolaşımdan uzaklaştırılabilmektedir [91].

Sentezlenen siRNA yüklü ve boş PLGA nanopartiküllerinin ortalama boyutlarının, şekillerinin ve morfolojilerinin *in vitro* ve *in vivo* uygulama açısından uygun olduğu ortaya konulmuştur.

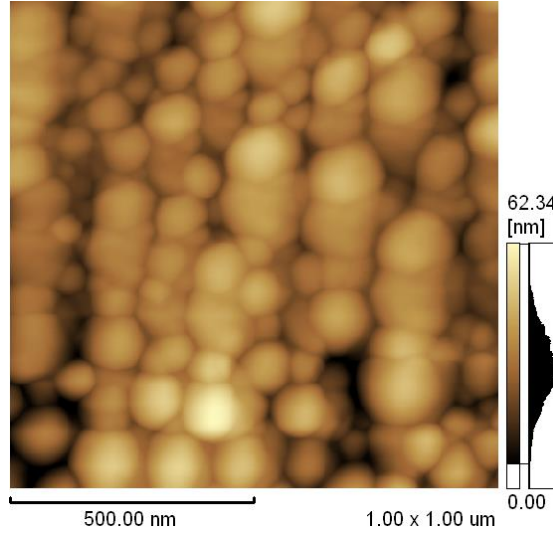
4.3.6 Nanopartiküllerin AFM Analizi

MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin şekli, boyutu ve üç boyutlu yapısı SEM analizine ek olarak, AFM analizi ile de incelenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin AFM ile 1 µm alanda elde edilen görselleri sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.

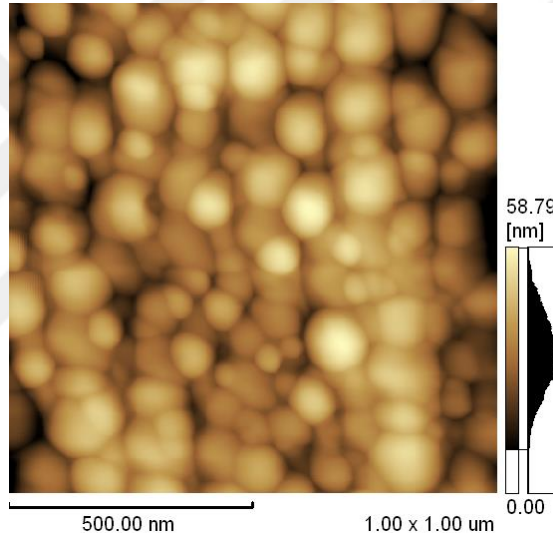
Sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin üç boyutlu yapısı gözlenmiştir. MAPK6 siRNA NP'lerin, *scrambled* siRNA NP'lerin ve boş NP'lerin küre şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, AFM analizi ile MAPK6 siRNA NP'lerin ortalama 73 nm boyutunda olduğu, *scrambled* siRNA NP'lerin ortalama 62 nm boyutunda olduğu ve boş NP'lerin ortalama 59 nm boyutunda olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 4.12 MAPK6 siRNA NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü



Şekil 4.13 *Scrambled* siRNA NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü



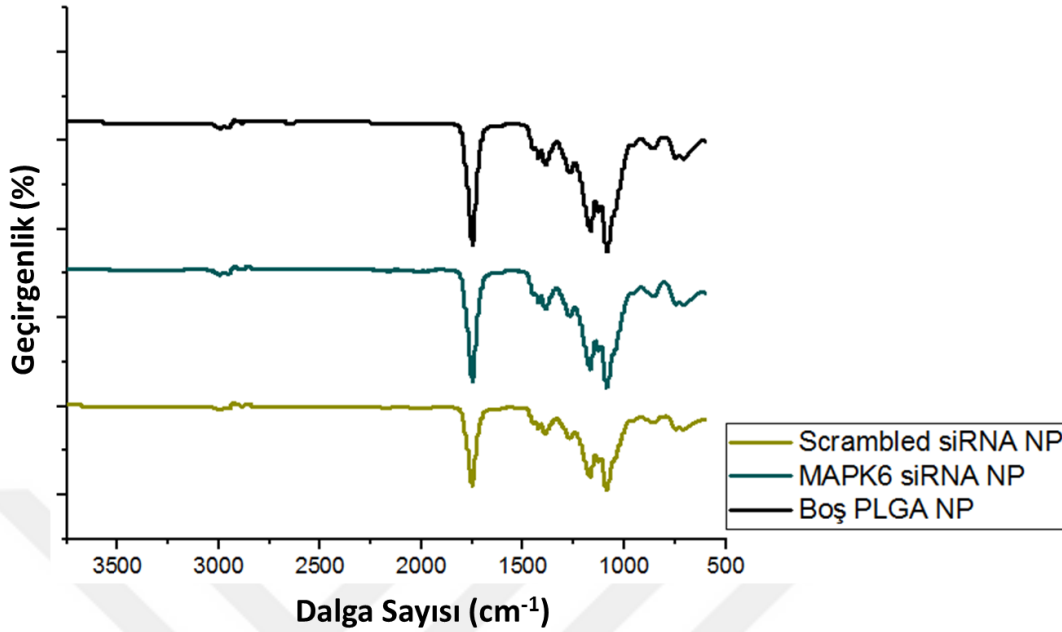
Şekil 4.14 Boş NP'lerin 1 x 1 µm AFM analiz görüntüsü

AFM analiz sonuçları, SEM analizi ile belirlenen PLGA nanopartiküllerinin küresel şeklini doğrulamıştır. AFM analiz ile belirlenen ortalama nanopartikül boyutları, Zetasizer cihazı ile belirlenen partiküllerin zeta boyutlarına ve SEM analizi ile belirlenen ortalama partikül boyutlarına kıyasla çok daha küçüktür. Bunun sebebi, analizler esnasında denk gelinen bölgelerin farklılığı olabilir.

4.3.7 Nanopartiküllerin FTIR Analizi

Sentezlenen MAPK6 siRNA NP'lerinin, *scrambled* siRNA NP'lerinin ve boş NP'lerin yüzey yapısında meydana gelen fonksiyonel grup değişimleri FTIR ile ATR ataçmanı kullanılarak incelenmiştir. Böylece siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinde siRNA moleküllerinin, nanopartikülün merkezine yüklenmeye ek olarak yüzeye tutunma durumu

değerlendirilmiştir. MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP'lerin FTIR spektrumları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



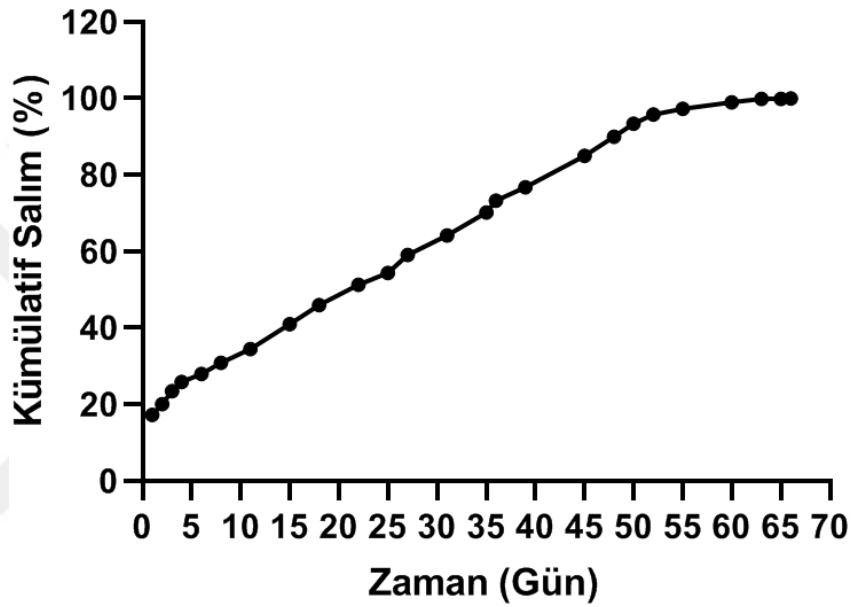
Şekil 4.15 Boş PLGA NP, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP'lerin FTIR spektrumları

PLGA kopolimerinin FTIR spektrumu, yapısında yer alan fonksiyonel grupları belirten çeşitli karakteristik pikler içermektedir. Spektrumda yer alan 1090-1100 cm^{-1} arasında yoğun pik C-O-C gerilmesini, 1755-1760 cm^{-1} arasında yoğun pik C=O gerilmesini, 2900-3100 cm^{-1} arasında pik C-H gerilmesini temsil etmektedir [98, 99]. Şekil 4.15'te görüleceği üzere, boş PLGA NP, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP spektrumları birbirlerine oldukça benzer benzerdir. Bu FTIR spektrumları, aynı dalga sayılarında ve benzer yoğunluklarda pikler içermektedir. Ayrıca etken madde içermeyen boş PLGA NP spektrumuna ek olarak, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP spektrumları da PLGA kopolimerine karakteristik pikleri olması gerektiği dalga sayısında ve yoğunlukta içermektedir. Bu oldukça önemlidir.

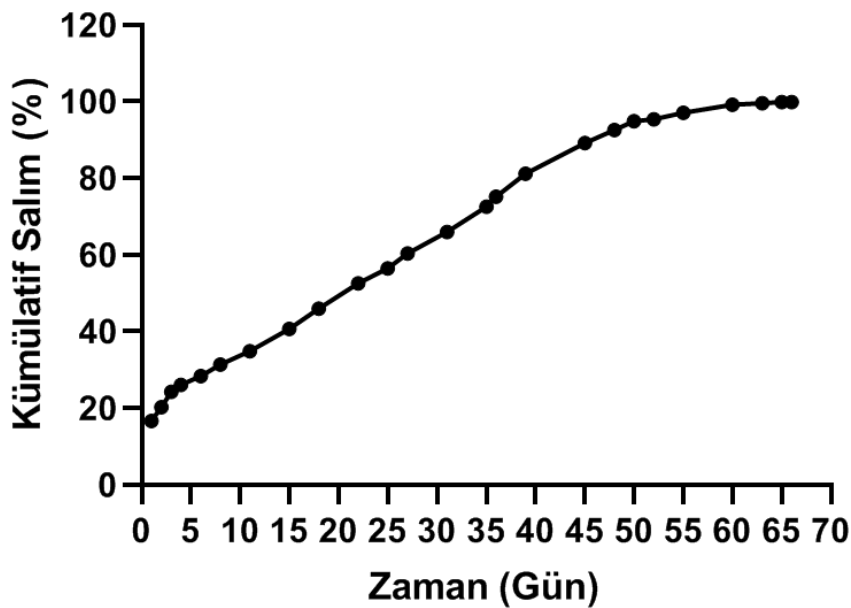
siRNA molekülü yüklenen MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP spektrumlarının boş PLGA NP spektrumu ile aynı dalga sayılarında ve benzer yoğunlukta pikler vermesi, siRNA moleküllerinin nanopartikül sentezi esnasında oldukça başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini ortaya koymaktadır [98]. Bu açıdan, FTIR analizi sonucu elde edilen spektrumlar, öncesinde hesaplanan nanopartiküllerin yüksek enkapsülasyon etkinliğini doğrular niteliktedir. Enkapsülasyon etkinliği ve PLGA yüzey özelliklerinin korunması açısından, sentezlenen nanopartiküller kullanıma uygun bulunmuştur.

4.3.8 Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımının Belirlenmesi

Sentezlenen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin MCF-7 hücre hatlarına uygulamadan önce salım profillerinin belirlenmesi ve MTT’de uygulanacak konsantrasyon aralığının buna göre belirlenebilmesi adına *in vitro* salım deneyi gerçekleştirilmiştir. UV-Vis spektrofotometre ile elde edilen absorbans değerleri ve oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak, *in vitro* salım miktarları belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP için güne bağlı olarak oluşturulan *in vitro* siRNA kümülatif salım (%) grafikleri sırasıyla Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.16 MAPK6 siRNA NP'lerin *in vitro* MAPK6 siRNA salım (%) grafiği



Şekil 4.17 *Scrambled* siRNA NP'lerin *in vitro* *scrambled* siRNA salım (%) grafiği

Yukarıda verilen MAPK6 siRNA NP'lerinin ve *scrambled* siRNA NP'lerinin *in vitro* salım grafikleri incelendiğinde, deney başlatıldıktan 24 saat sonra MAPK6 siRNA molekülünün %17,24'ünün ve *scrambled* siRNA molekülünün %16,67'sinin ortama salındığı belirlenmiştir. 15. günün sonunda, MAPK6 siRNA molekülünün %40,92'sinin ve *scrambled* siRNA molekülünün %40,68'inin salındığı belirlenmiştir. 45. günün sonunda, MAPK6 siRNA molekülünün %84,94'ünün ve *scrambled* siRNA molekülünün %89,14'ünün salındığı belirlenmiştir. 60. günün sonunda ise, MAPK6 siRNA molekülünün %98,91'inin ve *scrambled* siRNA molekülünün %99,16'sının salındığı belirlenmiştir.

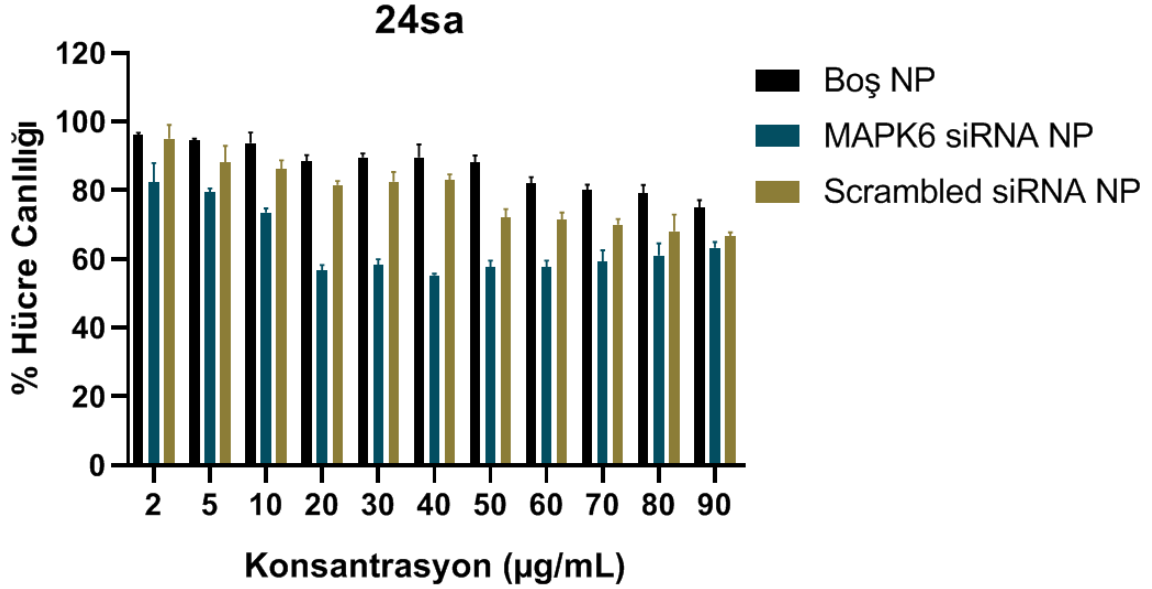
İlk 24 saatte gerçekleşen hızlı salımın ardından, her iki nanopartikül yapısı da artarak devam eden stabil ve kontrollü bir salım sergilemiştir. 60 günün sonunda ise nanopartiküllere yüklenen siRNA moleküllerinin neredeyse tamamı salınmıştır. Polimerik nanopartiküllerde genellikle “patlama salım” olarak adlandırılan hızlı ve fazla miktarda etken madde salımı gözlenmektedir [100]. İlk 24 saatte her iki nanopartikül yapısında da gözlenen yaklaşık %17'lik salım bu şekilde açıklanabilir. Bu patlama salım sonrası, nanopartiküller kontrollü ve stabil etken madde salımı sergilemişlerdir. Bu salım profili de PLGA nanopartiküllerinin özellikleriyle örtüşmektedir. PLGA nanopartiküllerinin taşıma sistemi olarak sıklıkla tercih edilmesinde, biyobozunurluk ve yüksek biyouyumluluk gibi çeşitli özellikleri ve bu özelliklerin sağladığı avantajlar büyük pay sahibidir. Bir diğer dikkat çekici özellik ise, PLGA nanopartiküllerinin başta siRNA gibi küçük moleküller olmak üzere, çeşitli etken maddelerin kontrollü salımını sağlayabilmeleridir [101].

Sentezlenen MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP'lerinin *in vitro* kontrollü salım sergilediği ve 60 günün sonunda yüklenen siRNA moleküllerinin neredeyse tamamının salımını gerçekleştirdikleri ortaya konulduğundan, bu nanopartiküller salım profili açısından kullanıma uygun bulunmuştur.

4.4 MTT Testi ile Sitotoksite Analizi

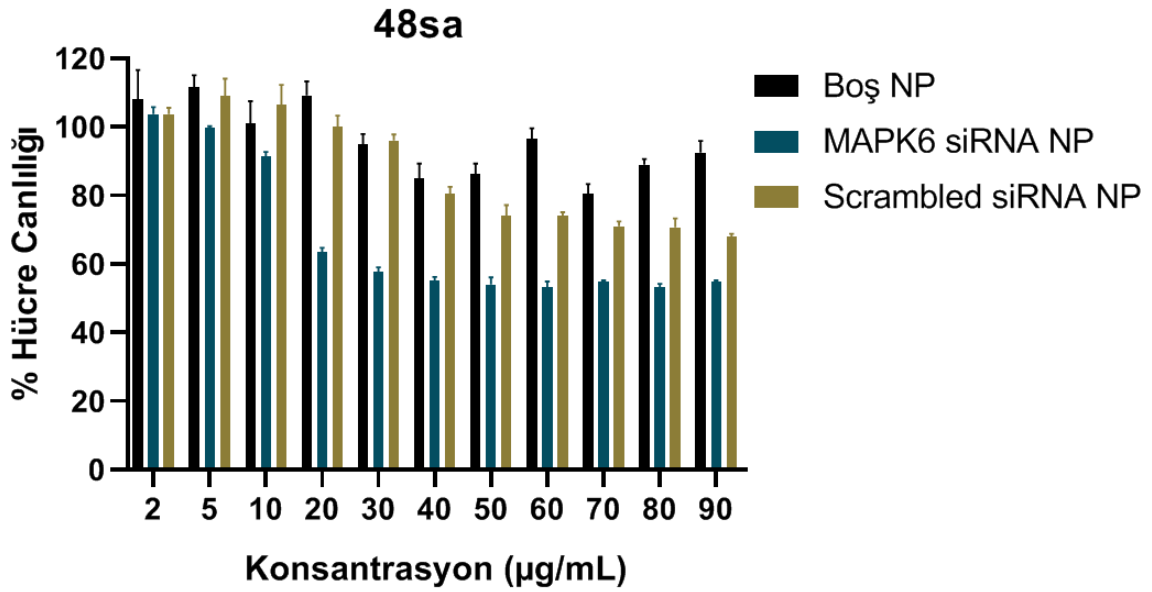
Uygulanan PLGA nanopartiküllerinin, MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, kantitatif olarak hücrenin metabolik aktivitesini belirleyen kalorimetrik MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT reaktifi, lipofilik yapıda ve pozitif yüklü bir madde olduğundan hücre zarını ve mitokondri iç zarını geçebilmektedir. Sarı renkli MTT reaktifi, canlı hücrelerin mitokondrilerinde aktif halde olan süksinat dehidrojenaz enzimi

ile mor renkli formazan kristallerine indirgenir [102, 103]. MTT testi ile hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. Ardından, ileriki çalışmalarda uygulanacak dozu tespit etmek adına uygulama gruplarına ait IC₄₀ (%40 inhibe edici konsantrasyon) değerleri belirlenmiştir. Yirmi dört ve 48 saat muamele sonrası farklı konsantrasyonlarda belirlenen hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18 MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre canlılıkları (%). Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 4)

Şekil 4.18'de farklı konsantrasyonlarda (2-90 µg/mL) MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP ile 24 saat muamele edildikten sonra belirlenen MCF-7 hücre canlılık oranları verilmiştir. Yirmi dört saat muamele sonrası, MAPK6 siRNA NP için IC₄₀ değeri 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP ve boş NP için ise, hücre canlılığı %60'ın altına inmediğinden dolayı IC₄₀ değeri belirlenememiştir.



Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerine 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre canlılıkları (%). Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 4)

Şekil 4.19’da farklı konsantrasyonlarda (2-90 µg/mL) MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP ile 48 saat muamele edildikten sonra belirlenen MCF-7 hücre canlılık oranları verilmiştir. Kırk sekiz saat muamele sonrası, MAPK6 siRNA NP için IC₄₀ değeri 30 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP ve boş NP için ise, hücre canlılığı %60’ın altına inmediğinden dolayı IC₄₀ değeri belirlenememiştir.

MCF-7 hücreleri 2 – 90 µg/mL konsantrasyon aralığında MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP ile ayrı ayrı 24 ve 48 saat boyunca muamele edildikten sonra, hücre canlılığında %50 düzeyinde azalma meydana gelmemiştir. Bu nedenle, %50 inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀) belirlenememiş, bunun yerine IC₄₀ belirlenmiştir. Flieswasser T. ve arkadaşları, küçük hücreli akciğer kanserinde kemoterapötik ajanların etkisini değerlendirdikleri çalışmada; Dukaew N. ve arkadaşları ise, NF-κB inhibitörünün küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin canlılığına etkisini değerlendirdikleri çalışmada IC₄₀ değerini belirleyerek etken maddelerini bu konsantrasyonda uygulamışlardır [104, 105].

MCF-7 hücre hattına 2 – 90 µg/mL konsantrasyon aralığında boş NP uygulamasının 24 saat sonunda hücre canlılığını %75’in altına düşürmediği, 48 saat sonunda ise %77’nin altına düşürmediği belirlenmiştir. Bu nedenden ötürü IC₄₀ değeri boş PLGA NP için belirlenememiştir. Bu bulgular, literatürde yer alan diğer çalışmalar sonucu elde edilen bulgular ile uyumludur. Boş PLGA nanopartiküllerinin, hücrelerde çok yüksek

konsantrasyonlara dek ciddi sitotoksik etki göstermesi beklenmemektedir [106, 107]. Bu durumun, PLGA partiküllerinin terapötik maddelerin taşınmasında sıklıkla tercih edilmesinde büyük payı vardır. Trif, M. ve arkadaşlarının COLO 205 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattında gerçekleştirdikleri çalışma, boş PLGA nanopartiküllerinin 2500 µg/mL konsantrasyona dek insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinde sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur [106].

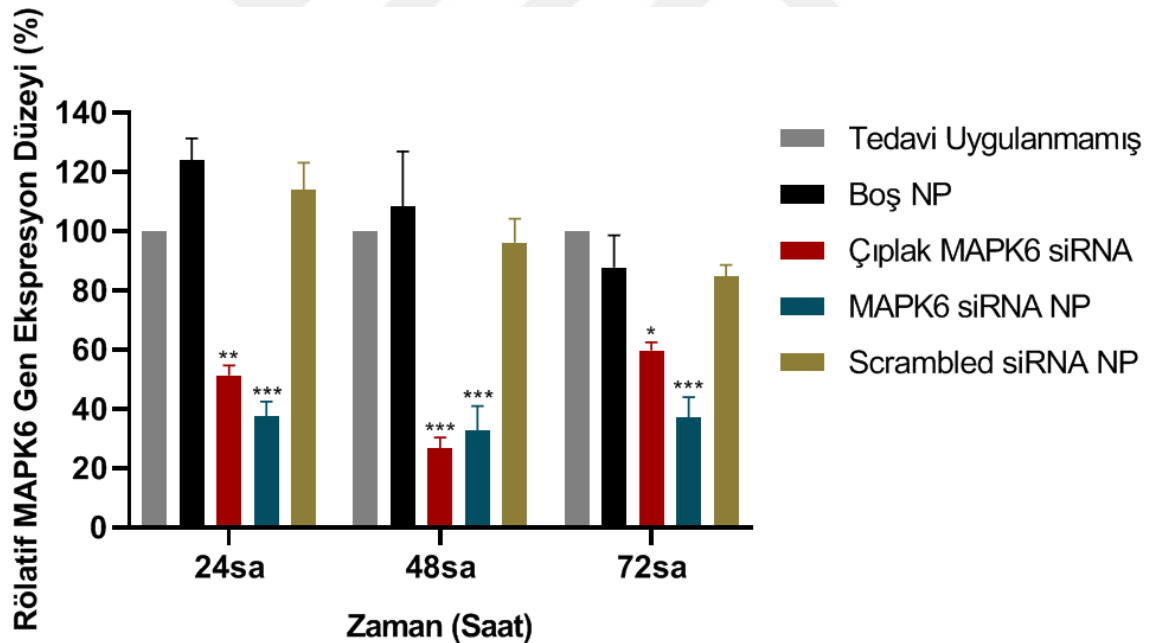
MCF-7 hücre hattına 2 – 90 µg/mL konsantrasyon aralığında *scrambled* siRNA NP uygulamasının 24 saat sonunda hücre canlılığını %67'nin altına düşürmediği, 48 saat sonunda ise %68'in altına düşürmediği belirlenmiştir. Bu nedenden ötürü IC₄₀ değeri *scrambled* siRNA NP için belirlenememiştir.

MCF-7 hücre hattına 2 – 90 µg/mL konsantrasyon aralığında MAPK6 siRNA NP uygulandıktan 24 saat sonra hücre canlılık durumu incelendiğinde, 20 µg/mL uygulama sonrası hücre canlılık oranının %57'ye düştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla, 20 µg/mL 24 saat MAPK6 siRNA NP uygulaması için IC₄₀ değeri olarak belirlenmiştir ve 24 saat süreli uygulamalarda kullanılacak konsantrasyon olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattına 2 – 90 µg/mL konsantrasyon aralığında MAPK6 siRNA NP uygulamasının 48 saat sonunda hücre canlılık durumu incelendiğinde ise, 30 µg/mL uygulama sonrası hücre canlılık oranının %58'e düştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla, 30 µg/mL 48 saat MAPK6 siRNA NP uygulaması için IC₄₀ değeri olarak belirlenmiştir ve 48 saat süreli uygulamalarda kullanılacak konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 20 µg/mL *scrambled* siRNA NP uygulandıktan 24 saat sonra MCF-7 hücre canlılık oranı %82; 30 µg/mL *scrambled* siRNA NP uygulandıktan 48 saat sonra MCF-7 hücre canlılık oranı ise %96 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, eşit konsantrasyonlarda farklı siRNA molekülü yüklü PLGA nanopartikül uygulaması sonrası MCF-7 hücrelerinde gözlemlenen sitotoksik etkinin farklı olmasında yüklenen siRNA molekülünün dizisi etkin rol oynuyor olabilir.

Boş NP ve *scrambled* siRNA NP'leri için IC₄₀ değeri belirlenemediğinde dolayı, çalışma boyunca gerçekleştirilen diğer analizlerde etken maddeye dayalı etkiyi görmek adına MAPK6 siRNA NP IC₄₀ değerleri baz alınarak 24 saat muamele için 20 µg/mL ve 48 saat muamele için ise 30 µg/mL bu maddeler için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA dozu ise, IC₄₀ değerleri hesaplanan MAPK6 siRNA NP'nin enkapsülasyon etkinliğine ve *in vitro* salım değerlerine göre hesaplanmıştır. 24 saat muamele için 2,77 nM, 48 saat muamele için ise 4,155 nM çıplak MAPK6 siRNA uygun doz olarak belirlenmiştir.

4.5 MAPK6 Gen Ekspresyon Analizi

MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikül uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hedef *MAPK6* gen ekspresyonunu baskılayıp baskılamadığı, RT-PCR ile değerlendirilmiştir. RT-PCR, hedef genin ekspresyon düzeyini ölçmek için oldukça etkili ve sık kullanılan bir tekniktir [108]. RT-PCR, hedef gen *MAPK6* ve referans gen *GAPDH* primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası, elde edilen Ct değerlerinin analizi delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tedavi uygulanan grupta belirlenen hedef gen ekspresyonu, tedavi uygulanmamış grupta belirlenen hedef gen ekspresyonuna göre rölatif olarak kıyaslanacağından, bu analiz için uygun ve yaygın yöntemlerden biri olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi tercih edilmiştir [109]. Bu yöntem ile 24, 48 ve 72 saat muamele sonrası belirlenen rölatif *MAPK6* gen ekspresyon değerleri, çalışmanın kontrol grubu olan tedavi uygulanmamış grubun rölatif gen ekspresyon değerleri %100 varsayılarak yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan rölatif gen ekspresyon yüzdeleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20 MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve scrambled siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen rölatif *MAPK6* gen ekspresyon yüzdeleri. Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Öncelikle, MCF-7 hücrelerinin tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış kontrol), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve scrambled siRNA NP ile 24 saat

muamelesi sonrası rölatif *MAPK6* gen ekspresyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %123,7 olarak belirlenmiştir. Çıplak *MAPK6* siRNA uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %51,2 olarak belirlenmiştir. *MAPK6* siRNA NP uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %36,5 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %112,9 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerindeki *MAPK6* gen ekspresyonu ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki *MAPK6* gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak,  ıplak *MAPK6* siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* gen ekspresyonunun, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). *MAPK6* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* gen ekspresyonunun da, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Ardından, MCF-7 hücrelerinin tamamlanmış besiyer, boş NP,  ıplak *MAPK6* siRNA, *MAPK6* siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 48 saat muamelesi sonrası rölatif *MAPK6* gen ekspresyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %106,5 olarak belirlenmiştir. Çıplak *MAPK6* siRNA uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %26,6 olarak belirlenmiştir. *MAPK6* siRNA NP uygulanan grupta *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %31,3 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise *MAPK6* rölatif ekspresyon düzeyi %96,1 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerindeki *MAPK6* gen ekspresyonu ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki *MAPK6* gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çıplak *MAPK6* siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* gen ekspresyonunun ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde, *MAPK6* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* gen ekspresyonunun da, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Son olarak ise, MCF-7 hücrelerinin tamamlanmış besiyer, boş NP,  ıplak *MAPK6* siRNA, *MAPK6* siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 72 saat muamelesi sonrası rölatif *MAPK6* gen ekspresyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta *MAPK6*

rölatif ekspresyon düzeyi %87,2 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta MAPK6 rölatif ekspresyon düzeyi %59,8 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta MAPK6 rölatif ekspresyon düzeyi %37 olarak belirlenmiştir. Scrambled siRNA NP uygulanan grupta ise MAPK6 rölatif ekspresyon düzeyi %84,7 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 gen ekspresyonu ile boş NP uygulanan ve scrambled siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Aksine, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde MAPK6 gen ekspresyonunun, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde MAPK6 gen ekspresyonunun ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası, boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve scrambled siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen rölatif MAPK6 ekspresyon düzeyleri ile tedavi uygulanmamış kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde belirlenen rölatif MAPK6 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgular, boş PLGA nanopartiküllerinin ve scrambled siRNA molekülünün hedef genin ekspresyonuna anlamlı düzeyde etki etmesi beklenmediğinden, teorik olarak beklenen sonuçlardır. Ayrıca, literatürde yer alan boş nanopartikül, scrambled siRNA ve scrambled siRNA yüklü nanopartikül uygulaması sonrası, hedef gen ekspresyonunda anlamlı değişim gözlenmeyen çalışmaların sonuçları ile örtüşmektedir [110-112]. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla MAPK6 gen ekspresyonunun 24 saat sonunda %48,8, 48 saat sonunda %73,4 ve 72 saat sonunda %40,2 baskılandığı belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla MAPK6 gen ekspresyonunun 24 saat sonunda %63,5, 48 saat sonunda %68,7 ve 72 saat sonunda %63 baskılandığı belirlenmiştir. Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası istatistiksel olarak farklı düzeylerde anlamlı baskılama gerçekleşen gruplarda etken madde, MAPK6 genini hedefleyen siRNA molekülüdür. siRNA molekülleri, dizi olarak spesifik dizayn edildikleri genin ekspresyonunu geri dönüşümlü bir biçimde baskılamaktadır [111, 113]. Bu nedenle, MAPK6 geninin MAPK6 siRNA ile baskılanması beklenen durumdur. Literatürde yer alan sonuçlarda, çıplak siRNA ile hedef gen baskılamanın oldukça sınırlı kaldığı görülmektedir [111, 114, 115]. Bu durumda,

hücre zarının negatif yüklü siRNA molekülüne karşı düşük geçirgenliği, siRNA moleküllerinin kısa yarı ömürleri ve enzimatik aktiviteye karşı korumasız yapısı rol alıyor olabilir [111, 116].

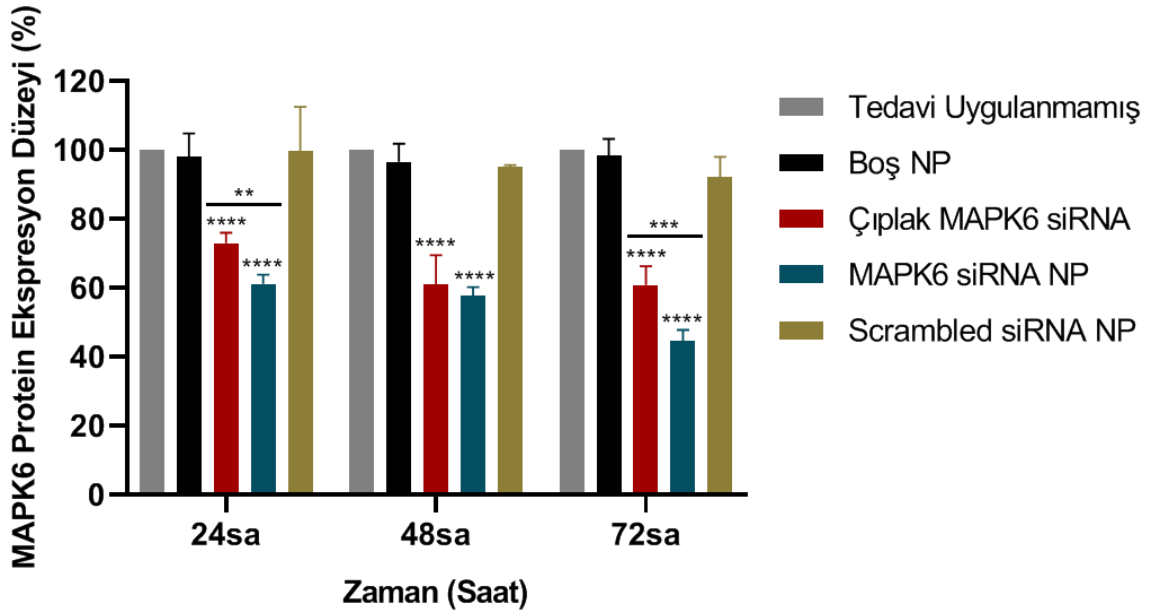
Nelson C.E. ve arkadaşlarının fare deri altı implantlarında gerçekleştirdikleri çalışma, boş nanopartikül ve *scrambled* siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının, hedef gen PPIB ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; PPIB siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, PPIB gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [110]. Khan A.A. ve arkadaşlarının fare karaciğer hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA yüklü nanopartikül ve çıplak survivin siRNA uygulamasının, hedef gen survivin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; survivin siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, survivin gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [111]. Rebollo J. ve arkadaşlarının PC-3 prostat kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA uygulamasının, hedef gen ESM1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; ESM1 siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, ESM1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [112]. Aval S.F. ve arkadaşlarının akciğer kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, çıplak hTERT siRNA uygulamasının, hedef gen hTERT ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmadığını; hTERT siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, hTERT gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [114]. Salimifard S. ve arkadaşlarının 4T1 meme kanseri ve CT26 kolon kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma ise, boş nanopartikül ve çıplak IL-6 siRNA uygulamasının, hedef gen IL-6 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; IL-6 siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, IL-6 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [115].

Bu çalışmada, MAPK6 siRNA NP uygulaması, 24 ve 72 saat muamele sonrası, *MAPK6* gen ekspresyonunu baskılamada çıplak MAPK6 siRNA'ya kıyasla daha etkili olmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. MAPK6 siRNA NP uygulaması, 24, 48 ve 72 saat sonunda *MAPK6* gen ekspresyonunu birbirine benzer düzeyde baskılamıştır. Bu durum, PLGA nanopartiküllerinin sergilediği kontrollü salıma ve partiküler yapının siRNA molekülüne sağladığı korumaya bağlı olabilir. Çıplak

MAPK6 siRNA uygulaması ise 48 saat sonunda en yüksek etkiyi göstermiştir ancak 72 saat sonunda bu etki radikal şekilde azalmıştır. Bunun nedeni, molekülün kısa yarı ömrü veya molekülün enzimatik degradasyonu olabilir. Elde edilen tüm bu bulgular, MAPK6 siRNA molekülünün *MAPK6* gen ekspresyonunu başarılı bir biçimde baskıladığını göstermektedir.

4.6 MAPK6 Protein Ekspresyon Analizi

MAPK6 gen ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanmasının *MAPK6* protein düzeyine yansımaları, ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. ELISA yöntemi, hücre lizatı gibi karışık örneklerde hedef proteinin konsantrasyonunun hassas ve hızlı bir biçimde belirlenmesine olanak sağlamaktadır [117]. Bu yöntem ile 24, 48 ve 72 saat muamele sonrası elde edilen *MAPK6* protein ekspresyon değerleri, çalışmanın kontrol grubu olan tedavi uygulanmamış grubun protein ekspresyon değerleri %100 varsayılarak yüzdesel olarak belirlenmiştir. Belirlenen *MAPK6* protein ekspresyon yüzdeleri Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21 MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak *MAPK6* siRNA, *MAPK6* siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen *MAPK6* protein ekspresyon yüzdeleri.

Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). **p<0,01; ***p<0,001;

****p<0,0001

Yirmi dört saat muamele sonrası, ELISA yöntemi ile belirlenen MAPK6 protein seviyeleri yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %98,1 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %73,1 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %61,3 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise MAPK6 protein seviyesi %99,7 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesi ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde MAPK6 protein seviyesinin ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Ek olarak, MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesinin, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesinden ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$).

Benzer şekilde, 48 saat muamele sonrası, ELISA yöntemi ile belirlenen MAPK6 protein seviyeleri yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %96,7 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %61 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %57,8 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise MAPK6 protein seviyesi %95 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesi ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde MAPK6 protein seviyesinin ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$).

Son olarak, 72 saat muamele sonrası, ELISA yöntemi ile belirlenen MAPK6 protein seviyeleri yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %109,3 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %60,9 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta MAPK6 protein seviyesi %44,7 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise MAPK6 protein seviyesi %92,2 olarak belirlenmiştir. Tedavi uygulanmamış

MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesi ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde MAPK6 protein seviyesinin ise, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Buna ek olarak, MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesinin, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MAPK6 protein seviyesinden ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

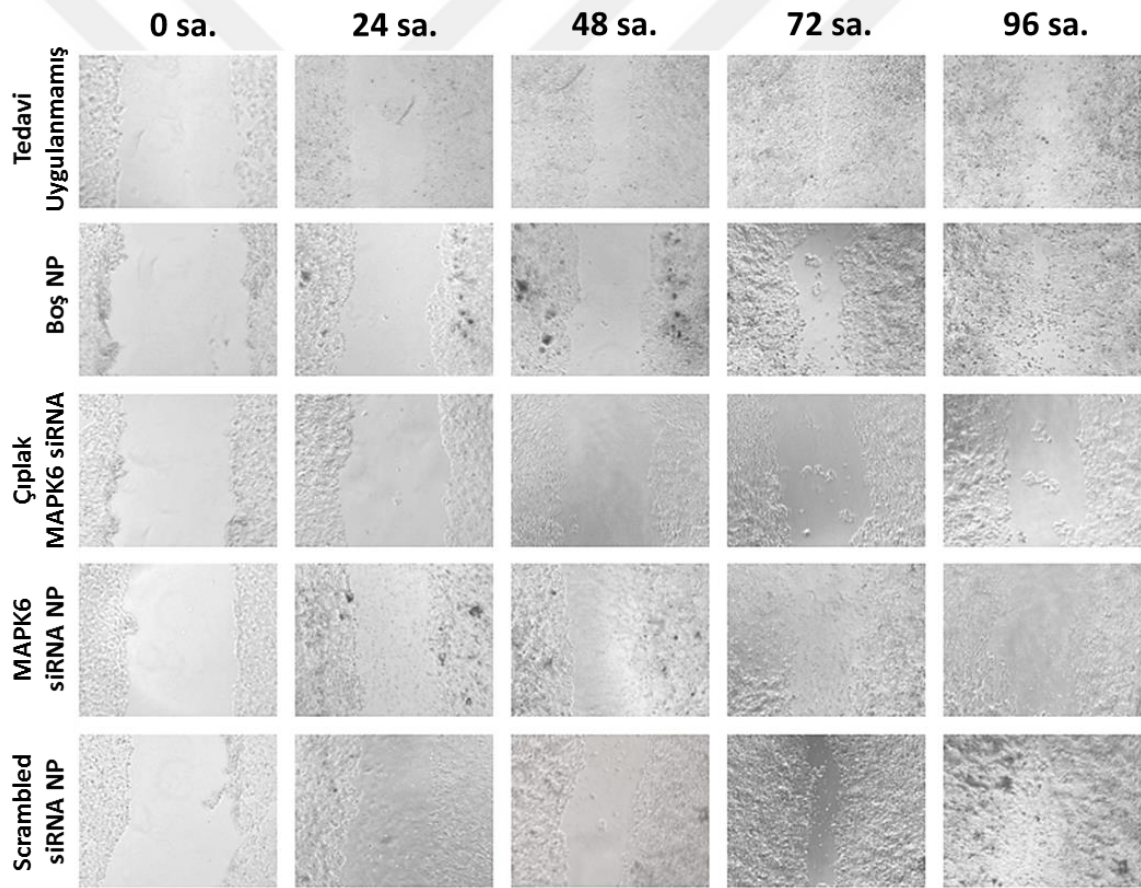
Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası, boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen MAPK6 protein seviyeleri ile tedavi uygulanmamış kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde belirlenen MAPK6 protein seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu uygulama gruplarında *MAPK6* gen ekspresyon düzeylerinde de anlamlı bir değişim gözlenmediğinden, bu sonuçlar gen ekspresyon analiz sonuçları ile tutarlıdır ve teorikte beklenen sonuçlardır. Ek olarak, literatürde yer alan çalışmaların sonuçları ile de örtüşmektedir [112, 113, 115, 116]. MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde, tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerine kıyasla MAPK6 protein seviyelerinin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulamasının *MAPK6* gen ekspresyonunu 24, 48 ve 72 saat sonra ileri düzeyde anlamlı olarak baskıladığı belirlendiğinden, MAPK6 protein seviyesinin de ileri düzeyde anlamlı olarak azalması beklenen sonuçtur ve gen ekspresyon analiz sonucu ile örtüşmektedir. Ayrıca, literatürde yer alan çalışmaların sonuçları ile de örtüşmektedir [113, 115, 116]. Çıplak MAPK6 siRNA uygulamasının da *MAPK6* gen ekspresyonunu 24, 48 ve 72 saat sonra farklı düzeylerde anlamlı olarak baskıladığı belirlendiğinden MAPK6 protein seviyesinin de ileri düzeyde anlamlı olarak azalması beklenen sonuçtur. Bu sonuç, gen ekspresyon analiz sonucu ile örtüşmektedir. Literatürde yer alan benzer çalışmalarda ise çıplak siRNA uygulaması sonrası hedef protein seviyesinde azalma oldukça sınırlı kalmıştır ve genel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmemiştir [115, 116]. Bunun sebebi, çıplak siRNA molekülü uygulamasının verimsiz olması veya ilgili proteinin yarı ömrünün nispeten daha uzun olması nedeniyle, belirli süreli uygulama sonrası post-transkripsiyonel baskılamanın protein seviyesinde etkisinin görülememesi olabilir.

Rebollo J. ve arkadaşlarının PC-3 prostat kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA uygulamasının, hedef ESM1 protein ekspresyonunda istatistiksel anlamlı bir değişime yol açmadığını, ESM1 siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, ESM1 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [112]. Strand M.S. ve arkadaşlarının CT26 kolon kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının, hedef KRAS protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; KRAS siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, KRAS protein ekspresyonunda ciddi azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [113]. Salimifard S. ve arkadaşlarının 4T1 meme kanseri ve CT26 kolon kanseri hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışma, boş nanopartikül ve çıplak IL-6 siRNA uygulamasının, hedef IL-6 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; IL-6 siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, IL-6 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [115]. Alshamsan A. ve arkadaşlarının dendritik hücrelerde gerçekleştirdikleri çalışma ise, çıplak STAT3 siRNA ve *scrambled* siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının, hedef STAT3 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; STAT3 siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise, STAT3 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [116].

Bu çalışmadaki hedef protein MAPK6, oldukça kararsız bir proteindir. Bu nedenle, diğer MAPK'lerin aksine MAPK6'nın yarı ömrü oldukça kısadır ve yaklaşık 30 dakikadır [118]. MAPK6 protein seviyeleri açısından, MAPK6 siRNA NP uygulaması ile çıplak MAPK6 siRNA uygulaması arasında 48 saat muamele sonrası anlamlı bir fark gözlenmemiştir ancak 24 ve 72 saat muamele sonrası ileri düzeyde anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, PLGA nanopartiküllerine enkapsüle MAPK6 siRNA moleküllerinin daha yüksek verimle MCF-7 hücreleri tarafından alınması; PLGA nanopartiküllerinin ilk 24 saatte patlama salım ve akabinde kontrollü salım sergilemesi; çıplak siRNA moleküllerinin kısa yarı ömrü veya enzimatik aktiviteye karşı savunmasız olması olabilir. MAPK6 protein seviyelerine dair elde edilen tüm bu bulgular, siRNA aracılı gen ekspresyonu baskılamasının protein seviyesine net olarak ve anlamlı düzeyde yansıdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin, MAPK6 proteininin siRNA aracılı baskılanmasının sağladığı olası antikanser etkilerin test edileceği çeşitli analizler için uygun etkiyi sağladığını göstermiştir.

4.7 Yara İyileşme Deneyi ile Migrasyon Analizi

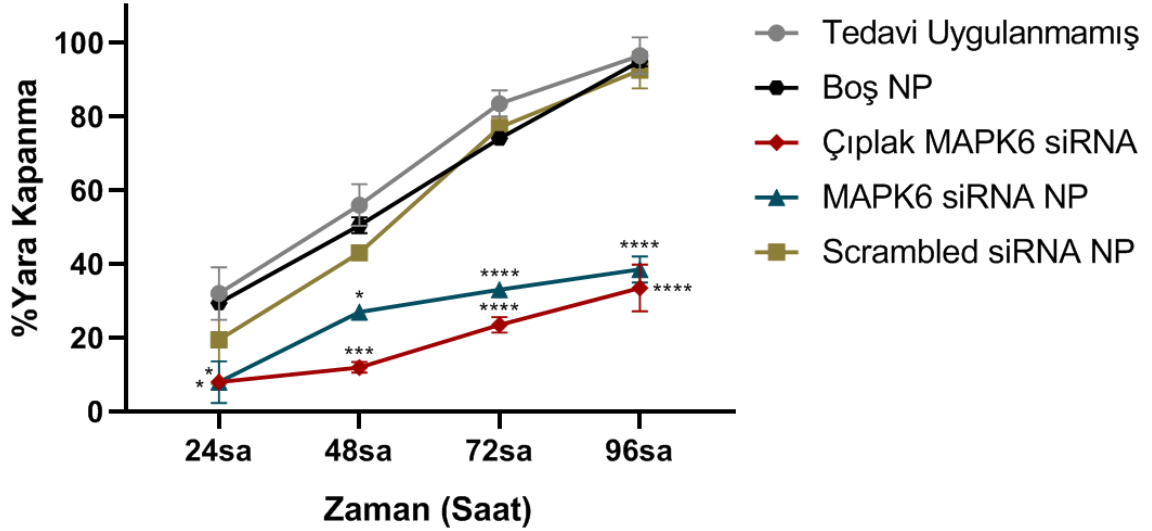
MAPK6 siRNA NP uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin migrasyonuna etkisi, yara iyileşme deneyi (hücre çizik deneyi) ile değerlendirilmiştir. Yara iyileşme deneyi, iki boyutlu olarak hücre migrasyonunu analiz etmeyi sağlayan yaygın ve az maliyetli bir tekniktir. Öncelikle, belirli doluluk oranına ulaşan hücre tabakasında pipet ucu kullanılarak bir yara oluşturulur. Yara oluşturulduğunda ve sonrasında belirli aralıklarla, yara kapanma sürecini izlemek adına mikroskop görüntüsü alınır. Yara kapanma durumuna göre hücrelerin migrasyon oranı değerlendirilir [119, 120]. Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP gruplarında, uygulamadan 0, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra yara alanını gösteren mikroskop görüntüleri Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22 Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde ve boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde oluşturulan yaranın 0., 24., 48., 72. ve 96. saat mikroskop görüntüleri

Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde oluşturulan yaranın 72 saat sonuna dek giderek daraldığı ve 96 saat sonunda ise tamamen kapandığı görülmektedir. Boş NP

uygulanmış MCF-7 hücrelerinde ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde ise benzer şekilde oluşturulan yaranın 72 saat sonuna dek giderek daraldığı ve 96 saat sonunda ise neredeyse kapandığı görülmektedir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış MCF-7 hücrelerinde ve MAPK6 siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde ise yaranın 96 saat sonunda yalnızca bir miktar daraldığı görülmektedir. Her bir grup için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, hesaplanan yüzde yara kapanma verileri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23 Tedavi uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde ve boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış MCF-7 hücrelerinde yara kapanma yüzdesinin zamana bağlı değişimi. Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda yara kapanma oranı: Tedavi uygulanmamış grupta %32, boş NP uygulanmış grupta %29,5, çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış grupta %8, MAPK6 siRNA NP uygulanmış grupta %8 ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış grupta %19,5 olarak belirlenmiştir. Yirmi dört saat sonunda, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranı ile boş NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Çıplak MAPK6 siRNA ve MAPK6 siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranının ise, tedavi uygulanmamış gruptakine kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonunda toplam yara kapanma oranı: Tedavi uygulanmamış grupta %56, boş NP uygulanmış grupta %50,5, çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış grupta

%12, MAPK6 siRNA NP uygulanmış grupta %27 ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış grupta %43 olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranı ile boş NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak çıplak MAPK6 siRNA uygulanan gruptaki yara kapanma oranının, tedavi uygulanmamış gruptakine kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). MAPK6 siRNA NP uygulanan gruptaki yara kapanma oranının ise, tedavi uygulanmamış gruptakine kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF-7 hücrelerinde 72 saat sonunda toplam yara kapanma oranı: Tedavi uygulanmamış grupta %83,5, boş NP uygulanmış grupta %74, çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış grupta %23,5, MAPK6 siRNA NP uygulanmış grupta %33 ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış grupta %77 olarak belirlenmiştir. 72 saat sonunda, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranı ile boş NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çıplak MAPK6 siRNA ve MAPK6 siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranının ise, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranına kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$).

MCF-7 hücrelerinde 96 saat sonunda toplam yara kapanma oranı: Tedavi uygulanmamış grupta %96,5, boş NP uygulanmış grupta %95, çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış grupta %33,5, MAPK6 siRNA NP uygulanmış grupta %38,5 ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış grupta %92,5 olarak belirlenmiştir. 96 saat sonunda, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranı ile boş NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çıplak MAPK6 siRNA ve MAPK6 siRNA NP uygulanan gruplardaki yara kapanma oranının ise, tedavi uygulanmamış gruptaki yara kapanma oranına kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$).

Hücre hareketliliği, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin en temel özelliklerinden bir tanesidir [121]. Hücre migrasyonu, ökaryotik hücrelerin hareketliliği konseptinde büyük pay sahibidir. Hücre migrasyonu sağlıklı hücrelerde kontrol sistemleri aracılığıyla oldukça sıkı bir biçimde düzenlenmiştir [122]. Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, embriyonik gelişim ve immün yanıt geliştirilmesi gibi fizyolojik süreçlerde olmazsa olmaz bir fonksiyona sahiptir [121, 123, 124]. Hücre migrasyonunda anormallik, çeşitli hastalık patolojilerinde gözlenmektedir. Artan hücre migrasyonu, hemen hemen tüm

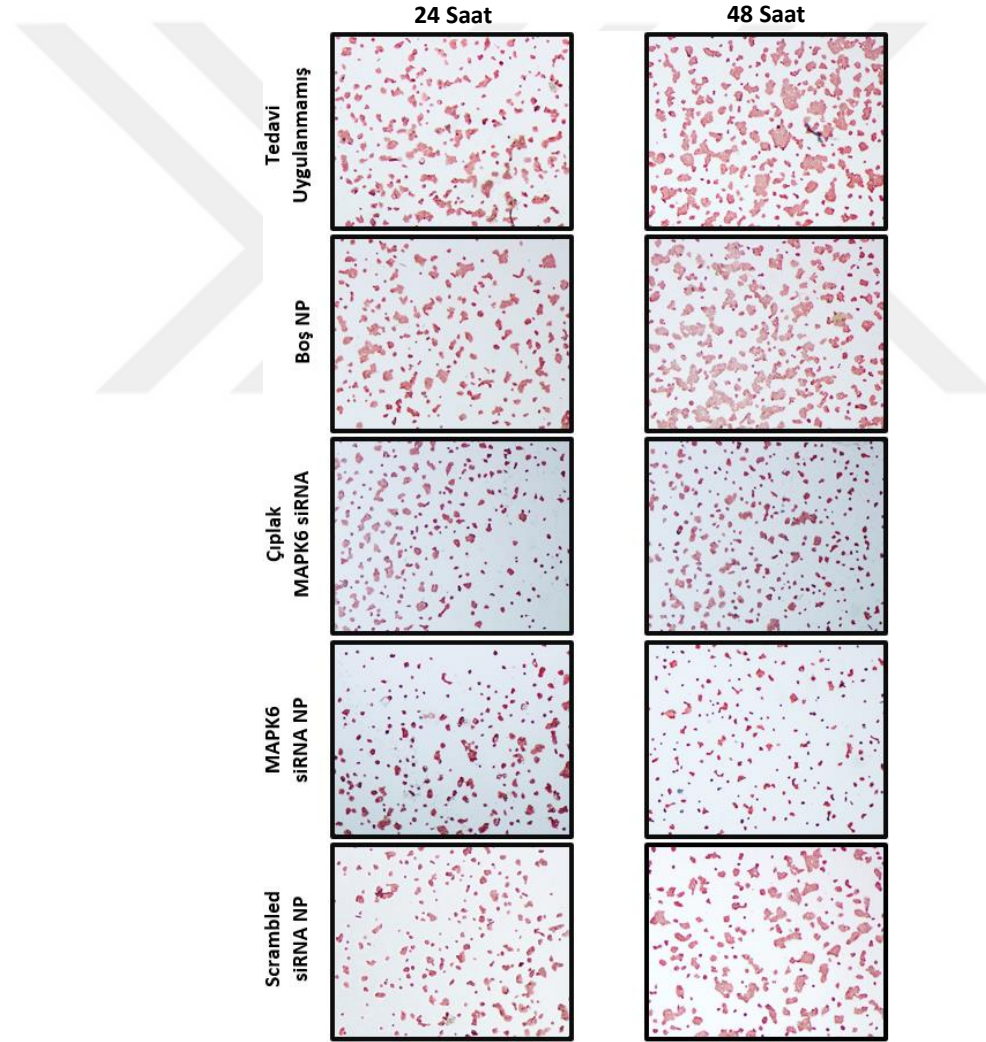
kanser türlerinde görülmektedir ve bu durum metastaz kaynaklı olarak kanserin yayılmasına yol açmaktadır [44, 121, 125]. Dolayısıyla, anormal düzeyde yüksek hücre migrasyonu kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olan, aktive edilmiş invazyon ve metastaz, durumunun temelinde yer almaktadır. Bu nedenle, yeni kanser tedavisi geliştirme çalışmalarında ana odak noktalarından bir tanesi anormal düzey hücre migrasyonunu ortadan kaldırmaktır [126, 127].

Tedavi uygulanmamış kontrol grubunda, boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta 96 saat sonunda, yara tüm tekrar gruplarında neredeyse tamamen kapanmıştır. Madde yüklenmemiş boş NP ve hiçbir geni baskılamak için hedeflemeyen diziye sahip *scrambled* siRNA NP uygulamasının meme kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerinde tedavisel bir etki göstermesi beklenmemektedir. Bu nedenle, elde edilen bu bulgular, teorik olarak görülmesi beklenen bulgulardır. Ayrıca, boş PLGA partikülü ve *scrambled* siRNA molekülü uygulamasının, hücre migrasyonuna yönelik bir etki göstermediğini ortaya koyan literatür sonuçları ile de örtüşmektedir [112, 128]. Rebollo J. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA uygulamasının, PC-3 prostat kanseri hücrelerinin migrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; ESM1 siRNA uygulamasının ise, PC-3 hücrelerinin migrasyonunda istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalmaya yol açtığını yara iyileşme deneyi ile ortaya koymuştur [112]. Xiong B. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma ise, boş PLGA mikroküre uygulamasının, A549 akciğer kanseri hücrelerinin migrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını yara iyileşme deneyi ile ortaya koymuştur [128].

Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta ve MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta 96 saat sonunda yara alanında meydana gelen kapanma oldukça sınırlı kalmıştır ve bu iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Elde edilen bu bulgular, PLGA nanopartikülüne enkapsüle ve çıplak MAPK6 siRNA molekülü uygulamasının MCF-7 hücre migrasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. MCF-7 meme kanseri hücre hattında *MAPK6* gen ve protein ekspresyonunun baskılandığının belirlendiği bu gruplarda, hücre migrasyonunun azaldığının belirlenmesi önemlidir. Dolayısıyla tüm bu bulgular, siRNA aracılı *MAPK6* gen ekspresyonu baskılamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin migrasyonunun azalmasına neden olduğunu göstermektedir.

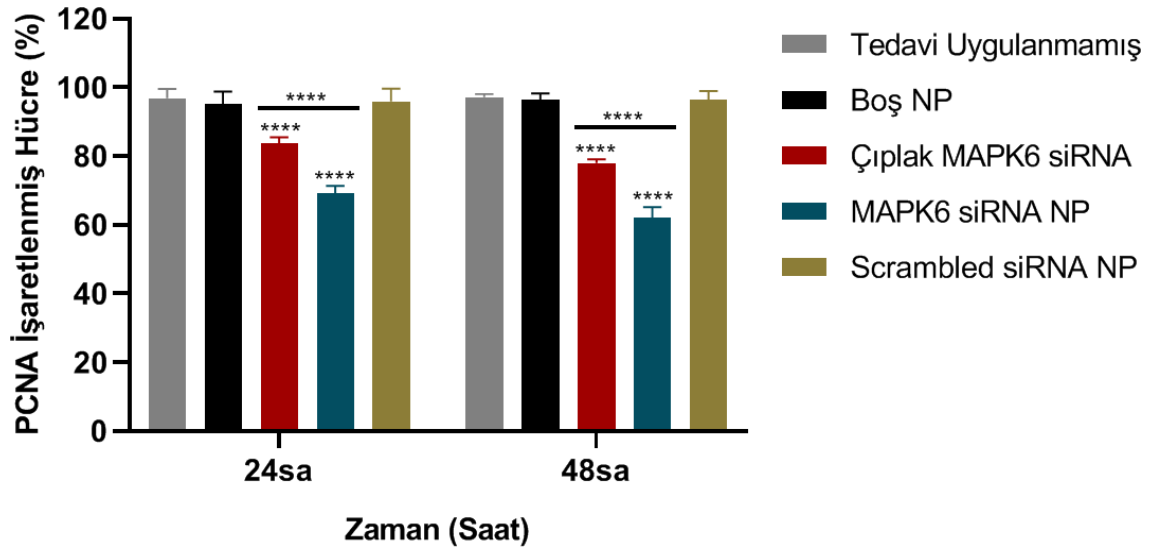
4.8 İmmünotokimyasal PCNA Boyaması ile Proliferasyon Analizi

MAPK6 siRNA NP uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisinin değerlendirilmesi için immünotokimyasal PCNA boyaması gerçekleştirilmiştir. PCNA, DNA sentezinin gerçekleşmesi için gerekli bir proteindir ve ekspresyonu geç G1 ve erken S fazı esnasında oldukça artmaktadır. Sessiz hücrelerde ve yaşlanmış hücrelerde düzeyi oldukça düşüktür. DNA sentezini ve bu nedenle proliferasyonu yansıtan PCNA, hücresel proliferasyonun belirlenmesi için bir belirteç olarak kullanılmaktadır [129, 130]. Tamamlanmış besiyer, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 24 ve 48 saat muamele sonrası, PCNA boyaması gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinin, 4X büyütmede kaydedilmiş ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24 Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 24 ve 48 saat muamele sonrası immünotokimyasal PCNA boyaması gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinin 4X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri

Tedavi uygulanmamış, boş NP uygulanmış ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış lamellerde 24 ve 48 saat muamele sonrası neredeyse tamamen PCNA ile işaretlenmiş kırmızı renkli MCF-7 hücreleri yer aldığı görülmektedir. MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış lamellerde ise çok sayıda bulunan PCNA ile işaretlenmiş kırmızı MCF-7 hücrelerine ek olarak, işaretlenmemiş mavi renkli MCF-7 hücreleri de görülmektedir. Her grup için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, hesaplanan PCNA işaretlenmiş MCF-7 hücre sayısı (%) ortalaması Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25 MCF-7 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen PCNA işaretlenmiş hücre yüzdesi. Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). ****p<0,0001

Yirmi dört saat muamele sonrası, immünohistokimyasal PCNA boyaması ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, MCF-7 hücrelerinin %96,9'u PCNA ile işaretlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %95'i PCNA ile işaretlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %83,6'sı PCNA ile işaretlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %69,3'ü PCNA ile işaretlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %96'sı PCNA ile işaretlenmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinin ise, tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Ayrıca, MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinden ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,0001$).

Benzer bir şekilde, 48 saat muamele sonrası, immünohistokimyasal PCNA boyaması ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, MCF-7 hücrelerinin %97,2'si PCNA ile işaretlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %96,3'ü PCNA ile işaretlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %78'i PCNA ile işaretlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %62,1'i PCNA ile işaretlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, MCF-7 hücrelerinin %96,3'ü PCNA ile işaretlenmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinin ise, tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Ayrıca, MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinden ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,0001$).

Hücre proliferasyonu sağlıklı hücrelerde çeşitli kontrol mekanizmaları ile sıkı bir şekilde denetlenmekte ve düzenlenmektedir [131]. Kanser hücreleri ise, ayırt edici özellikleri arasında yer alan sürekli proliferatif sinyalleşme yeteneğine ve ek olarak büyümelerini engelleyici dış sinyallerden kaçınma yeteneğine sahiptirler [45, 131]. Anormal düzeyde hücre proliferasyonu, kanserleşmenin başlangıcında ve ilerlemesinde ciddi pay sahibidir. Bu mantıktan yola çıkarak tasarlanan sitotoksik kanser ilaçları, yüksek düzeyde proliferatif olan hücreleri hedefleyerek ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Ancak bu ilaçlar ile gerçekleştirilen tedavi esnasında, yüksek düzeyde proliferatif olan sağlıklı deri ve saç hücreleri de olumsuz etkilenmektedir [132]. Kanser tedavisine yönelik yeni ilaç

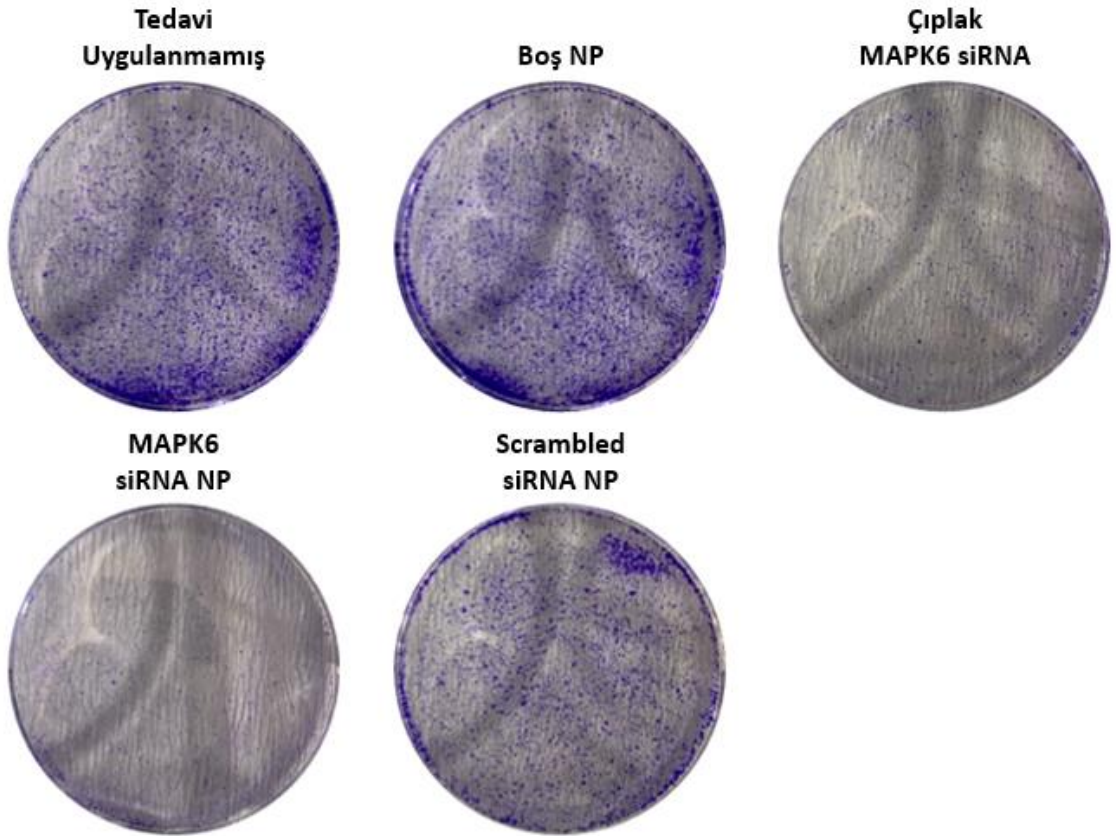
denemelerinde, ilaçların kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi de farklı yöntemlerle test edilmektedir ve ilaçların hücre proliferasyonunu baskılaması beklenmektedir [133].

Yirmi dört ve 48 saat muamele sonrası, tedavi uygulanmamış kontrol grubunda bulunan proliferere MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta bulunan proliferere MCF-7 hücre yüzdeleri oldukça yüksek ve benzer bulunmuştur. Boş NP uygulamasının ve *scrambled* siRNA NP uygulamasının kanser hücrelerinin yüksek proliferasyonuna yönelik bir etki sağlaması beklenmediğinden bu bulgular teorik olarak beklenen bulgulardır ve literatür ile örtüşmektedir [134-136]. Xu C. ve Zheng J.'nin gerçekleştirdiği çalışma, TSG101 siRNA uygulamasının, A498 ve 786-O renal hücreli karsinom hücrelerinin proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [134]. Li C. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA uygulamasının, PANC-1 ve BXPC-3 pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; RPL21 siRNA uygulamasının ise, PANC-1 ve BXPC-3 hücrelerinin proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [135]. Zou L. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma ise, boş PLGA nanopartikülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını ortaya koymuştur [136].

MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta ise, 24 ve 48 saat muamele sonrası belirlenen proliferere MCF-7 hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ek olarak, MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta meydana gelen proliferere MCF-7 hücre yüzdesindeki düşüşün, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan gruba kıyasla da ileri düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, PLGA nanopartikülleri aracılı MAPK6 siRNA uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskılamada daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Çıplak MAPK6 siRNA uygulamasının daha verimsiz olmasının nedeni, düşük hücresel alım veya enzimatik yıkım gibi meydana gelmiş olabilecek uygulama zorlukları olabilir [111, 116]. Elde edilen tüm bu bulgular, MAPK6 siRNA molekülü ile *MAPK6* gen ve protein ekspresyonu baskılamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır.

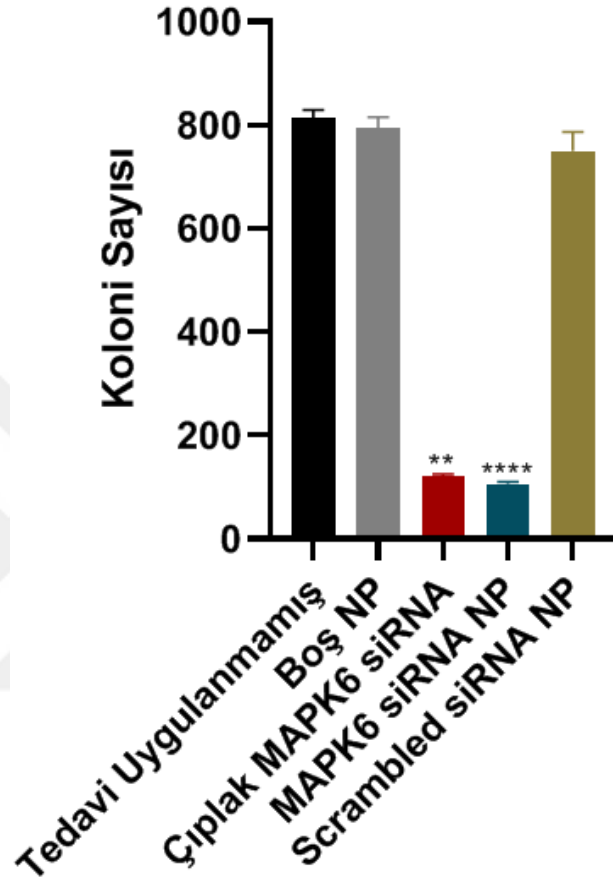
4.9 Koloni Formasyon Analizi

MAPK6 siRNA NP uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi, koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerinin neredeyse tamamı, çevresinde yer alan hücrelerle temas kurarak koloni halinde büyüme eğilimi göstermektedir [137]. Koloni formasyon analizi (klonojenik analiz) ise, bir hücrenin kolonileşme yeteneğine dayanan *in vitro* analiz yöntemidir. Bu yöntem esnasında yıkama işlemleri ile ölü hücreler uzaklaştırılır. Canlı hücreler yüzeye fiks edilerek kristal viyole ile boyanır ve mor renkli bir görüntü sağlar. Belirli sayıda, genel olarak bu sayı 50 olarak kabul edilir, hücre içeren hücre kümeleri koloni olarak adlandırılmaktadır [138-140]. Tedavi uygulanmamış kontrol, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP gruplarında kristal viyole boyamasından sonra kaydedilen koloni görüntüleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26 MCF-7 hücrelerine 8 gün boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra kristal viyole ile boyanan MCF-7 hücre kolonileri

Sekiz gün muamele sonrası, tedavi uygulanmamış, boş NP uygulanmış ve *scrambled* siRNA NP uygulanmış kuyularda oldukça fazla sayıda koloni yer aldığı görülmektedir. MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanmış kuyularda ise az sayıda koloni yapısının yer aldığı görülmektedir. Her bir grup için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, hesaplanan ortalama koloni sayıları Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27 MCF-7 hücrelerine 8 gün boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra belirlenen hücre koloni sayıları. Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). **p<0,01; ****p<0,0001

Tedavi uygulanmamış grupta ortalama koloni sayısı 813 olarak hesaplanmıştır. Boş NP uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 794 olarak hesaplanmıştır. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 120 olarak hesaplanmıştır. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 106 olarak hesaplanmıştır. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ise ortalama koloni sayısı 751 olarak hesaplanmıştır. Tedavi uygulanmamış grupta hesaplanan ortalama koloni sayısı ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta belirlenen ortalama koloni sayıları arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta belirlenen ortalama koloni sayısının ise, tedavi uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta belirlenen ortalama koloni sayısının da, tedavi uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$).

Kanser hücrelerinin sergilediği kolonileşme eğilimi tümörijenезде büyük pay sahibidir ve yüksek sayıda koloni oluşumu kanser hücrelerinin artan proliferasyon ve migrasyon düzeyini gözler önüne sermektedir [137, 141, 142]. Dolayısıyla, kanser tedavisine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında, ilacın kanser hücrelerinin koloni formasyon yeteneğine etkisi test edilmektedir ve bu ilaçların koloni formasyon yeteneğini azaltması beklenmektedir [134, 135, 142].

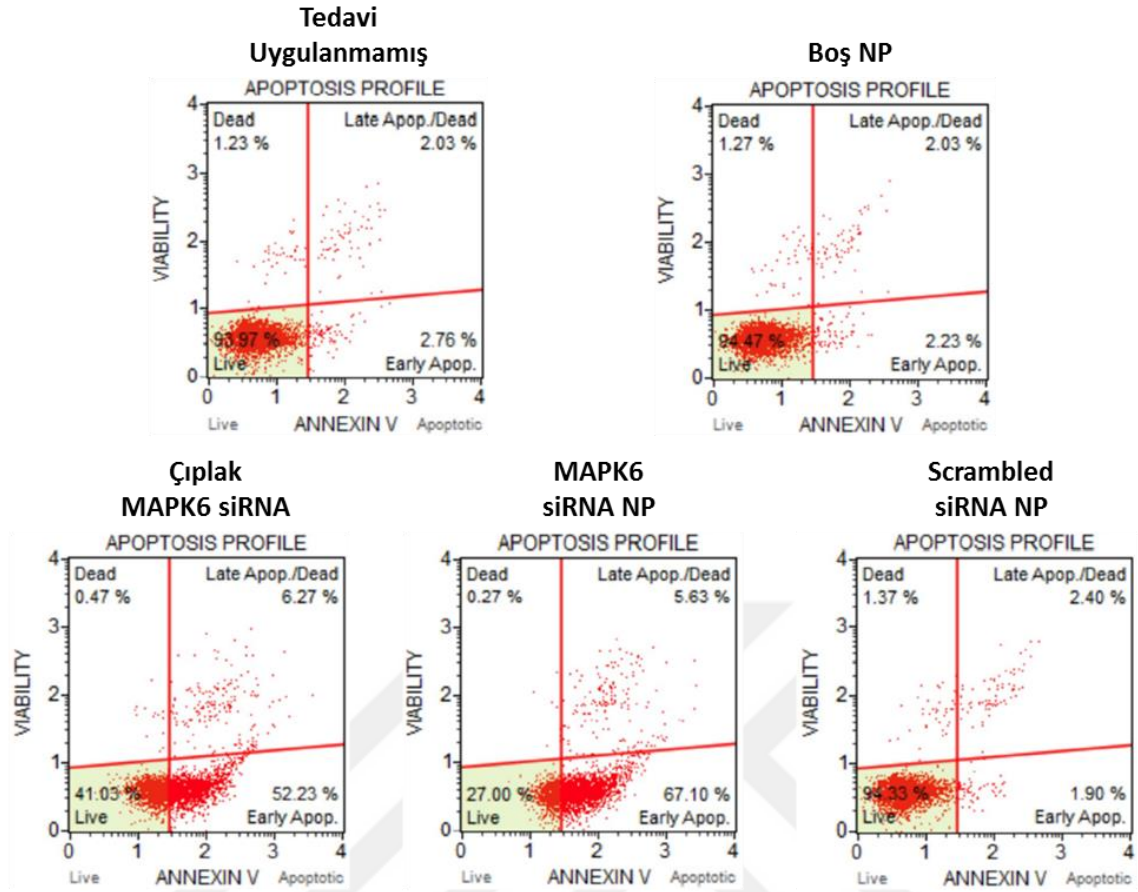
Tedavi uygulanmamış kontrol MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği ile boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinin ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği yüksek ve benzer bulunmuştur. Boş PLGA nanopartikülünün ve herhangi bir geni hedeflemeyen *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün MCF-7 hücreleri üzerinde antikanser etki sergilemesi beklenmediğinden bu bulgular teorikte beklenen bulgulardır. Ek olarak, bulgular literatürde yer alan boş PLGA nanopartikülü ve *scrambled* siRNA uygulaması sonrası kanser hücrelerinin koloni formasyon yeteneğinin test edildiği çalışmaların sonuçları ile de örtüşmektedir [134-136, 143]. Xu C. ve Zheng J.'nin gerçekleştirdiği çalışma, TSG101 siRNA uygulamasının, A498 ve 786-O renal hücreli karsinom hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [134]. Li C. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA uygulamasının, PANC-1 ve BXPC-3 pankreas kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; RPL21 siRNA uygulamasının ise, PANC-1 ve BXPC-3 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [135]. Zou L. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, boş PLGA nanopartikülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını ortaya koymuştur [136]. Qin C. ve Cheng K.'nin gerçekleştirdiği çalışma ise, IKKε siRNA uygulamasının, MCF-7 ve SK-BR-3 meme kanseri hücrelerinin

koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur [143].

Çıplak MAPK6 siRNA ve MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinin ise ciddi düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu iki uygulama grubu arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu bulgular, MAPK6 siRNA molekölü ile *MAPK6* gen ekspresyonu baskılamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon oranını azaltarak koloni oluşturma yeteneğini engellediğini ortaya koymaktadır. Ek olarak, koloni formasyon analiz bulguları, yara iyileşme deneyi ve immünositokimyasal PCNA boyaması bulguları ile de örtüşmektedir ve bu bulguları doğrulamaktadır.

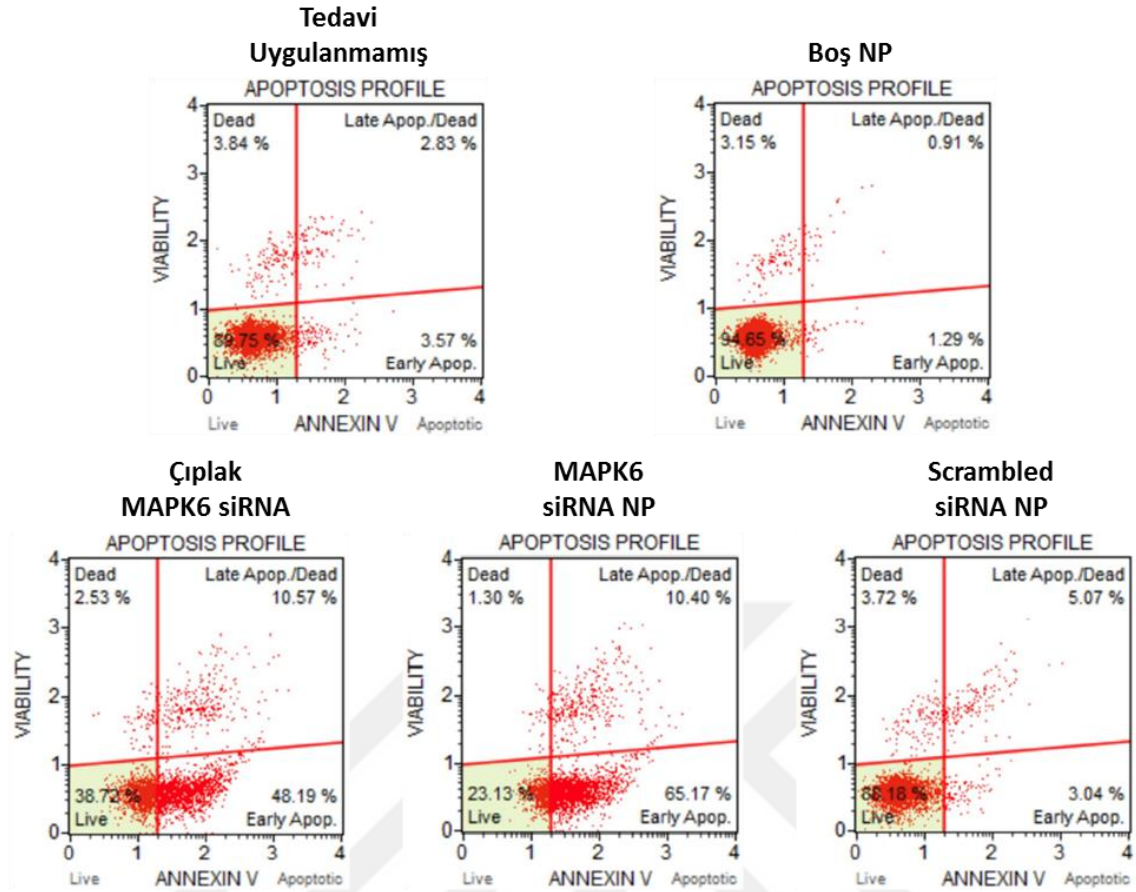
4.10 Akış Sitometrisi ile Apoptoz Analizi

MAPK6 siRNA NP uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptoza yönelmesine etkisi, akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Tüm kanser hücreleri, planlanmış hücre ölümüne (apoptoz) karşı direnç göstermektedir [45]. Apoptoz, hücre zarının kabarcıklanması, hücre büzölmesi, DNA'nın parçalara ayrılması ve iç zar ile sınırlı fosfatidilserinin dışsallaştırılması gibi karakteristik özellikler sergilemektedir [144, 145]. Akış sitometrisinde kullanılan *Muse Annexin V & Dead Cell Assay*, bu dışsallaştırılan fosfatidilserinin belirlenmesine dayanmaktadır [146]. Akış sitometrisi sonucunda, sol altta apoptoza gitmeyen canlı hücreleri; saç altta apoptozun erken evresinde olan hücreleri; saç üstte apoptozun geç evresinde olan ve apoptoz ile ölen hücreleri; sol üstte ise nekroz yoluyla ölen hücreleri gösteren nokta alan grafiği elde edilmektedir. Yirmi dört, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış kontrol), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinin nokta alan grafikleri sırasıyla şekil 4.28, şekil 4.29 ve şekil 4.30'da gösterilmiştir.



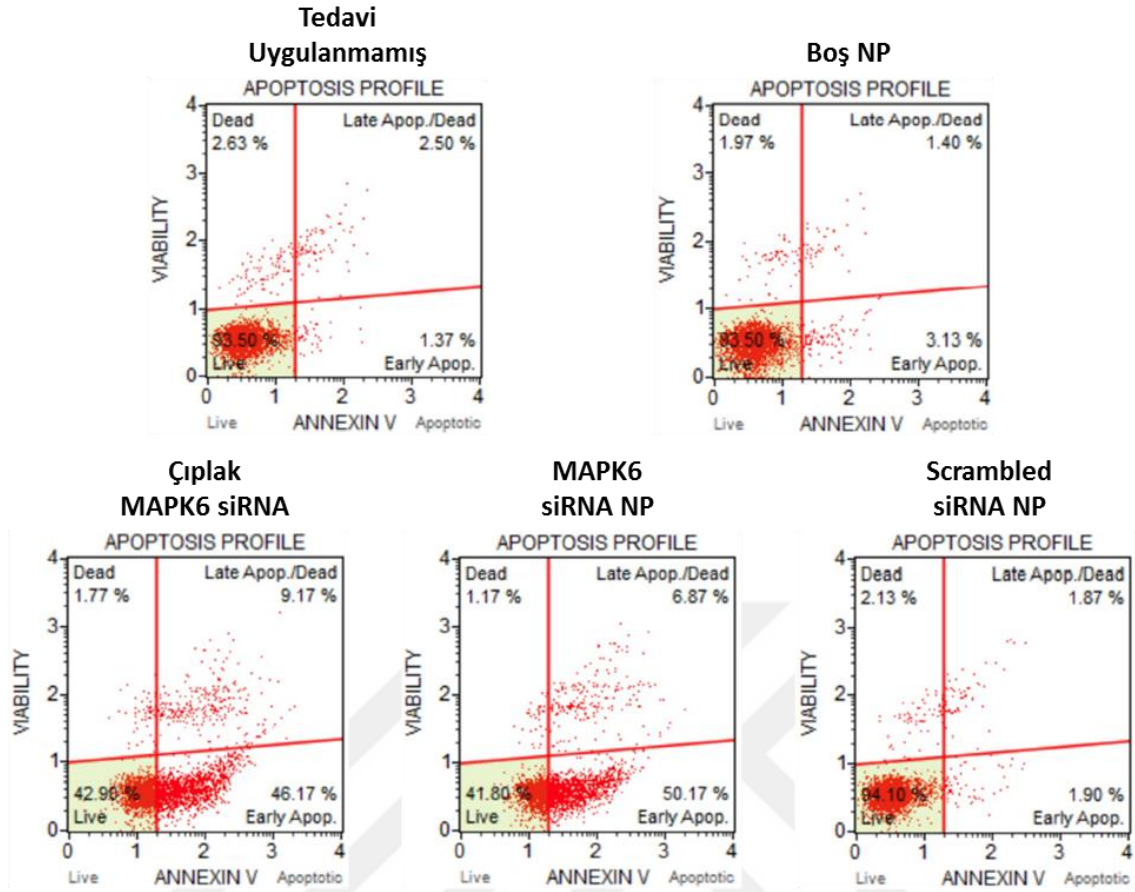
Şekil 4.28 Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri

Yirmi dört saat muamele sonrası, gerçekleştirilen akış sitometrisi sonucunda elde edilen noktasal grafiklerden canlı hücre ve toplam apoptotik hücre yüzdelерinin ortalamaları hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, canlı hücre ortalaması %93,2 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %5,7 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %94,2 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %4,7 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %44,5 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %54,8 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %26,8 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %72,8 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %93,1 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %5,3 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29 Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri

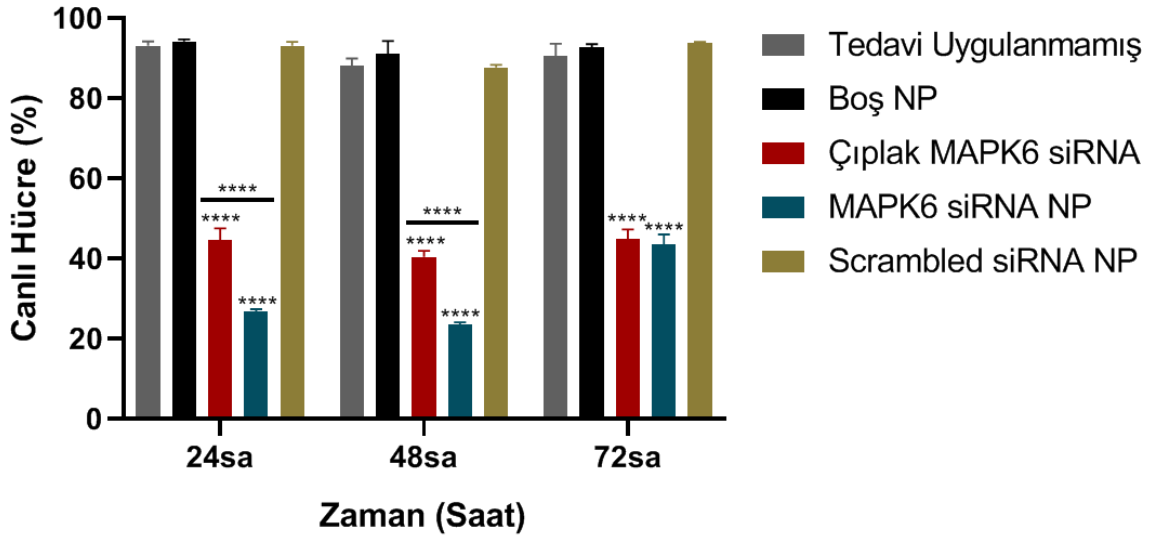
Kırk sekiz saat muamele sonrası, gerçekleştirilen akış sitometrisi sonucunda elde edilen noktasal grafiklerden canlı hücre ve toplam apoptotik hücre yüzdelерinin ortalamaları hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, canlı hücre ortalaması %88,1 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %7,4 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %91,1 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %5,3 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %40,4 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %57,6 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %23,5 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %75,3 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %87,7 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %8,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30 Tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisi sonucu oluşan nokta alan grafikleri

Yetmiş iki saat muamele sonrası, gerçekleştirilen akış sitometrisi sonucunda elde edilen noktasal grafiklerden canlı hücre ve toplam apoptotik hücre yüzdelерinin ortalamaları hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, canlı hücre ortalaması %90,5 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %6,1 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %92,7 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %4,9 olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %44,9 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %53 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %43,6 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %55,1 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, canlı hücre ortalaması %93,7 ve toplam apoptotik hücre ortalaması %3,4 olarak belirlenmiştir.

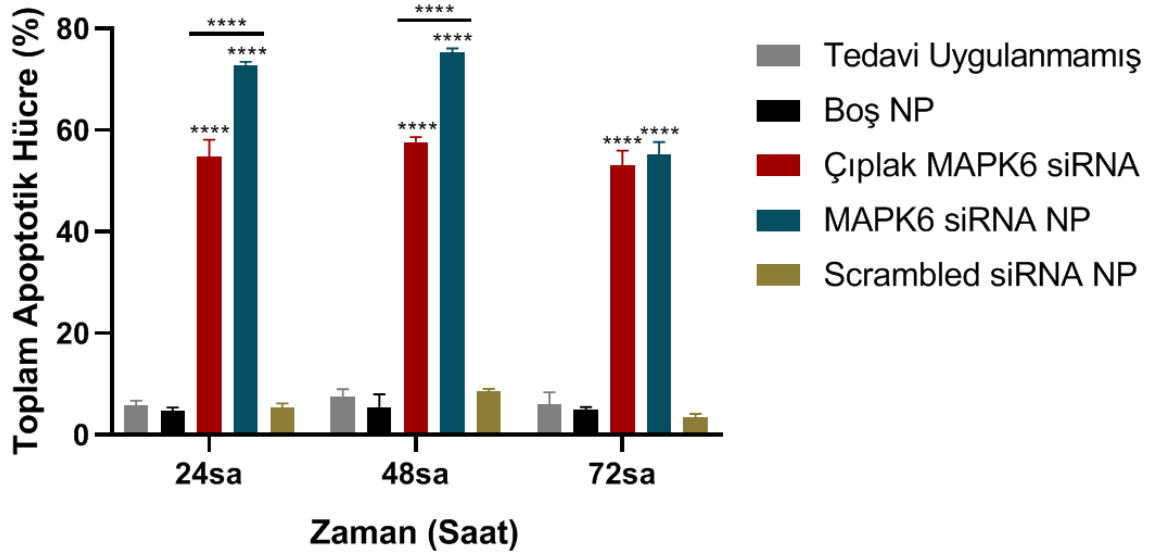
Akış sitometrisi ile 3 ayrı inkübasyon grubu için belirlenen canlı hücre yüzdelерinin ortalamaları ve toplam apoptotik hücre yüzdelерinin ortalamaları sırasıyla Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.31 MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile belirlenen canlı hücre yüzdeleri.

Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). ****p<0,0001

Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda hesaplanan canlı MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta hesaplanan canlı MCF-7 hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta hesaplanan canlı MCF-7 hücre yüzdelерinin ise, tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir (p<0,0001). Buna ek olarak, 24 ve 48 saat MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta hesaplanan canlı MCF-7 hücre yüzdesi, 24 ve 48 saat çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta hesaplanan canlı MCF-7 hücre yüzdesinden ileri düzeyde anlamlı olarak düşüktür (p<0,0001).



Şekil 4.32 MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış), boş NP, çıplak MAPK6 siRNA, MAPK6 siRNA NP ve *scrambled* siRNA NP uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdeleri. Veriler, ortalama $\pm$ SD şeklinde gösterilmiştir (n = 3). ****p<0,0001

Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda hesaplanan toplam apoptotik MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta hesaplanan toplam apoptotik MCF-7 hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta hesaplanan toplam apoptotik MCF-7 hücre yüzdelерinin ise, tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubuna kıyasla ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Ek olarak, 24 ve 48 saat MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta hesaplanan toplam apoptotik MCF-7 hücre yüzdeleri, 24 ve 48 saat çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta hesaplanan toplam apoptotik MCF-7 hücre yüzdelерinden ileri düzeyde anlamlı olarak yüksektir ($p<0,0001$).

Apoptoz, spesifik olarak belirlenmiş hücrelerin programlı ölümüne yol açan bir mekanizmadır ve içsel ve dışsal sinyal yolları ile sıkı bir biçimde düzenlenmektedir [147]. Bu düzenlemede meydana gelen bozulma ve aksaklıklar, çeşitli hastalıkların patojenizinde kritik roller oynamaktadır [148]. Sağlıklı hücrelerde, hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında bulunan hayati dengenin korunması esastır. Ancak kanser hücrelerinde bu denge, net bir biçimde hücre bölünmesinin lehine bozulmuş haldedir. Bu durumun oluşmasında, kanser hücrelerinin sürekli proliferatif sinyalleşme ve büyümelerini engelleyici dış sinyallerden kaçınma yeteneklerine ek olarak, sergiledikleri



hücre ölümüne karşı direnç de büyük pay sahibidir [45, 131, 148]. Bozulan bu denge, kanserleşmede hayati rol oynamaktadır [148]. Dolayısıyla, kanser tedavisine yönelik antikanser ilaç geliştirmede, hücrelerin apoptoza yönlendirilmesine etkisi çeşitli yöntemlerle test edilmektedir. Dizayn edilen bu antikanser ilaçların, apoptotik hücre ölümünü destekleyerek kanser hücrelerini ortadan kaldırması beklenmektedir [147-151].

Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası, boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA uygulanan gruplarda belirlenen canlı ve toplam apoptotik hücre yüzdeleri ile tedavi uygulanmamış kontrol grubunda belirlenen canlı ve toplam apoptotik hücre yüzdeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Boş PLGA nanopartikülünün ve herhangi bir geni baskılamayan *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün MCF-7 hücreleri üzerinde antikanser etki göstermesi beklenmemektedir. Dolayısıyla bu bulgular, teorikte beklenen bulgulardır. Buna ek olarak, literatürde yer alan boş PLGA nanopartikülünün ve *scrambled* siRNA yüklü nanopartiküllerin apoptoza etkisinin incelendiği çalışmaların sonuçları ile de örtüşmektedir [113, 152, 153]. Strand M.S. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, *scrambled* siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının, KPC-1 pankreas kanseri ve CT26 kolon kanseri hücrelerinin apoptoza yönelmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını; KRAS siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının ise KPC-1 ve CT26 hücrelerinin apoptoza yönelmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığını ortaya koymuştur [113]. Hoda M. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma, boş PLGA nanopartikül uygulamasının, Hep3B hepatosellüler karsinom hücrelerinin apoptoza yönelmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını ortaya koymuştur [152]. Byeon H.J. ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma da, boş PLGA mikroküre uygulamasının, MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin apoptoza yönelmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmadığını ortaya koymuştur [153].

Çıplak MAPK6 siRNA uygulanan ve MAPK6 siRNA NP uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla, canlı hücre yüzdesinin ileri düzeyde anlamlı düşük olduğu ve toplam apoptotik hücre yüzdesinin ise ileri düzeyde anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 24 ve 48 saat MAPK6 siRNA NP muamelesinin, çıplak MAPK6 siRNA muamalesine kıyasla canlı hücre yüzdesini ileri düzeyde anlamlı azalttığı ve toplam apoptotik hücre yüzdesini ileri düzeyde anlamlı arttırdığı belirlenmiştir. Bu iki grup arasında, 72 saat muamele sonrası ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yirmi dört ve 48 saat muamele sonrası görülen bu farkın nedeni, MAPK6 siRNA PLGA



nanopartiküllerinin ilk 24 saatte patlama salım sergilemesi olabilir. Elde edilen akış sitometrisi bulguları, MAPK6 siRNA molekölü aracılığıyla *MAPK6* gen ekspresyonunun baskılanmasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptozunu artırdığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, MAPK6 siRNA molekölünün PLGA nanopartikölü aracılığıyla MCF-7 hücrelerine verilmesi, hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi açısından daha etkili olmuştur. Apoptoza dair bu bulgular, antikanser etkinin test edildiği diğör analiz bulguları ile de örtüşmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, MAPK6 siRNA yüklü PLGA ve *scrambled* (negatif kontrol) siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir ve bu nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bilinen MAPK6 geninin, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülü aracılığıyla baskılanmasının sağladığı olası antikanser etkiler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. MAPK6 siRNA molekülünün nanopartiküler taşıma sistemi ile uygulanmasının, çıplak uygulanmasına kıyasla antikanser etki bakımından çeşitli avantajlar sağlayabildiği ortaya konulmuştur. Bu tez çalışması, meme kanseri hücrelerinde MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin antikanser etkisinin test edildiği literatürde yer alan ilk çalışma olması nedeniyle özgündür.

MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri, *scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri ve boş PLGA nanopartikülleri ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin, hücre kültürü çalışmalarında kullanıma uygunluğunun belirlenmesi adına karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. ZetaSizer cihazı ile nanopartiküllerin boyutu, dağılımları ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Ardından, nanopartiküllerin üç boyutlu yapısı, şekli ve boyutu SEM ve AFM analizleri ile incelenmiştir. Daha sonra, nanopartiküllerin yüzey yapısında yer alan kimyasal bağlar FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Son olarak ise, nanopartiküllerin *in vitro* salım analizleri gerçekleştirilmiştir. MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği %87,75; reaksiyon verimi %42,9 ve ilaç yükleme kapasitesi ise %0,18 olarak hesaplanmıştır. *Scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği %81; reaksiyon verimi %36,3 ve ilaç yükleme kapasitesi ise %0,22 olarak hesaplanmıştır. Boş PLGA nanopartiküllerinin ise reaksiyon verimi %34,33 olarak hesaplanmıştır. MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama boyutu 200,7 nm, çoklu dağılım indeksi 0,172 ve zeta potansiyeli -20,5 mV olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama boyutu 192,2 nm, çoklu dağılım indeksi 0,144 ve zeta potansiyeli -23,5 olarak belirlenmiştir. Boş PLGA nanopartiküllerinin ise ortalama



boyutu 154,9, çoklu dağılım indeksi 0,128 ve zeta potansiyeli -24,7 olarak belirlenmiştir. SEM ve AFM analizi sonucunda, MAPK6 siRNA yüklü PLGA, *scrambled* siRNA yüklü PLGA ve boş PLGA nanopartiküllerinin küresel yapıda olduğu ve ortalama 220 nm'den küçük boyutta olduğu belirlenmiştir. FTIR analizi sonucunda, MAPK6 siRNA yüklü PLGA, *scrambled* siRNA yüklü PLGA ve boş PLGA nanopartiküllerinin spektrumları oldukça benzer bulunmuştur, dolayısıyla siRNA moleküllerinin PLGA nanopartiküllerince enkapsülasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. *In vitro* salım deneyi sonucunda ise, 24 saatin sonunda MAPK6 siRNA molekülünün %17,24'ünün ve *scrambled* siRNA molekülünün %16,67'sinin ortama salındığı belirlenmiştir. 60. günün sonunda ise, MAPK6 siRNA molekülünün %98,91'inin ve *scrambled* siRNA molekülünün %99,16'sinin ortama salındığı belirlenmiştir. Tüm bu analiz ve incelemeler sonucunda, sentezlenen nanopartiküller uygulama için uygun bulunarak hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP ve boş NP uygulamasının, MCF-7 meme hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi kalorimetrik MTT testi ile değerlendirilmiştir. MAPK6 siRNA NP için IC₄₀ değeri, 24 saat muamele sonrası 20 µg/mL; 48 saat muamele sonrası ise 30 µg/mL olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP ve boş NP için hücre canlılığı %60'ın altına düşmediğinden dolayı IC₄₀ değeri belirlenememiştir. MAPK6 siRNA NP için belirlenen IC₄₀ değerleri, uygulanacak doz olarak belirlenmiştir. Çıplak MAPK6 siRNA dozu ise, IC₄₀ değerleri hesaplanan MAPK6 siRNA NP'nin enkapsülasyon etkinliğine ve *in vitro* salım değerlerine göre hesaplanmıştır.

MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA ve tamamlanmış besiyer (tedavi uygulanmamış-kontrol) uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hedef *MAPK6* gen ekspresyonuna etkisi, rölatif olarak RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* gen ekspresyonu 24 saat sonunda %36,5; 48 saat sonunda %31,3 ve 72 saat sonunda %37 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* gen ekspresyonu 24 saat sonunda %112,9; 48 saat sonunda %96,1 ve 72 saat sonunda %84,7 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* gen ekspresyonu 24 saat sonunda %123,7; 48 saat sonunda %106,5 ve 72 saat sonunda %87,2 olarak belirlenmiştir. Çıplak siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise, *MAPK6* gen ekspresyonu 24 saat sonunda %51,2; 48 saat sonunda %26,6 ve 72 saat sonunda %59,8 olarak belirlenmiştir. Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası boş NP



uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen rölatif *MAPK6* ekspresyon düzeyleri ile kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde belirlenen rölatif *MAPK6* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Çıplak *MAPK6* siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* gen ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla, 24 ve 48 saat muamele sonunda ileri düzeyde anlamlı ve 72 saat muamele sonunda ise anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. *MAPK6* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise *MAPK6* gen ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla, 24, 48 ve 72 saat muamele sonunda ileri düzeyde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde 24 saat *MAPK6* siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen *MAPK6* gen ekspresyonu, 24 saat çıplak *MAPK6* siRNA muamelesi sonrası belirlenenden; 72 saat *MAPK6* siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen *MAPK6* gen ekspresyonu ise, 72 saat çıplak *MAPK6* siRNA muamelesi sonrası belirlenenden oldukça düşüktür ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuçlar, PLGA nanopartikülüne enkapsüle halde ve çıplak halde uygulanan *MAPK6* siRNA molekülünün, *MAPK6* gen ekspresyonunu başarılı bir biçimde baskıladığını ortaya koymaktadır.

MAPK6 gen ekspresyonu baskılanmasının *MAPK6* protein düzeyine yansımaları ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. *MAPK6* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* protein seviyesi 24 saat sonunda %61,3; 48 saat sonunda %57,8 ve 72 saat sonunda %44,7 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* protein seviyesi 24 saat sonunda %99,7; 48 saat sonunda %95 ve 72 saat sonunda %92,2 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, *MAPK6* protein seviyesi 24 saat sonunda %98,1; 48 saat sonunda %96,7 ve 72 saat sonunda %109,3 olarak belirlenmiştir. Çıplak siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise, *MAPK6* protein seviyesi 24 saat sonunda %73,1; 48 saat sonunda %61 ve 72 saat sonunda %60,9 olarak belirlenmiştir. Yirmi dört, 48 ve 72 saat muamele sonrası boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen *MAPK6* protein seviyeleri ile kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde belirlenen *MAPK6* protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *MAPK6* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ve çıplak *MAPK6* siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde *MAPK6* protein seviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla, 24, 48 ve 72 saat muamele sonunda ileri düzeyde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, MCF-7 hücrelerinde 24 saat *MAPK6* siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen



MAPK6 protein seviyesi, 24 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası belirlenenden; 72 saat MAPK6 siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen MAPK6 protein seviyesi ise, 72 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası belirlenenden ileri düzeyde anlamlı olarak düşüktür. Sonuçlar, MAPK6 siRNA NP ve çıplak MAPK6 siRNA ile MAPK6 gen ekspresyonunun baskılanmasının, MAPK6 protein seviyesine net olarak ve anlamlı şekilde yansıdığını ortaya koymuştur. Ek olarak, 24 ve 72 saat muamele sonrası, PLGA nanopartikülüne enkapsüle MAPK6 siRNA uygulamasının, çıplak MAPK6 siRNA uygulamasına kıyasla, MAPK6 protein ekspresyonunu baskılamada ileri düzeyde anlamlı olarak daha etkili olduğunu göstermektedir.

MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA ve tamamlanmış besiyer uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin migrasyonuna etkisi, yara iyileşme deneyi ile değerlendirilmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde, toplam yara kapanma oranı 24 saat sonunda %32; 48 saat sonunda %56; 72 saat sonunda %83,5 ve 96 saat sonunda %96,5 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, toplam yara kapanma oranı 24 saat sonunda %8; 48 saat sonunda %27; 72 saat sonunda %33 ve 96 saat sonunda %38,5 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, toplam yara kapanma oranı 24 saat sonunda %19,5; 48 saat sonunda %43; 72 saat sonunda %77 ve 96 saat sonunda %92,5 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde, toplam yara kapanma oranı 24 saat sonunda %29,5; 48 saat sonunda %50,5; 72 saat sonunda %74 ve 96 saat sonunda %95 olarak belirlenmiştir. Çıplak siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise, toplam yara kapanma oranı 24 saat sonunda %8; 48 saat sonunda %12; 72 saat sonunda %23,5 ve 96 saat sonunda %33,5 olarak belirlenmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanmış kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saat sonunda belirlenen toplam yara kapanma oranı ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saat sonunda belirlenen toplam yara kapanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, çıplak MAPK6 siRNA uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen toplam yara kapanma oranı, kontrol grubuna kıyasla, 24 saat sonunda anlamlı ve 48, 72 ve 96 saat sonunda ise ileri düzeyde anlamlı olarak düşüktür. MAPK6 siRNA NP uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirlenen toplam yara kapanma oranı, kontrol grubuna kıyasla, 24 ve 48 saat sonunda anlamlı ve 72 ve 96 saat sonunda ise ileri düzeyde anlamlı olarak düşüktür. Sonuçlar, PLGA nanopartikülüne enkapsüle ve çıplak MAPK6



siRNA molekülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır.

MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA ve tamamlanmış besiyer uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna etkisi, immünohistokimyasal PCNA boyaması ile değerlendirilmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda, PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi 24 saat muamele sonrası %96,9 ve 48 saat muamele sonrası %97,2 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta, PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi 24 saat muamele sonrası %69,3 ve 48 saat muamele sonrası %62,1 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi 24 saat muamele sonrası %96 ve 48 saat muamele sonrası %96,3 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi 24 saat muamele sonrası %95 ve 48 saat muamele sonrası %96,3 olarak belirlenmiştir. Çıplak siRNA uygulanan grupta ise, PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücrelerinin yüzdesi 24 saat muamele sonrası %83,6 ve 48 saat muamele sonrası %78 olarak belirlenmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda 24 ve 48 saat muamele sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta 24 ve 48 saat muamele sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta 24 ve 48 saat muamele sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinin, kontrol grubuna kıyasla, ileri düzeyde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ek olarak, 24 saat MAPK6 siRNA NP muamelesi sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi, 24 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinden; 48 saat MAPK6 siRNA NP muamelesi sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesi ise, 48 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası PCNA ile işaretlenen proliferatif MCF-7 hücre yüzdesinden ileri düzeyde anlamlı düşüktür. Sonuçlar, PLGA nanopartikülüne enkapsüle ve çıplak MAPK6 siRNA molekülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, PLGA nanopartikülüne enkapsüle MAPK6 siRNA uygulamasının, çıplak MAPK6 siRNA uygulamasına kıyasla, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu azaltmada ileri düzeyde anlamlı olarak daha etkili olduğunu göstermektedir.



MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA ve tamamlanmış besiyer uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi, koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 813, MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 106, *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 751, boş NP uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 794 ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta ortalama koloni sayısı 120 olarak hesaplanmıştır. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda hesaplanan ortalama koloni sayısı ile boş NP uygulanan ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta belirlenen ortalama koloni sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta belirlenen ortalama koloni sayılarının, kontrol grubuna kıyasla, ileri düzeyde anlamlı düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, PLGA nanopartikülüne enkapsüle ve çıplak MAPK6 siRNA molekülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon oranını azaltarak koloni oluşturma yeteneğini engellediğini ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, yara iyileşme deneyi ve immünohistokimyasal PCNA boyaması sonuçlarını doğrular niteliktedir.

MAPK6 siRNA NP, *scrambled* siRNA NP, boş NP, çıplak MAPK6 siRNA ve tamamlanmış besiyer uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptoza yönelmesine etkisi, akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi 24 saat sonunda %5,7; 48 saat sonunda %7,4 ve 72 saat sonunda %6,1 olarak belirlenmiştir. MAPK6 siRNA uygulanan grupta belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi 24 saat sonunda %72,8; 48 saat sonunda %75,3 ve 72 saat sonunda %55,1 olarak belirlenmiştir. *Scrambled* siRNA NP uygulanan grupta, belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi 24 saat sonunda %5,3; 48 saat sonunda %8,5 ve 72 saat sonunda %3,4 olarak belirlenmiştir. Boş NP uygulanan grupta, belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi 24 saat sonunda %4,7; 48 saat sonunda %5,3 ve 72 saat sonunda %4,9 olarak belirlenmiştir. Çıplak siRNA uygulanan grupta ise, belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi 24 saat sonunda %54,8; 48 saat sonunda %57,6 ve 72 saat sonunda %53 olarak belirlenmiştir. Tamamlanmış besiyer uygulanan kontrol grubunda 24, 48 ve 72 saat muamele sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdeleri ile boş NP uygulanan grupta ve *scrambled* siRNA NP uygulanan grupta 24, 48 ve 72 saat muamele sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre



yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. MAPK6 siRNA NP uygulanan grupta ve çıplak MAPK6 siRNA uygulanan grupta 24, 48 ve 72 saat muamele sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdelерinin, kontrol grubuna kıyasla, ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 24 saat MAPK6 siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi, 24 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesinden; 48 saat MAPK6 siRNA NP muamelesi sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesi ise, 48 saat çıplak MAPK6 siRNA muamelesi sonrası belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesinden ileri düzeyde anlamlı yüksektir. Sonuçlar, PLGA nanopartikülüne enkapsüle ve çıplak MAPK6 siRNA molekülü uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptozunu artırdığını ortaya koymaktadır. Ek olarak, 24 ve 48 saat muamele durumunda, PLGA nanopartikülüne enkapsüle MAPK6 siRNA uygulamasının, çıplak MAPK6 siRNA uygulamasına kıyasla, MCF-7 hücrelerinin apoptozunu artırmada ileri düzeyde anlamlı olarak daha etkili olduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışma, MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu, proliferasyonunu ve koloni oluşturma yeteneğini azalttığını ve apoptozunu ise artırdığını ortaya koymaktadır. MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin meme kanseri hücrelerinde neden olduğu bu antikanser etkiler, meme kanseri ve diğer kanser türlerine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında nanopartiküler sistemler aracılı siRNA molekülü uygulamasının yüksek potansiyelini gözler önüne sermiştir. Ek olarak, kanserleşmedeki rolü ve mekanizması diğer MAPK'lere kıyasla çok daha az aydınlatılmış olan MAPK6'nın, MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyonunun baskılanmasının çeşitli antikanser etkilere neden olduğunun olarak ortaya konulması, MAPK6 genini meme kanseri açısından aday terapötik hedef haline getirmektedir. MAPK6 siRNA yüklü PLGA nanopartikülünün, *in vitro* çalışmada MAPK6 geninin ekspresyonunu baskılamada sergilediği yüksek verimin ve bu baskılamının neden olduğu çeşitli antikanser etkilerin, *in vivo* çalışmalarda da incelenmesi gerekmektedir.



KAYNAKÇA

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- [2] Carbone, A. (2020). Cancer classification at the crossroads. *Cancers*, 12(4), 980.
- [3] Makki, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical medicine insights: Pathology*, 8, CPath-S31563.
- [4] Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., ... & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366.
- [5] Yang, L., Shi, P., Zhao, G. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* 5, 8 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>
- [6] Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13.
- [7] Liu, Y. P., Zheng, C. C., Huang, Y. N., He, M. L., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Molecular mechanisms of chemo-and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2(3), 315-340.
- [8] Shahidian, Azadeh, Majid Ghassemi, Javad Mohammadi, and Mohadeseh Hashemi. *Bio-Engineering Approaches to Cancer Diagnosis and Treatment*. Academic Press, 2020.
- [9] McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., ... & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.
- [10] Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(1), 50-83.
- [11] Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research*, 12(1), 9-18.



- [12] Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(3), 1997-2007.
- [13] Bogucka, K., Pompaiah, M., Marini, F., Binder, H., Harms, G., Kaulich, M., ... & Rajalingam, K. (2020). ERK3/MAPK6 controls IL-8 production and chemotaxis. *Elife*, 9.
- [14] Morazzo, S., Fernandes, S., Cassani, M., De La Cruz, J. O., & Forte, G. (2022). ERK3/MAPK6 has a dual role as pro-and anti-tumorigenic in Triple-Negative Breast Cancer. *European Journal of Cancer*, 174, S50.
- [15] Long, W., Foulds, C. E., Qin, J., Liu, J., Ding, C., Lonard, D. M., ... & O'Malley, B. W. (2012). ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *The Journal of clinical investigation*, 122(5), 1869-1880.
- [16] Cai, Q., Zhou, W., Wang, W., Dong, B., Han, D., Shen, T., ... & Yang, F. (2021). MAPK6-AKT signaling promotes tumor growth and resistance to mTOR kinase blockade. *Science advances*, 7(46), eabi6439.
- [17] Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., & Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database*, 2016.
- [18] Toruntay C., Süsgün S. (2022). KODLAMAYAN RNA'LAR: TERAPÖTİK STRATEJİLER VE GÜNCEL UYGULAMALAR. *Moleküler Biyoloji Güncel Araştırma Teknikleri*. ss.91-125
- [19] O'Keefe, E. P. (2013). siRNAs and shRNAs: Tools for protein knockdown by gene silencing. *Mater Methods*, 3(197).
- [20] Fakhr, E., Zare, F., & Teimoori-Toolabi, L. (2016). Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer gene therapy*, 23(4), 73-82.
- [21] Lam, J. K., Chow, M. Y., Zhang, Y., & Leung, S. W. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4, e252.
- [22] Babu, A., Muralidharan, R., Amreddy, N., Mehta, M., Munshi, A., & Ramesh, R. (2016). Nanoparticles for siRNA-based gene silencing in tumor therapy. *IEEE Transactions on nanobioscience*, 15(8), 849-863.



- [23] Deepthi, A., Raju, S., Kalyani, A., Kiran, U. M., & Vanaja, A. (2013). Targeted drug delivery to the nucleus and its potential role in cancer chemotherapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(2), 48.
- [24] Chen, X., Mangala, L. S., Rodriguez-Aguayo, C., Kong, X., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2018). RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 107-124.
- [25] McNamara, K., & Tofail, S. A. (2017). Nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Physics: X*, 2(1), 54-88.
- [26] Draz, M. S., Fang, B. A., Zhang, P., Hu, Z., Gu, S., Weng, K. C., ... & Chen, F. F. (2014). Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics*, 4(9), 872.
- [27] Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., & Peppas, N. A. Langer. R.(2020). Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov*, 20(2), 101-124.
- [28] Tabatabaei Mirakabad, F. S., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., ... & Joo, S. W. (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 517-535.
- [29] Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- [30] Risnayanti, C., Jang, Y. S., Lee, J., & Ahn, H. J. (2018). PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- [31] Shin, N., Shin, H. J., Yi, Y., Beom, J., Lee, W., Lee, C. H., & Kim, D. W. (2020). p66shc siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles ameliorate neuropathic pain following spinal nerve ligation. *Polymers*, 12(5), 1014.
- [32] O'Connor, C. M., Adams, J. U., & Fairman, J. (2010). *Essentials of cell biology*. Cambridge, MA: NPG Education, 1, 54.
- [33] Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
- [34] Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115.
- [35] Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*, 19(1), 1-16.



- [36] Datta, N., Chakraborty, S., Basu, M., & Ghosh, M. K. (2020). Tumor suppressors having oncogenic functions: the double agents. *Cells*, 10(1), 46.
- [37] Malarkey, D. E., Hoenerhoff, M., & Maronpot, R. R. (2013). Carcinogenesis: mechanisms and manifestations. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 107-146.
- [38] TORRY, D. S., & COOPER, G. M. (1991). Proto-Oncogenes in Development and Cancer. *American journal of reproductive immunology*, 25(3), 129-132.
- [39] Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature education*, 1(1), 33.
- [40] Mahauad-Fernandez, W. D., & Felsher, D. W. (2020). The Myc and Ras partnership in cancer: indistinguishable alliance or contextual relationship?. *Cancer research*, 80(18), 3799-3802.
- [41] Lyu, J., Li, J. J., Su, J., Peng, F., Chen, Y. E., Ge, X., & Li, W. (2020). DORGE: Discovery of Oncogenes and tumor suppressor genes using Genetic and Epigenetic features. *Science advances*, 6(46), eaba6784.
- [42] Chial, H. (2008). Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. *Nature Education*, 1(1), 177.
- [43] Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4, pp. 649-656). Washington, DC: ASM press.
- [44] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- [45] Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- [46] BioRender.com. (2021) Hallmarks of Cancer. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>.
- [47] Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(2), 81-94.
- [48] Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279-3330.
- [49] Wang, Z., Tang, Y., Tan, Y., Wei, Q., & Yu, W. (2019). Cancer-associated fibroblasts in radiotherapy: challenges and new opportunities. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1-12.



- [50] McCann, E., O'Sullivan, J., & Marcone, S. (2021). Targeting cancer-cell mitochondria and metabolism to improve radiotherapy response. *Translational oncology*, 14(1), 100905.
- [51] Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 24.
- [52] Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & molecular immunology*, 17(8), 807-821.
- [53] El-Hussein, A., Manoto, S. L., Ombinda-Lemboumba, S., Alrowaili, Z. A., & Mthunzi-Kufa, P. (2021). A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 21(2), 149-161.
- [54] Dickens, E., & Ahmed, S. (2018). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 36(3), 134-138.
- [55] Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature reviews cancer*, 17(1), 20-37.
- [56] Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... & Cardoso, F. (2019). Breast cancer (Primer) *Nat. Rev. Dis. Primers*, 66.
- [57] Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131.
- [58] Camarillo, I. G., Xiao, F., Madhivanan, S., Salameh, T., Nichols, M., Reece, L. M., ... & Sundararajan, R. (2014). Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: An in vitro model study. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, 55-102.
- [59] Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- [60] Haque, R., Ahmed, S. A., Inzhakova, G., Shi, J., Avila, C., Polikoff, J., ... & Press, M. F. (2012). Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 21(10), 1848-1855.



- [61] Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., & Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncology letters*, 12(5), 3045-3050.
- [62] Caunt, C. J., Sale, M. J., Smith, P. D., & Cook, S. J. (2015). MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature Reviews Cancer*, 15(10), 577-592.
- [63] Rao, A., & Herr, D. R. (2017). G protein-coupled receptor GPR19 regulates E-cadherin expression and invasion of breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(7), 1318-1327.
- [64] Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radzilewska, E., Morgenbesser, S. D., ... & Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65(4), 663-675.
- [65] Dél  ris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P. L., & Meloche, S. (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocation of MK5. *Journal of cellular physiology*, 217(3), 778-788.
- [66] Mathien S., Meloche S., (2017, March 1). MAPK6 (mitogen-activated protein kinase 6). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
<https://atlasgeneticsoncology.org/gene/43349/>
- [67] Coulombe, P., & Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1376-1387.
- [68] Al-Mahdi, R., Babteen, N., Thillai, K., Holt, M., Johansen, B., Wetting, H. L., ... & Wells, C. M. (2015). A novel role for atypical MAPK kinase ERK3 in regulating breast cancer cell morphology and migration. *Cell adhesion & migration*, 9(6), 483-494.
- [69] Lingor, P. (2010). Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference–The Roles of miRNA and siRNA. *Apoptosome*, 95-117.
- [70] Mocellin, S., & Provenzano, M. (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*, 2(1), 1-6.
- [71] Zamore, P. D. (2006). RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. *Cell*, 127(6), 1083-1086.



- [72] 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.
- [73] Allison, S. J., & Milner, J. (2014). RNA interference by single-and double-stranded siRNA with a DNA extension containing a 3' nuclease-resistant mini-hairpin structure. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3, e141.
- [74] Banik, B. L., Fattahi, P., & Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(2), 271-299.
- [75] Zielńska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., ... & Souto, E. B. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.
- [76] Pugazhendhi, A., Prabakar, D., Jacob, J. M., Karuppusamy, I., & Saratale, R. G. (2018). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 41-45.
- [77] Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K. R., Chouhan, R. S., & Sadhu, V. (2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 100397.
- [78] Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in pharmacology*, 12, 601626.
- [79] Feng, N., & Guo, F. (2020). Nanoparticle-siRNA: A potential strategy for rheumatoid arthritis therapy?. *Journal of Controlled Release*, 325, 380-393.
- [80] Kita, K., & Dittrich, C. (2011). Drug delivery vehicles with improved encapsulation efficiency: taking advantage of specific drug-carrier interactions. *Expert opinion on drug delivery*, 8(3), 329-342.
- [81] Li, W., Chen, J., Zhao, S., Huang, T., Ying, H., Trujillo, C., ... & Liu, D. (2022). High drug-loaded microspheres enabled by controlled in-droplet precipitation promote functional recovery after spinal cord injury. *Nature communications*, 13(1), 1-16.
- [82] Cun, D., Jensen, D. K., Maltesen, M. J., Bunker, M., Whiteside, P., Scurr, D., ... & Nielsen, H. M. (2011). High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and



- characterization. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 77(1), 26-35.
- [83] Pantazis, P., Dimas, K., Wyche, J. H., Anant, S., Houchen, C. W., Panyam, J., & Ramanujam, R. P. (2012). Preparation of siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles for sustained release of siRNA and evaluation of encapsulation efficiency. In *Nanoparticles in Biology and Medicine* (pp. 311-319). Humana Press, Totowa, NJ.
- [84] Jensen, D. M. K., Cun, D., Maltesen, M. J., Frokjaer, S., Nielsen, H. M., & Foged, C. (2010). Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release*, 142(1), 138-145.
- [85] Arpagaus, C. (2019). PLA/PLGA nanoparticles prepared by nano spray drying. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49(4), 405-426.
- [86] Kita, K., & Dittrich, C. (2011). Drug delivery vehicles with improved encapsulation efficiency: taking advantage of specific drug-carrier interactions. *Expert opinion on drug delivery*, 8(3), 329-342.
- [87] Shen, S., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, D. (2017). High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects. *International journal of nanomedicine*, 12, 4085.
- [88] Cai, K., He, X., Song, Z., Yin, Q., Zhang, Y., Uckun, F. M., ... & Cheng, J. (2015). Dimeric drug polymeric nanoparticles with exceptionally high drug loading and quantitative loading efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 137(10), 3458-3461.
- [89] Couvreur, P.; Vauthier, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 2006, 23, 1417–1450. DOI: 10.1007/s11095-006-0284-8.
- [90] Gupta, R. B. Fundamentals of drug nanoparticles. In *Drugs and the pharmaceutical sciences: Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, Taylor & Francis Group: New York, 2006; Vol. 159, pp 6–9.
- [91] Rizvi, S. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(1), 64-70.
- [92] Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5), 054107.
- [93] Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70). Humana Press.



- [94] Ivanov, M. R., Bednar, H. R., & Haes, A. J. (2009). Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis. *ACS nano*, 3(2), 386-394.
- [95] Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., & Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of controlled release*, 57(2), 171-185.
- [96] Saha, D., Kumar, S., Ray, D., Mata, J., & Aswal, V. K. (2021). Structure and stability of biodegradable polymer nanoparticles in electrolyte solution. *Materials Letters: X*, 10, 100066.
- [97] Liu, Y., Tan, J., Thomas, A., Ou-Yang, D., & Muzykantov, V. R. (2012). The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Therapeutic delivery*, 3(2), 181-194.
- [98] Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D. M., ... & Fonte, P. (2019). Ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems as new tools to deliver poorly soluble drugs. *Nanomaterials*, 9(8), 1148.
- [99] Lu, B., Lv, X., & Le, Y. (2019). Chitosan-modified PLGA nanoparticles for control-released drug delivery. *Polymers*, 11(2), 304.
- [100] Lu, X. Y., Wu, D. C., Li, Z. J., & Chen, G. Q. (2011). Polymer nanoparticles. *Progress in molecular biology and translational science*, 104, 299-323.
- [101] Roberts, R., Smyth, J. W., Will, J., Roberts, P., Grek, C. L., Ghatnekar, G. S., ... & Foster, E. J. (2020). Development of PLGA nanoparticles for sustained release of a connexin43 mimetic peptide to target glioblastoma cells. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110191.
- [102] Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
- [103] Tyliszczak, B., Drabczyk, A., Kudłacik-Kramarczyk, S., Bialik-Wąs, K., Kijkowska, R., & Sobczak-Kupiec, A. (2017). Preparation and cytotoxicity of chitosan-based hydrogels modified with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 325-330.
- [104] Flieswasser, T., Van Loenhout, J., Freire Boullosa, L., Van den Eynde, A., De Waele, J., Van Audenaerde, J., ... & Jacobs, J. (2020). Clinically relevant chemotherapeutics have the ability to induce immunogenic cell death in non-small cell lung cancer. *Cells*, 9(6), 1474.



- [105] Dukaew, N., Chairatvit, K., Pitchakarn, P., Imsumran, A., Karinchai, J., Tuntiwechapikul, W., & Wongnoppavich, A. (2020). Inactivation of AKT/NF- κ B signaling by eurycomalactone decreases human NSCLC cell viability and improves the chemosensitivity to cisplatin. *Oncology reports*, 44(4), 1441-1454.
- [106] Trif, M., Florian, P. E., Roseanu, A., Moisei, M., Craciunescu, O., Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2015). Cytotoxicity and intracellular fate of PLGA and chitosan-coated PLGA nanoparticles in Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and human colorectal adenocarcinoma (Colo 205) cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(11), 3599-3611.
- [107] Risnayanti, C., Jang, Y. S., Lee, J., & Ahn, H. J. (2018). PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- [108] Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- [109] 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.
- [110] Nelson, C. E., Kim, A. J., Adolph, E. J., Gupta, M. K., Yu, F., Hocking, K. M., ... & Duvall, C. L. (2014). Tunable delivery of siRNA from a biodegradable scaffold to promote angiogenesis in vivo. *Advanced materials*, 26(4), 607-614.
- [111] Khan, A. A., Alanazi, A. M., Jabeen, M., Chauhan, A., & Ansari, M. A. (2019). Therapeutic potential of functionalized siRNA nanoparticles on regression of liver cancer in experimental mice. *Scientific reports*, 9(1), 1-16.
- [112] Rebollo, J., Geliebter, J., & Reyes, N. (2017). ESM-1 siRNA knockdown decreased migration and expression of CXCL3 in prostate cancer cells. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 13(1), 35.
- [113] Strand, M. S., Krasnick, B. A., Pan, H., Zhang, X., Bi, Y., Brooks, C., ... & Fields, R. C. (2019). Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*, 10(46), 4761.
- [114] Fekri Aval, S., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Zarghami, F., Nejati-Koshki, K., & Zarghami, N. (2016). Gene silencing effect of SiRNA-magnetic modified with biodegradable copolymer nanoparticles on hTERT gene expression in lung cancer cell line. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 188-193.



- [115] Salimifard, S., Kiani, F. K., Eshaghi, F. S., Izadi, S., Shahdadnejad, K., Masjedi, A., ... & Jadidi-Niaragh, F. (2020). Codelivery of BV6 and anti-IL6 siRNA by hyaluronate-conjugated PEG-chitosan-lactate nanoparticles inhibits tumor progression. *Life Sciences*, 260, 118423.
- [116] Alshamsan, A., Haddadi, A., Hamdy, S., Samuel, J., El-Kadi, A. O., Uludag, H., & Lavasanifar, A. (2010). STAT3 silencing in dendritic cells by siRNA polyplexes encapsulated in PLGA nanoparticles for the modulation of anticancer immune response. *Molecular pharmaceutics*, 7(5), 1643-1654.
- [117] Bennett, S. A., & Roberts, D. (2003). Analysis of protein expression in brain tissue by ELISA. In *Drugs of Abuse* (pp. 283-295). Humana Press.
- [118] Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., & Meloche, S. (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Molecular and cellular biology*, 23(13), 4542-4558.
- [119] Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329-333.
- [120] Pastar, I., Liang, L., Sawaya, A. P., Wikramanayake, T. C., Glinos, G. D., Drakulich, S., ... & Tomic-Canic, M. (2018). Preclinical models for wound-healing studies. In *Skin tissue models* (pp. 223-253). Academic Press
- [121] Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (88), e51046.
- [122] Vazquez-Mellado, M. J., Monjaras-Embriz, V., & Rocha-Zavaleta, L. (2017). Erythropoietin, stem cell factor, and cancer cell migration. *Vitamins and hormones*, 105, 273-296.
- [123] Vasudevan, J., Lim, C. T., & Fernandez, J. G. (2020). Cell migration and breast cancer metastasis in biomimetic extracellular matrices with independently tunable stiffness. *Advanced Functional Materials*, 30(49), 2005383.
- [124] Yamada, K. M., & Sixt, M. (2019). Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews molecular cell biology*, 20(12), 738-752.
- [125] Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(2), 97-109.



- [126] Palmer, T. D., Ashby, W. J., Lewis, J. D., & Zijlstra, A. (2011). Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Advanced drug delivery reviews*, 63(8), 568-581.
- [127] Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B., & Lauffenburger, D. (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends in pharmacological sciences*, 34(5), 283-289.
- [128] Xiong, B., Chen, Y., Liu, Y., Hu, X., Han, H., & Li, Q. (2021). Artesunate-loaded porous PLGA microsphere as a pulmonary delivery system for the treatment of non-small cell lung cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 206, 111937.
- [129] Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A. D., & Sánchez-Acuña, G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*, 18(2), e174.
- [130] Lu, E. M. C., Ratnayake, J., & Rich, A. M. (2019). Assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression at the invading front of oral squamous cell carcinoma. *BMC oral health*, 19(1), 1-7.
- [131] Peng, Y., Li, J., & Zhu, L. (2019). Cancer and non-coding RNAs. In *Nutritional Epigenomics* (pp. 119-132). Academic Press.
- [132] Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., ... & Newsheer, S. (2015, December). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 35, pp. S25-S54). Academic Press.
- [133] Varghese, E., Samuel, S. M., Sadiq, Z., Kubatka, P., Liskova, A., Benacka, J., ... & Büsselberg, D. (2019). Anti-cancer agents in proliferation and cell death: the calcium connection. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 3017.
- [134] Xu, C., & Zheng, J. (2019). siRNA against TSG101 reduces proliferation and induces G0/G1 arrest in renal cell carcinoma—involvement of c-myc, cyclin E1, and CDK2. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 24(1), 1-9.
- [135] Li, C., Ge, M., Chen, D., Sun, T., Jiang, H., Xie, Y., ... & Zhu, J. (2020). RPL21 siRNA blocks proliferation in pancreatic cancer cells by inhibiting DNA replication and inducing G1 arrest and apoptosis. *Frontiers in oncology*, 10, 1730.
- [136] Zou, L., Chen, F., Bao, J., Wang, S., Wang, L., Chen, M., ... & Wang, Y. (2016). Preparation, characterization, and anticancer efficacy of evodiamine-loaded PLGA nanoparticles. *Drug delivery*, 23(3), 898-906.



- [137] Sahoo, N. K., Sahu, M., Pullaiah, C. P., & Muralikrishna, K. S. (2020). In vitro anticancer activity of Eclipta alba whole plant extract on colon cancer cell HCT-116. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1-8.
- [138] Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.
- [139] Rajendran, V., & Jain, M. V. (2018). In vitro tumorigenic assay: colony forming assay for cancer stem cells. In *Cancer stem cells* (pp. 89-95). Humana Press, New York, NY.
- [140] Rafehi, H., Orłowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2573.
- [141] Lau, H. Y., Tang, J., Casey, P. J., & Wang, M. (2021). Evaluating the epithelial-mesenchymal program in human breast epithelial cells cultured in soft agar using a novel macromolecule extraction protocol. *Cancers*, 13(4), 807.
- [142] Wu, H., Wei, M., Jiang, X., Tan, J., Xu, W., Fan, X., ... & Wu, G. (2020). lncRNA PVT1 promotes tumorigenesis of colorectal cancer by stabilizing miR-16-5p and interacting with the VEGFA/VEGFR1/AKT axis. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 20, 438-450.
- [143] Qin, B., & Cheng, K. (2010). Silencing of the IKK ϵ gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 12(5), 1-15.
- [144] Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y., & Schenke-Layland, K. (2014). Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- [145] Shiratsuchi, A., Osada, S., Kanazawa, S., & Nakanishi, Y. (1998). Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(2), 549-555.
- [146] Khan, A., Gillis, K., Clor, J., & Tyagarajan, K. (2012). Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. *Postepy biochemii*, 58(4), 492-496.
- [147] Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- [148] Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1), 1-14.



- [149] Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- [150] Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
- [151] Bold, R. J., Termuhlen, P. M., & McConkey, D. J. (1997). Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical oncology*, 6(3), 133-142.
- [152] Hoda, M., Pajaniradje, S., Shakya, G., Mohankumar, K., & Rajagopalan, R. (2016). Anti-proliferative and apoptosis-triggering potential of disulfiram and disulfiram-loaded polysorbate 80-stabilized PLGA nanoparticles on hepatocellular carcinoma Hep3B cell line. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), 1641-1650.
- [153] Byeon, H. J., Kim, I., Choi, J. S., Lee, E. S., Shin, B. S., & Youn, Y. S. (2015). PEGylated apoptotic protein-loaded PLGA microspheres for cancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 10, 739.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Toruntay C., Poyraz F.Ş., Süsgün S., Yücesan E. ve Mansuroğlu B., “*MAPK6* genini hedefleyen siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin meme kanseri hücre dizilerinde antikanser etkilerinin değerlendirilmesi”, 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022), Ankara, Türkiye, 23-25 Kasım 2022, s.267

Projeler

1. Toruntay C., Mansuroğlu B., “siRNA Bazlı Nanopartiküllerin Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi”, YTÜ BAP Y.Lisans, FYL-2022-4887.

