



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATLARINDA  
mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN) GEN  
EKSPRESYONUNUN PLAZMİD BAZLI MikroRNA-  
7/KİTOZAN KOMPLEKSLERİ İLE BASKILANMASINA  
İLİŞKİN *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR**

MELEK EVİRGEN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi SUNA ÖZBAŞ TURAN

2019-İSTANBUL

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program türü : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Farmasötik Biyoteknoloji  
Tez Sahibi : MELEK EVIRGEN  
Sınav Tarihi ve Saati : 27/09/2019 ve 13:00

Tez Başlığı : Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Gen Ekspresyonunun Plazmid Bazlı Mikro RNA-7/Kitozan Kompleksleri İle Baskılanmasına İlişkin İn Vitro Çalışmalar

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvan, Adı-Soyadı (Kurum Adı)	İmza
Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Suna Özbaş Turan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FarmasötikBiyoteknoloji Bölümü	
Üye	Prof. Dr. Ali Demir Sezer Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FarmasötikBiyoteknoloji Bölümü	
Üye	Doç.Dr. Mehmet Rıfki Topçul İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	

## ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .....16.10.2016.....tarih ve .....67.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarında etik dışı davranışım olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine eklediğimi, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Melek EVİRGEN

İmza

## TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Ali Demir SEZER'e, öğretim üyesi ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN'a tüm katkıları için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Ceyda EKENTOK ATICI'ya, Arş. Gör. Murat DOĞAN'a, Arş. Gör. Aysun Çelik'e ve Arş. Gör. Birnur ÇÖMEZ'e teşekkür ederim.



## İçindekiler Tablosu

1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Kanser Hakkında Genel Bilgiler.....	5
4.2. Karaciğer Kanseri Hakkında Genel Bilgiler.....	7
4.3. Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Hakkında Genel Bilgiler.....	10
4.4. Epigenetik Mekanizmalar ve HCC Hakkında Genel Bilgiler.....	11
4.5. Kodlanmayan RNA'lar Hakkında Genel Bilgiler.....	12
4.5.1. MikroRNA (miRNA) Yapısı Hakkında Genel Bilgiler.....	13
4.6. miRNA ve Kanser Arasındaki İlişki Hakkında Genel Bilgiler.....	14
4.6.1. Onkogen Olarak Tanımlanan miRNA'lar.....	15
4.6.2. Tümör Baskılayıcı Olarak Tanımlanan miRNA'lar.....	15
4.7. miR-7 ile HCC İlişkisi Hakkında Genel Bilgiler.....	16
4.8. miRNA Biyogenezi Hakkında Genel Bilgiler.....	17
4.9. mTOR ve HCC Arasındaki İlişki Hakkında Genel Bilgiler.....	18
4.10. Gen Tedavisi Hakkında Genel Bilgiler.....	21
4.10.1. Viral Vektörler Hakkında Genel Bilgiler.....	22
4.10.2 Viral Olmayan Vektörler Hakkında Genel Bilgiler.....	24
4.11. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler.....	25
4.12. Kitozan ve miRNA Hakkında Genel Bilgiler.....	28
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
5.1. Gereç.....	29
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemesi.....	29
5.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	30

5.1.3. Plasmid miRNA Yapısı.....	31
5.1.4. Hücre Hatları Yapısı .....	32
5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler.....	34
5.2. Yöntem .....	39
5.2.1. Plasmid miRNA ile Yapılan Çalışmalar .....	39
5.2.2. Plasmid miRNA'nın Transformasyonu .....	39
5.2.3. Plasmid miRNA'nın İzolasyonu .....	40
5.2.4. Plasmid miRNA'nın Kontrolü.....	41
5.2.5. Kitozan/miRNA Komplekslerin Hazırlanması ve Kontrolü.....	42
5.2.6. In Vitro Transfeksiyon Çalışmaları .....	44
6. BULGULAR.....	50
6.1. miRNA Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	50
6.1.1. miRNA'ların Hazırlanmasına İlişkin Bulgular .....	50
6.1.2. miRNA'ların Kontrolüne İlişkin Bulgular .....	50
6.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması / Kontrolüne İlişkin Bulgular.....	51
6.2.1. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması.....	51
6.2.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular .....	52
6.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular .....	54
6.3.1. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon Çalışmaları ...	54
6.3.2. Transfeksiyon Kontrol Çalışmaları .....	54
6.4. Protein Ekspresyonunun ELISA Yöntemi ile Tayinine İlişkin Bulgular.	55
6.4.1. mTOR'un ELISA Yöntemi ile Tayinine İlişkin Bulgular .....	55
6.5. Sitotoksosite ve Hücre Proliferasyonu Çalışmalarına İlişkin Bulgular ....	56
6.6. İnvazyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular .....	58
6.7. Apoptoz Çalışmalarına İlişkin Bulgular .....	59

7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	60
8. KAYNAKÇA.....	63
9. EKLER.....	69
10.ÖZGEÇMİŞ .....	70



## KISALTMALAR

a/h	Ağırlık/Hacim
AKT	Protein Kinase B
CDK	Sikline Bağımlı Kinazlar
ddH <sub>2</sub> O	Didistile Su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
h/h	Hacim/Hacim
HBV	Hepatit B Virüsü
HBC	Hepatit C Virüsü
HCl	Hidroklorik Asit
HCC	Hepatosellüler Karsinoma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Mono Potasyum Fosfat
MEGM	Mammary Epithelial Growth Medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Chloride
miRNA	mikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlanamayan RNA
NaCl	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit

ng	Nanogram
OD	Optik Densite
OD260	260 nm Dalga Boyundaki Optik Densite Değeri
OD280	280 nm Dalga Boyundaki Optik Densite Değeri
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)
pDNA	Plazmid DNA
PEG	Polietilen Glikol
piRNA	Piwi Interacting RNA
PEI	Polietilenimin
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik Ko-Glikolik Asit
PLL	Poli L-lizin
PKC	Protein Kinaz C Ailesi
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primer miRNA
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interference
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat (Sodyum Lauril Sülfat)
shRNA	Short Hairpin RNA
siRNA	Small Interfering RNA
snoRNA	Small Nücleolar RNA
snRNA	Small Nüclear RNA

TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Trizma Base, 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propanediol
Tris-HCl	Hidroklorik Asit ile pH Değeri Ayarlanmış Tris özeltisi
Tris-PO <sub>4</sub>	Fosfat Tris özeltisi
tmRNA	Transfer mRNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
μg	Mikrogram
μg/ml	Mikrogram/Mililitre
V	Volt
μl	Mikrolitre

## Şekil Listesi

Şekil 4.1. 2017 Yılında Dünya Geneline Türlerine Göre Kanser Ölümü	6
Şekil 4.2. 2018 Yılındaki (A) Her İki Cinsiyet, (B) Erkek ve (C) Kadınlar İçin En Sık Görülen 10 Kanseri ve Ölümünün Dağılımı	9
Şekil 4.3. İnsan miR-7 Saç Tokası Prekürsörleri ve Olgun Dizilerinin Yapısı	16
Şekil 4.4. miRNA Biyogenezi	18
Şekil 4.5. mTOR Yolunu İnhibe Eden Tümör Baskılayıcı miRNA'lar	20
Şekil 4.6. Yaygın Olarak Kullanılan Viral Vektörler	23
Şekil 4.7. Yaygın Olarak Kullanılan Viral Olmayan Vektörler	25
Şekil 4.8. Kitozan Molekülünün Kimyasal Yapısı	27
Şekil 4.9. Kitozan ve DNA Arasındaki Elektrostatik Etkileşim	27
Şekil 5.1. Plasmid Vektörün Haritası	32
Şekil 6.1. Tümör Hücrelerinde Tedavi Öncesi ve Sonrası Arasında mTOR Ekspresyonunun Karşılaştırılması	54
Şekil 6.2. Sağlıklı ve Kanser Hücre Hatlarında Yapılan Hücre Proliferasyon Çalışması (MTT)	55
Şekil 6.3. Sağlıklı ve Kanser Hücre Hatlarında Yapılan Hücre Proliferasyon Çalışması (BrdU)	55

## **Tablo Listesi**

Tablo 4.1. 2018 Yılındaki 36 Kanser Tipine Göre Yeni Vaka ve Ölüm Sayıları	8
Tablo 4.2. Viral Vektörlerin Avantaj ve Dezavantajları	23
Tablo 5.1. Hep 3B ve Hep G2 Hücre Hatlarının Özellikleri	33
Tablo 6.1. Spektrofotometrik Ölçüm Değerleri	48
Tablo 6.2. miRNA ile Hazırlanan Kompleks Formülasyonlarına, Serbest miRNA'lara ve Kitozana Ait Boyut ve Yüzey Yüğü Ölçüm Sonuçları	50



## Resim Listesi

Resim 5.1. Hep 3B Hücre Hattı Yapısı	32
Resim 5.2. Hep G2 Hücre Hattı Yapısı	33
Resim 6.1. Farklı Miktardaki miRNA'ların Agaroz Jeldeki Görünümü	48
Resim 6.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Elektroforetik Görünümü	52
Resim 6.3. Standart Çözeltilerin Konstrasyon Değerlerine Karşılık Gelen Absorbans Değerlerine İlişkin Standart Eğri	53
Resim 6.4. HepG2 Hücre Hattında Kitozan/miRNA Transfeksiyonu Sonrası İnvazyon A: Kontrol B: 1/1 Formülasyon C: 2/1 Formülasyon	58
Resim 6.5. HepG2 Hücre Hattında Kitozan/miRNA Transfeksiyonu Sonrası Apoptoz A: Kontrol B: 1/1 Formülasyon C: 2/1 Formülasyon	59

# Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Gen Ekspresyonunun Plazmid Bazlı MikroRNA-7/Kitozan Kompleksleri ile Baskılanmasına İlişkin İn Vitro Çalışmalar

**Öğrencinin Adı** : Melek EVİRGEN

**Danışmanı** : Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN

**Anabilim Dalı** : Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

## 1.ÖZET

**Amaç:** Tez çalışmasında amaç; hepatosellüler karsinomada ekspresyonu downregüle olan miR-7'nin özellikleri incelenerek katyonik bir biyopolimer olan kitozanla hazırlanan kompleks formlarının Hep 3B ve Hep G2 hepatosellüler karsinoma hücre hatlarındaki etkinliği ve hepatosellüler karsinoma tedavisindeki kullanılabilirliği in vitro olarak araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Hep 3B ve Hep G2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinde mTOR geninin ekspresyonunu baskılayabilecek miR-7'nin etkin bir şekilde aktarılabilmesi için doğal kitozan polimerleri ile kompleksler hazırlanmıştır. Hazırlanan komplekslerin partikül boyutu ve yüzey yükü ölçülerek fizikokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Taşıyıcı sistemlerin ise serum stabilitesi, sitotoksitesi, transfeksiyon etkinliği, hepatosellüler karsinoma hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Farklı oranlarda kitozan kullanılarak hazırlanan kompleksler ile Hep 3B ve Hep G2 hepatosellüler karsinoma hücrelerine transfeksiyonu sağlanmıştır. Kitozan ile 1/1 ve 2/1 oranında hazırlanmış miR-7 tam kompleks oluşumu sağlamıştır.

**Sonuçlar:** Çalışma sonucunda miR-7'nin kitozan kompleksleri ile hücrelere stabil olarak taşındığı, hücreye internalize olarak kanser hücrelerinde bozulan miRNA regülasyonunun tedavi edilmesi ile kanser hücrelerinin invazivliğini azalttığı gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** miR-7, hepatosellüler karsinoma, gen tedavisi, Hep 3B, Hep G2

## **In Vitro Studies of mTOR Gene Expression in Plasma Based microRNA-7 / Chitosan Complexes in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines**

**Name of Student** : Melek EVİRGEN

**Supervisors** : Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN

**Department** : Department of Pharmaceutical Biotechnology

### **2.ABSTRACT**

**Objective:** The aim of this study is to investigate the properties of miR-7 which is downregulated expression in hepatocellular carcinoma and to investigate its efficacy in Hep 3B and Hep G2 hepatocellular carcinoma cell lines and its usefulness in hepatocellular carcinoma treatment in vitro.

**Material and Method:** Complexes with natural chitosan polymers were prepared to efficiently transfer miR-7, which can suppress the expression of mTOR gene in Hep 3B and Hep G2 hepatocellular carcinoma cells. The particle size and surface charge of the prepared complexes were measured and physicochemical characterizations were made. The effects of carrier systems on serum stability, cytotoxicity, transfection efficiency, and migration of hepatocellular carcinoma cells were evaluated.

**Result:** Transfection of Hep 3B and Hep G2 hepatocellular carcinoma cells was achieved with complexes prepared using chitosan in different ratios. MiR-7 prepared with chitosan in a ratio of 1/1 and 2/1 provided complete complex formation.

**Conclusion:** As a result of this study, it was shown that miR-7 was transported to cells with chitosan complexes and decreased the invasiveness of cancer cells by treatment of miRNA regulation in cancer cells which were internalized to the cell.

**Key Words:** miR-7, hepatocellular carcinoma, gene therapy, Hep 3B, Hep G2

### 3.GİRİŞ

Karaciğer kanseri, kanserden kaynaklanan ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Karaciğerin en sık rastlanan primer malign tümörü olan hepatosellüler karsinoma; kanserden kaynaklı ölüm nedenleri arasında erkek ve kadın bireylerde üst sıralarda yer almaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde bu tümörün moleküler düzeyde özelliklerinin iyi anlaşılması önemli rol oynamaktadır.

Hepatosellüler karsinoma üzerine son yıllarda yapılan çalışmalarla hücresel mekanizmaların aydınlatılması sağlanmaya çalışılmaktadır. Meydana gelen ilerlemeler ile gen tedavisi sistemlerinin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Gen tedavisinde kullanılan sistemler viral ve viral olmayan vektörler olarak iki ayrı grupta değerlendirilmekte olup, viral vektörler ile yapılan çalışmalar sonucu her ne kadar önemli gelişmeler kaydedilse de kısa süreli transgen ekspresyonu ve toksisite gibi önemli problemler nedeniyle bu sistemlere alternatif taşıyıcılar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Viral vektörlerde gözlenen olumsuzluklar nedeniyle, araştırmalar, kolay sentez edilebilme, hücre/dokuya hedeflendirilebilme, düşük immün cevap ve sınırsız büyüklükte plazmid DNA taşıyabilme gibi özelliklere sahip viral olmayan vektörler üzerine yoğunlaşmaktadır. Üzerinde en çok araştırma yapılan viral olmayan vektörlerden birisi katyonik özellikte polimerik taşıyıcı sistemler olup, genetik materyali hücre içine taşıyabilmektedir. Katyonik polimerler, sentetik ve doğal polimerler olarak iki grupta incelenmektedir. Doğal polimerlerden kitozan taşıyıcı sistem olarak hücre içerisine etkin bir şekilde gen aktarımı amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çerçevesinde; normal hepatosellüler karsinoma hücresinden farklı olarak hepatosellüler karsinomada ekspresyonu downregüle olan miR-7 ile çalışılmıştır. miRNA'lar ve kitozan ile kompleks oluşturulup, in vitro karakterizasyonu yapılmıştır. miR-7, Hep 3B ve Hep G2 hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında ekspresyon özellikleri incelenerek, hazırlanan formülasyonların bu hücreler üzerindeki in vitro etkinliği (protein ekspresyonu, invazyon, apoptoz ve

hücre proliferasyonuna etki) ve hepatosellüler karsinoma tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Kanser Hakkında Genel Bilgiler

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terim olmakla birlikte; tüm dünyada her geçen gün daha fazla görülen en önemli sağlık problemlerinden birisi olarak tanımlanmaktadır (Zhang ve ark.,2007). Bir başka ifade şekli ile kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalması ile ifade edilen bir hastalıktır (Lindsey, 2012). Kanser 100'den fazla hastalık grubunu kapsamaktadır (Fitzmaurice ve ark., 2015; Pavlopoulou ve ark., 2015).

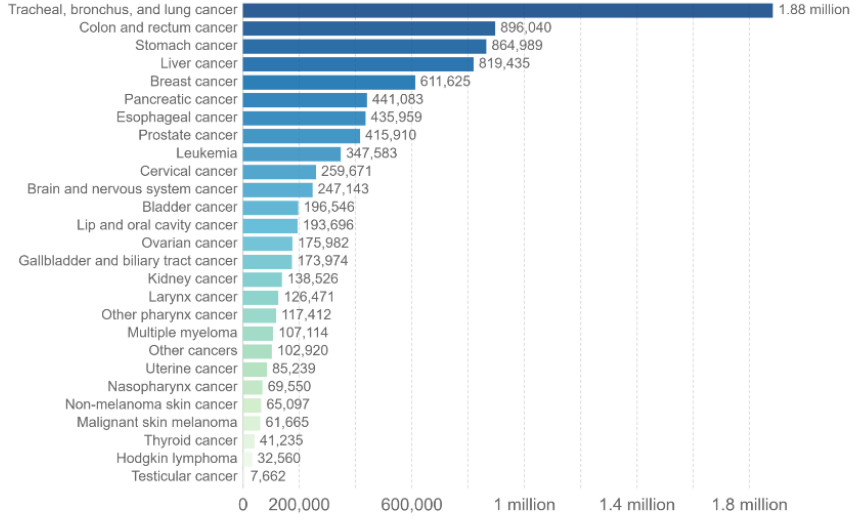
Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlamaktadır. Kanser genel olarak köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılmaktadır. Epitelyal hücrelerinden köken alanlar “karsinom”, mezoderm hücrelerinden köken alanlar “sarkom”, salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise “adenokarsinom” olarak adlandırılmaktadır. (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser, tedavi edilemediği durumlarda ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilmektedir. Kanser, dünyadaki ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018 yılındaki tahmini olarak 9,6 milyon ölümden sorumlu tutulmaktadır. Dünya genelinde değerlendirildiğinde, 6 ölümden yaklaşık 1 tanesi kanserden kaynaklanmaktadır (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Erişim tarihi: 12 Eylül 2018).

Erkek ve kadın bireylerde en sık rastlanan ve ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir (Siegel ve ark., 2015). Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) tarafından yayımlanan Findings from the Global Burden of Disease Study 2017 isimli çalışmasına göre; 2017 yılında kansere bağlı yaşanan ölümlerde akciğer, kolorektal, mide, karaciğer ve meme kanserleri yaygın olarak görülmektedir. Sırası ile 1,88 milyon, 896 bin, 864 bin, 819 bin ve 611 bin ölüme sebebiyet verdiği Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

## Cancer deaths by type, World, 2017

Total annual number of deaths from cancers across all ages and both sexes, broken down by cancer type.

Our World  
in Data



Source: IHME, Global Burden of Disease (GBD)

CC BY

### Şekil 4.1. 2017 Yılında Dünya Geneline Türlerine Göre Kanser Ölümü

Kanser hücreleri az oksijen, az yiyecek, zorlu koşullara karşı gösterdiği direnç ve zaman içerisinde bu koşulları kendi lehine çevirmesi ile yaşama tutunmaktadır. Kanser hücreleri zamanla şekil değiştirerek transforme olabilmektedir. Normal hücrelerin belli bir zemine tutunarak büyümesi ve yaşaması mümkünken, kanser hücreleri herhangi bir yere tutunmadan da yaşayabilmekte, büyüyüp çoğalabilmektedir (Baykara, 2015). Kanser hücreleri ise normal hücrelerin sahip olmadığı birçok özelliğe sahiptir. Bu özellikler genel hatları ile şu şekildedir:

- Hücre yüzeyindeki reseptörler daha sık sinyal almaktadır.
- Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri bulunmaktadır.
- Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurmadan, büyümeye ve çoğalmaya devam etmektedir.
- Normal hücreler her tipteki besini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glukozu kullanabilmektedir.
- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilmektedir.
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde replike olup çoğalabilmektedir.

- Dolařım sistemine girip uzaktaki bir yere hareket edebilmekte ve yeni bir yerleřerek kanserleřmeyi bařlatabilmektedir.
- Apoptozdan kaçabilmektedir.
- Genetik ve epigenetik olarak stabil özellik göstermemektedir.

#### **4.2. Karaciğer Kanseri Hakkında Genel Bilgiler**

GLOBOCAN 2018 verilerine göre; karaciğer kanserinin yılda yaklaşık 841.000 yeni vaka ve 782.000 ölüm ile 2018 yılında dünya genelinde en sık tanı konan altıncı kanser; akciğer ve mide kanserinden sonra nc önde gelen kanser ölüm nedeni olduğu tahmin edilmektedir. Söz konusu veriler Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1.** 2018 Yılındaki 36 Kanser Tipine Göre Yeni Vaka ve Ölüm Sayıları

CANCER SITE	NO. OF NEW CASES (% OF ALL SITES)	NO. OF DEATHS (% OF ALL SITES)
Lung	2,093,876 (11.6)	1,761,007 (18.4)
Breast	2,088,849 (11.6)	626,679 (6.6)
Prostate	1,276,106 (7.1)	358,989 (3.8)
Colon	1,096,601 (6.1)	551,269 (5.8)
Nonmelanoma of skin	1,042,056 (5.8)	65,155 (0.7)
Stomach	1,033,701 (5.7)	782,685 (8.2)
Liver	841,080 (4.7)	781,631 (8.2)
Rectum	704,376 (3.9)	310,394 (3.2)
Esophagus	572,034 (3.2)	508,585 (5.3)
Cervix uteri	569,847 (3.2)	311,365 (3.3)
Thyroid	567,233 (3.1)	41,071 (0.4)
Bladder	549,393 (3.0)	199,922 (2.1)
Non-Hodgkin lymphoma	509,590 (2.8)	248,724 (2.6)
Pancreas	458,918 (2.5)	432,242 (4.5)
Leukemia	437,033 (2.4)	309,006 (3.2)
Kidney	403,262 (2.2)	175,098 (1.8)
Corpus uteri	382,069 (2.1)	89,929 (0.9)
Lip, oral cavity	354,864 (2.0)	177,384 (1.9)
Brain, nervous system	296,851 (1.6)	241,037 (2.5)
Ovary	295,414 (1.6)	184,799 (1.9)
Melanoma of skin	287,723 (1.6)	60,712 (0.6)
Gallbladder	219,420 (1.2)	165,087 (1.7)
Larynx	177,422 (1.0)	94,771 (1.0)
Multiple myeloma	159,985 (0.9)	106,105 (1.1)
Nasopharynx	129,079 (0.7)	72,987 (0.8)
Oropharynx	92,887 (0.5)	51,005 (0.5)
Hypopharynx	80,608 (0.4)	34,984 (0.4)
Hodgkin lymphoma	79,990 (0.4)	26,167 (0.3)
Testis	71,105 (0.4)	9,507 (0.1)
Salivary glands	52,799 (0.3)	22,176 (0.2)
Anus	48,541 (0.3)	19,129 (0.2)
Vulva	44,235 (0.2)	15,222 (0.2)
Kaposi sarcoma	41,799 (0.2)	19,902 (0.2)
Penis	34,475 (0.2)	15,138 (0.2%)
Mesothelioma	30,443 (0.2)	25,576 (0.3)
Vagina	17,600 (0.1)	8,062 (0.1)
All sites excluding skin	17,036,901	9,489,872
<b>All sites</b>	<b>18,078,957</b>	<b>9,555,027</b>

Source: GLOBOCAN 2018.



**Şekil 4.2.** 2018 Yılındaki (A) Her İki Cinsiyet, (B) Erkek ve (C) Kadınlar İçin En Sık Görülen 10 Kanseri ve Ölümünün Dağılımı

GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya genelinde 2018 yılı içerisinde erkek bireylerde 9,5 milyon yeni tanı konulan kanser hastalıkları içerisinde, karaciğer kanseri %6,3 oranı ile beşinci sırada yer almaktadır. Aynı şekilde 2018 yılı içerisinde erkek bireylerde kansere bağlı olarak yaşanan 5,4 milyon ölüm içerisinde, karaciğer kanseri %10,2 oranı ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Dünya genelinde 2018 yılı içerisinde kadın bireylerde 8,6 milyon yeni tanı konulan kanser hastalıkları içerisinde, karaciğer kanseri %8,4 oranı ile üçüncü sırada yer almaktadır. Aynı şekilde 2018 yılı içerisinde kadın bireylerde kansere bağlı olarak yaşanan 4,2 milyon ölüm içerisinde, karaciğer kanseri %13,8 oranı ile meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Söz konusu veriler Şekil 4.2’de sunulmaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri raporuna göre, ülkemizde erkek bireylerde akciğer kanseri (52,5/100000 kişide YSH), kadın bireylerde ise meme kanseri (43,0/100000 kişide YSH) en sık görülen kanser türleridir.

#### **4.3. Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Hakkında Genel Bilgiler**

Primer karaciğer kanseri olan hepatosellüler karsinoma (HCC) konulan tanıların %75 - %85'ini içermektedir. HCC'nin görülme sıklığındaki giderek artışın Hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV), aflatoksinle kontamine olmuş gıda maddeleri, yüksek alkol tüketimi, obezite, sigara tüketimi ve tip 2 diyabet ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (London ve ark., 2018).

HCC, hepatositlerden köken alan ve karaciğerin en sık görülen primer malign tümörüdür. HCC, dünyada en sık görülen tümörlerden biri olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerde de erkek ve kadın bireylerde üst sıralarda yer almaktadır (Hilscher ve ark., 2012). Söz konusu bu kanser tipinde; zengin damar ağı, agresif büyüme potansiyeli, yüksek metastaz kapasitesi, heterojen yapısı ve hızlı anjiogenez yeteneği gibi nedenler ile sağ kalım oranları oldukça düşüktür. Bununla birlikte her sene 600,000’den fazla yeni vaka teşhis edilmesine rağmen henüz etkili bir tedavi yöntemi

bulunamamıştır (Herath ve ark., 2006). Bu nedenle günümüzde tedavi amacı ile geleneksel yöntemlere alternatif değişik yöntemler araştırılmaktadır.

#### **4.4. Epigenetik Mekanizmalar ve HCC Hakkında Genel Bilgiler**

HCC hem epigenetik hem de genetik bir hastalıktır. Özellikle epigenetik değişiklikler; anormal DNA metilasyonu, histon modifiye eden enzimlerin hatalı ekspresyonu, anormal kodlanmayan RNA ekspresyonu süreçlerini içermektedir (Dogan ve ark., 2016). Epigenetik değişiklikler kanserin gelişimi sırasında kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunu baskılayıcı veya aktive edici özellikler göstermektedir. Bu süreçte hem iç ve dış (stres, yaşam biçimi, beslenme şekli gibi) çevresel faktörler rol oynadığı gibi, atalarından kalıtılan bozuk genler de rol almaktadır.

HCC'nin hem kalıtsal hem de sporadik tipleri mevcuttur. Yapılan çalışmalar aile içerisinde HCC öyküsü olması, HBV ve HBC virüslerinden bağımsız olarak HCC riskini artırdığını göstermektedir. Aile içerisindeki HCC öyküsünün; HBV ve HBC virüslerinden yaklaşık 70 kat daha fazla ilişkili olduğu görülmüştür (Turati ve ark., 2012).

DNA Modifikasyonları en yaygın kullanılan metilasyondur. DNA metilasyonları hücre farklılaşması ve fonksiyonlarında önemli yere sahiptir. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelere oranla daha az metilasyon seviyesine sahiptir. HCC'de tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri ve diğer kanserle ilişkili olan genler sıklıkla hipermetilasyona uğramaktadır. Kanser gelişimiyle doğrudan veya dolaylı yoldan ilişkide olan genler (RASSF1A, p16, CRABP1, GSTP1, CHRNA3, DOK1, SFRP1, GAAD45a, p16 INK4A, p15 INK4B, RB1 GSTP1, SOCS1, APC, E-cadherin, Hint1, SOCS3, RIZ1, MGMT ve p73) hepatokarsinogenez sürecinde anormal metilasyon düzeyleri göstermektedir Bu genler, hastalığın gelişiminde önemli rolleri olan hücre proliferasyonu, hücre döngüsü kontrolü, DNA tamiri ve sitokin sinyalizasyonunun susturulması gibi çok farklı sinyal transdüksiyon yollarında ve biyolojik regülasyon aktivitelerinde işlev görmektedirler.

Histon Modifikasyonları doğrudan gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar olup kromatin ile ilişkili proteinler ile etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu grupta yer alan mekanizmalar arasında; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, nitrosilasyon sumolasyon bulunmaktadır. Histon modifikasyonu, enzimler yardımıyla histon proteinine başka moleküllerin eklenmesi veya çıkarılması ile oluşmaktadır.

Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden mekanizmadır. miRNA'lar, uzun kodlanmayan RNA'lar ve PIWI proteiniyle ilişkili RNA'lardır. Çok sayıda farklı işlevleri olan kodlanmayan RNA bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; snRNA'lar (small nuclear RNA) RNA transkriptlerin işlenmesinde ve intronların uzaklaştırılmasında, snoRNA'lar (small nucleolar RNA) rRNA'nın olgunlaşmasında, siRNA'lar (small interfering RNA) ve miRNA'lar (microRNA) ise gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, piRNA'lar (piwi interacting RNA) gametogenesisde ve tmRNA'lar (transfer mRNA) ribozomların kırık mRNA'lardan arındırılmasında görev almaktadır.

Sporadik hepatosellüler karsinoma, kalıtsal mutasyonlar yerine ilk defa bireyin genomunda ortaya çıkan ve tamir sistemleri tarafından düzeltilemeyen mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. Onkogenlerin aktivasyonu ile birlikte tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve bunların yanında bu genlerin bir kaçında birden meydana gelen mutasyonların rol oynadığı bilinmektedir. HCC'nin sporadik tipleri arasında spontan rüptür sayılabilmektedir (Kucukkkartallar, 2007).

#### **4.5. Kodlanmayan RNA'lar Hakkında Genel Bilgiler**

Ribonükleik asit (RNA)'lerin bulunması ve işlevlerinin tanımlanmasıyla, RNA'ların canlı yaşamı için çok önemli süreçlerde rol oynadıkları belirlenmiştir. Özellikle insan genomunun %62'sini kapsayan ncRNA (kodlamayan RNA)'ların hücrel savunmada, gelişimsel süreçlerde, farklılaşmada, DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve post-transkripsiyonel susturumda görev aldıkları gösterilmiştir

(Birney ve ark., 2007). ncRNA'larda meydana gelen bozukluklar birçok hastalığa yol açmaktadır. İlişkili oldukları hastalıklardan bazıları kanserler, nörodejeneratif hastalıklar, immün yetmezlik hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardır (Gehrke ve ark., 2010).

Hastalıklardan sorumlu oldukları düşünülen ncRNA'lar, yeni tedavi yaklaşımlarında hem hedef hem de araç olarak görülmektedirler (Lu ve ark., 2005). Tanımlanan ve fonksiyonu aydınlatılan ncRNA'ların sayısı her geçen gün artmaktadır. ncRNA'lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. ncRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır. Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15-40 baz çifti arasında değişmektedir. Bunlara örnek olarak small interfering RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA) ve PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA (piRNA) verilebilmektedir (Erson ve Petty, 2008). Bu RNA'lar, RNA enterferans (RNA interference-RNAi) mekanizması ile gen susturumunu sağlayan moleküllerdir. Bu mekanizma, milyarlarca yıl önce, hücrelere saldıran virüslere karşı geliştirilmiş bir savunma mekanizmasıdır. Günümüzde artık, RNAi mekanizmasının gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Voinnet, 2009).

#### **4.5.1. MikroRNA (miRNA) Yapısı Hakkında Genel Bilgiler**

miRNA'lar, 1993 yılında iki bağımsız çalışmada eş zamanlı olarak gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedildiğinden evrimsel olarak en eski gen regülasyon mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir. Herhangi bir protein üretmeyecek olan bu tek zincirli RNA molekülleri DNA'dan ilk sentezlendiklerinde uzun moleküllerdir ve kendi üzerlerine kapanarak 2. yapılar oluştururlar daha sonra hücredeki çeşitli enzimler bu 2. yapıları belirli yerlerden keserek 20-30 baz uzunluğunda "olgun mikro RNA'lar oluşturur. Bu miRNA'lar uzunlukları küçük olduğundan mRNA'ların ribozom bağlanma bölgelerinin civarına bağlanarak o mRNA'nın üreteceği proteinin sentezlenmesini engeller.

miRNA'lar, hücrel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Kanser, hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bu duruma devam etmesi sonucu tümör oluşumunun meydana gelmesiyle oluşur. Hücreler; hem gelişim hem de ergin dönemde koordineli bir şekilde hücre bölünmesi, farklılaşma ve ölümün düzgün olarak gerçekleşmesinden emin olmak için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Birçok düzenleyici etken, genleri çoğalma ve farklılaşmada yönlendirmek için açıp kapatmaktadır (Yu ve ark., 2010; Lee ve ark., 1993).

#### **4.6. miRNA ve Kanser Arasındaki İlişki Hakkında Genel Bilgiler**

RNA'ların protein kodlamayan dizileri olarak adlandırılan miRNA'ların hücrel anlamda pek çok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığı saptanmıştır. Bununla birlikte miRNA'nın hücredeki seviyesinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olabileceği tespit edilmiştir. Bu sayede miRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak buldukları şartlara bağlı olarak bazı miRNA'lar ise hem tümör baskılayıcı hem de onkogen karakter gösterebilir. Bu kategoriye önemli bir örnek, kronik lenfositik lösemi ve akciğer kanserinde bir tümör baskılayıcı, meme kanserinde ise bir onkogen olarak fonksiyon gösteren miR-29a'dır (Gebeshuber ve ark., 2009). miRNA'lar bu fonksiyonlarını kullanarak kanser gelişiminin invazyon, metastaz, proliferasyon ve anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerinde rol oynamaktadır. Bu durumda yapılacak çalışmaların kanserin erken teşhisi veya tedavisi sırasında önemli olabileceği sonucunu doğurmuştur (Wijnhoven ve ark., 2007).

Hücre büyümesi, proliferasyon ve apoptoz, hücre sayısının ve biyolojik fonksiyonların iç stabilitesini ve dengesini düzenleyen önemli süreçlerdir (Li ve ark., 2016). Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü boyunca sıkı ve düzenli bir şekilde kontrol edilen bir hücre aktivitesi süreci vasıtasıyla gerçekleştirilir. Sikline bağımlı kinazlar (CDK'lar) hücre döngüsünün çekirdek düzenleyicileridir (Ruijtenberg ve

Heuve, 2016). Herhangi bir hücre çoğalması süreci belirli kuralları takip eder. Hücre döngüsü kontrolden çıktığında ve sınırsız hücre çoğaldığında, bir tümör hücresine dönüşmesi beklenmektedir (Urrego ve ark. 2014). Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır (Mohamed ve ark., 2017). Apoptozis hücre ölümü ve yenilenme arasındaki iç dengenin korunmasına katkıda bulunmaktadır (Davis ve ark., 2010). Apoptozis bozukluğu sıklıkla insan hastalıkları ile ilişkilidir. Örneğin, yetersiz apoptozis tümöre yol açabilir (Matsuura ve ark., 2016). Kısacası, hücre sınırsız çoğalması ve apoptozun anormal düzenlenmesi, HCC de dahil olmak üzere kanser oluşumunu teşvik edecektir.

Bununla birlikte, miRNA'ların çalışmalarında da bazı problemler bulunmaktadır. Birçok çalışma sadece deney aşamasında kalmakta ve klinik çalışma aşamasına geçilememektedir. Buna ek olarak, HCC erken tanı ve tedavi belirteçleri olarak hareket eden miRNA'ların güvenliği ve güvenilirliği ayrıca daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **4.6.1. Onkogen Olarak Tanımlanan miRNA'lar**

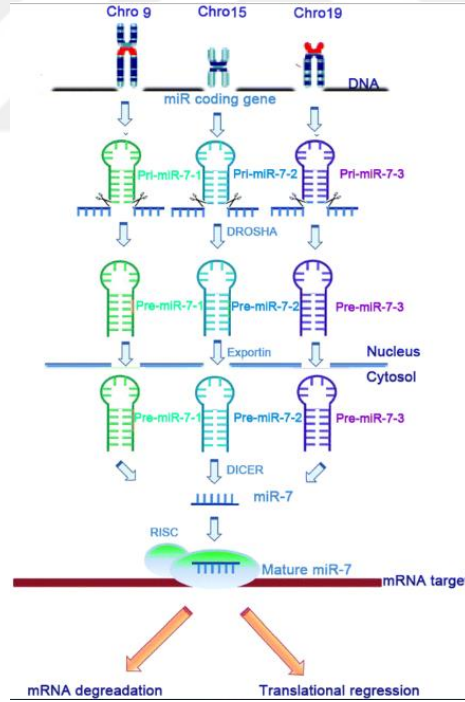
Kanserde, ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen olarak adlandırılmaktadır. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Onkogen olarak işlev gösteren miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genleri negatif yönde etkileyerek tümörün gelişmesini teşvik ederler. Pek çok miRNA geni farklı kanserlerde aşırı derecede ekspresyona uğramaktadırlar.

#### **4.6.2. Tümör Baskılayıcı Olarak Tanımlanan miRNA'lar**

Bu genler hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalması negatif yönde düzenlenerek tümör hücreleri anormal çoğalma gösterirler.

#### 4.7. miR-7 ile HCC İlişkisi Hakkında Genel Bilgiler

miR-7 ilk defa Lagos-Quintana tarafından 2001 yılında tanımlanmıştır (Lagos-Quintana ve ark., 2001). miR-7 meme, karaciğer, kolon, böbrek, beyin ve melanom gibi çok sayıda kanser türünde etki gösteren, tümör baskılayıcı bir miRNA olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda miR-7 sırasıyla, üç farklı genomik lokasyon (9q21, 15q26, 19q13) tarafından kodlanmaktadır. Bu üç farklı DNA sekansının “pri-miR-7-1, pri-miR-7-2 ve pri-miR-7-3” olarak adlandırılan ürünleri ise, 23 nükleotid içeren aynı olgun mir-7 dizisine işlenebilmektedir (Le Quesne ve Caldas, 2010). Olgun miR-7 daha sonra, miRNA sayesinde hedef mRNA’ları hatalı baz eşleşmesi yoluyla tanıyan RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC)’ne bağlanmakta ve bu işlem genellikle hedef mRNA’nın translasyonunun engellenmesi veya destabilizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Zhao ve ark., 2015).



Şekil 4.3. İnsan miR-7 Saç Tokası Prekürsörleri ve Olgun Dizilerinin Yapısı

HCC’de miR-1468’in aşırı ekspresyonu, G1’den S fazına geçişi ve apoptoz direncini desteklemiştir (Liu ve ark., 2018). miR-107’nin HCC hücreleri upregüle

ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015). miR-155-5p'nin HCC hücrelerinin çoğalma kabiliyetini arttırdığı ancak apoptozu önlediği bulunmuştur (Fu ve ark. 2017).

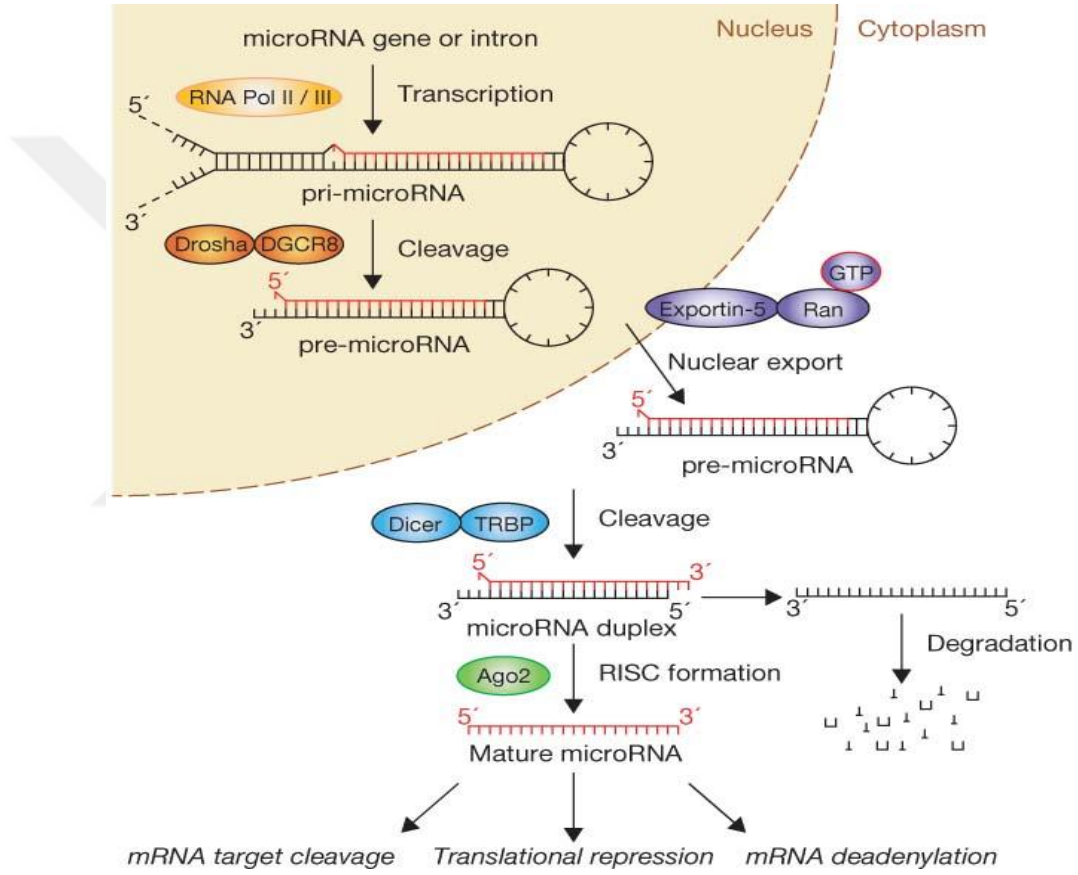
mir-7'nin akciğer ve mide kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser çeşidini downregüle ettiği ve tümör baskılayıcı fonksiyonu olarak görev yaptığı kanıtlanmıştır (Horsham ve ark., 2015; Kalinowski ve ark., 2014). Geçmiş çalışmalarda hedef alınan bazı kanser çeşitlerinde mir-7 onkogen olarak tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2014; Chang ve ark., 2015). miR-7'nin, normal hücrelere kıyasla, HCC hücrelerin önemli ölçüde downregüle olduğu görülmüştür. HCC'nin Hep G2 kanser hücrelerine mir-7 eklenmesi sonucunda, hücrelerin çoğalması inhibe edilmiştir (Wang ve ark., 2017). miR-7'nin aşırı ekspresyonu, HCC hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde baskılamış ve daha da önemlisi, artan otofajiye eşlik etmiştir. Ayrıca, otofajinin negatif regülatörü olan mTOR'un, miR-7'nin doğrudan bir hedefi olduğu gösterilmiştir. (Wang ve ark., 2017)

miR-7, evrimsel olarak korunmuş bir miRNA'dır (Kalinowski ve ark., 2014). miR-7 çeşitli mekanizmalar ile pek çok kanser hücresi türünün büyümesini baskılamaktadır. Çok sayıda miRNA'nın etkinlik gösterdiği HCC hücre hattında, miR-7 ailesi tümör baskılayıcı etkinliğe sahip önemli bir miRNA grubu olarak tanımlanmaktadır (Fang ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2014; Wang ve ark., 2017; Kabir ve ark. 2018). Yukarıda bahsedilen özellikleri sebebi ile son yıllarda miRNA ekspresyon profilinin HCC oluşumunda ve ilerlemesinde biyo-marker olabileceği anlamına gelmektedir.

#### **4.8. miRNA Biyogenezi Hakkında Genel Bilgiler**

miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II aracılığında transkripsiyon ile başlamakta ve hairpin yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA) oluşmaktadır. Hairpin yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroprosesör tarafından kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda prekürsör miRNA'nın (pre-

miRNA) oluşmasına neden olur. Prekürsör hairpin nükleustan Exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır ve diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA'ya kesilir. Olgun diziye kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC) Argonaute'a yüklenir. MikroRNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi hedef mRNA ile tam olarak eşlendiğinde mRNA'nın destabilizasyonu sağlanır. Eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'i indükler ve mRNA destabilizasyonu ya da translyasyonel baskılanmaya neden olur. Bahsedilen sürecin gösterimi Şekil 4.4'te sunulmaktadır (Winter ve ark., 2009).



**Şekil 4.4.** miRNA Biyogenezisi

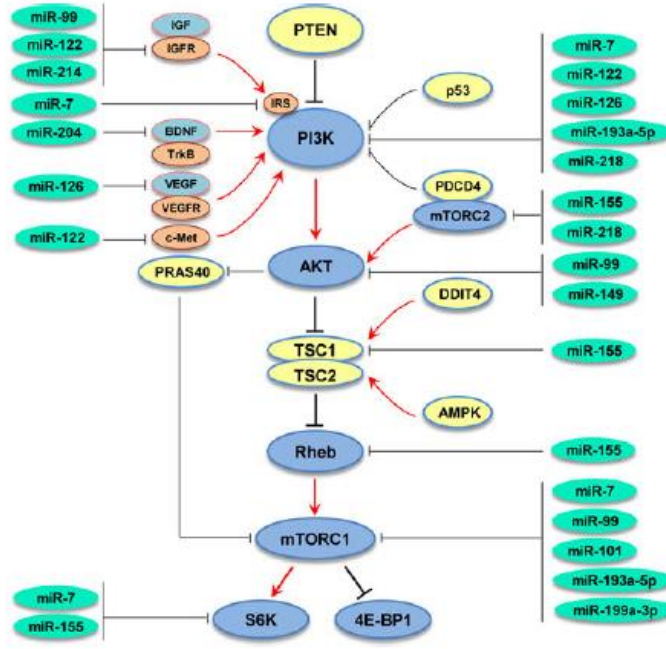
#### 4.9. mTOR ve HCC Arasındaki İlişki Hakkında Genel Bilgiler

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin, Rapamisi - Protein Kompleksinin Memeli Hedefi) hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli role sahiptir. mTOR

katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi gören bir kinazdır (Faivre ark., 2006).

Kanserde önemli olduğu saptanan üç temel sinyalizasyon yolu; PI3K/AKT/mTOR kinaz zinciri, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/Ras bulunmaktadır. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının çeşitli hücre tiplerinde başlıca proliferasyon, apoptoz ve otofaji yanıtlarında önemi bilinmektedir. PI3K/AKT sinyal yolunun önemli bir düzenleyicisi olan mTOR, besin düzeyini kontrol eden, G1 fazından S fazına geçiş sağlayan ve sinyal yolağının akış aşağı aktivasyonunda anahtar bir kinazdır. G1 fazında metabolizma açısından aktif olan hücre hacim olarak büyümektedir. S fazında DNA'nın kopyalanması ve replikasyon işlemi gerçekleşmektedir. G2 fazında mitoz için gerekli proteinler sentezlenerek hücre büyümesi gerçekleşmektedir. M fazında hücre bölünerek iki eş yavru hücre oluşturmaktadır. G0 fazı ise metabolik aktivitelerini sürdürmekte olan hücreler olup bölünme özelliği göstermemektedir. mTOR aktivasyonu sonucunda hücre bölünmesine öncülük eden moleküllerin zincirleme aktivasyonu gerçekleşmekte ve böylece mTOR hücre içi ve hücre dışı sinyalleri birleştirerek büyüme, çoğalma ve hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve hayatta kalmanın merkezi fonksiyonlarında görev almaktadır (Laplanche ve Sabatini, 2009). Besin yokluğu durumunda mTOR aktivitesinin baskılandığı bilinmektedir. HCC'lerin bir kısmında mTOR aktivasyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu da, kanser hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı, kemoterapiye direnci ve anjiyogenez süreçleri ile ilişkili olup, kanser tedavisi için alternatif bir moleküler hedef olarak görülmektedir.

Biriktirilmiş kanıtlar, miRNA'ların, mTOR yolağının farklı aşamalarını hedef alarak, tümör oluşumuna ve kanser metastazına katkıda bulunduğunu gösterir. Bazı miRNA'lar doğrudan mTOR'u hedef alırken, diğerleri PI3K ve AKT gibi yolun diğer bileşenlerini hedefleyerek mTOR sinyalini almaktadır. mTOR yolunu hedefleyen kapsamlı bir miRNA listesi Şekil 4.5'te sunulmaktadır. Bu listede mTOR ve S6K1 target genler ile miRNA-7'nin HCC'de tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir. (Zhang ve ark., 2017)



**Şekil 4.5.** mTOR Yolunu İnhibe Eden Tümör Baskılayıcı miRNA'lar

Çok sayıda miRNA, mTOR'u ve / veya mTOR'un yukarı akıştaki pozitif regülatörlerini doğrudan hedefleyerek tümör baskılayıcı aktivite sergiler.

mTOR'a benzer şekilde, miRNA'lar çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere geniş hücresel fonksiyonları düzenler. Bu derleme, mTOR sinyalini kesen miRNA profilleri ile ilgili mTOR sinyalini düzenleyen miRNA'ların düzenleyici mekanizmasına ve mTOR ve miRNA biyogenezi arasındaki bağlantıya özel önem vererek, mTOR profillerine ilişkin güncel bilgileri gözden geçirmeyi amaçlamaktadır. İlişkilerinin ayrıntılı olarak anlaşılmasının kanser teşhisi, tedavi ve prognoz üzerindeki etkileri vardır.

Olgun miRNA-7 (miR-7), insan genomundaki miRNA öncüllerinden miR-7-1 (9q21.32), miR-7-2 (15q26.1) ve miR-7-3 (19p13.3)'ten türetilir. Çoklu kanser tiplerinde tümör baskılayıcı olarak gösterilmiştir. miR-7, kısmen IRS-2 ekspresyonunu ve ardından AKT-mTOR sinyalini doğrudan inhibe ederek glioblastomu baskılar (Kefas ve ark., 2008). Adrenokortikal karsinomlarda, miR-7'nin nanopartikül iletimi

ile sistemik olarak verilmesi, hem hücre dizisi hem de hasta kaynaklı ksenografik tümörlerinin büyümesini azaltır (Glover ve ark., 2015).

HCC'de miR-7'nin doğrudan hedefleme PIK3CD, mTOR ve p70S6K'yı kodlayan HCC'nin tümörgenezi ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Fang ve ark., 2012).

HCC PIK3CD (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta) ve mTOR hedefleri; onkogenik yolun koordineli olarak baskılandığı görülmektedir (Fang ve ark., 2012). Benzer şekilde HCC hücrelerini miRNA-7 aracılı G1 fazında baskılandığı kanıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2014).

#### **4.10. Gen Tedavisi Hakkında Genel Bilgiler**

Günümüzde, mevcut ilaçlar, kanser tedavisinde çoğunlukla yetersiz kalmakta ve ciddi yan etkiler oluşturmaktadır. Kanser tedavisi sürecinde normal hücreleri etkilemeden direkt olarak kanser hücrelerini hedefleyen değişik stratejiler geliştirilmektedir. Gen tedavisi de mevcut tedavilere alternatif bir tedavi yöntemi olarak araştırılmaktadır. Kanser gen tedavisinde kullanılan antigen ve antisens moleküller ile yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır. Gen tedavisi, farmasötik ürün olarak genlerin kullanılması aracılığıyla eksik, hatalı ve istenilen şekilde fonksiyon göstermeyen gene işlevselliğinin yeniden kazandırılması için kanser, genetik ve infeksiyöz hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel tedaviye alternatif bir yaklaşımdır. Gen tedavisi ile ilgili çalışmadan başarılı bir sonuç alabilmek için; kalıtsal hastalığa neden olan genin belirlenmesi ve klonlanması, hastalığın ve hedef hücrenin tanınması, genin istenen hücreye nakledilmesi ve ekspresyonu ile gen naklinin olası yan etkilerinin tespit edilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Gen tedavisi (1) Hedef alınan dokunun niteliğine, (2) Vektörün hastaya uygulanma biçimine ve (3) Kullanılan vektör tipine göre sınıflandırılmaktadır.

Kullanılan vektörler açısından gen tedavisi; viral ve viral olmayan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Başka bir deyişle sırasıyla, biyolojik vektörler ve kimyasal veya fiziksel yöntemler olarak da ifade edilebilmektedir. İdeal bir vektörün özellikleri arasında;

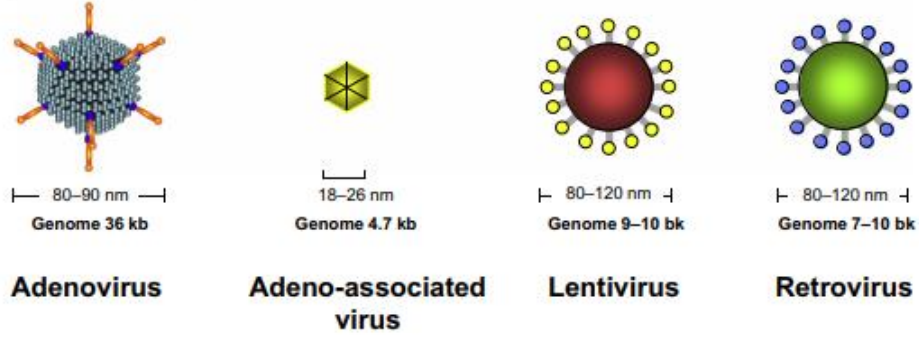
- Kolay tasarlanabilmesi,
- Yeterli taşıma kapasitesine sahip olması,
- İmmün sistemi tarafından algılanmaması,
- Uzun süreli ekspresyon yapabilmesi,
- Toksik olmaması,
- Biyobozunur olması,
- Kolay bir proses ile yüksek konsantrasyonlarının ucuza üretilmesi,
- Stabil olması ve
- Hedef hücrelere girebilmesi olarak sayılabilmektedir.

#### **4.10.1. Viral Vektörler Hakkında Genel Bilgiler**

Viral vektörler, virüslerin hastalığa yol açan ve virüsün çoğalmasından sorumlu olan genlerin yerine, hastaları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirilmektedir. Viral yöntemlerde kullanılan virüsler arasında; retrovirüs, adenovirüs, adeno ilişkili virüs, ördek hepatit virüs, parvovirüs, sendaivirüs bulunurken en çok kullanılan viral vektörler; retrovirüsler, adenovirüsler, herpesvirüsler ve adeno ilişkili virüslerdir (Worgall ve Cyrstal, 2014). Şekil 4.6'da viral vektörler gösterilmektedir. Bu viral vektörlerin sahip olduğu spesifik dezavantajlar Tablo 4.2.'de sunulmaktadır. Virüsler her ne kadar gen tedavisinde kullanılan en etkili araç olsa da bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajları:

- Biyolojik ajan olmaları sebebi ile kaybettikleri patojenik özelliklerini yeniden kazanabilirler.
- Konakçının immün sistemini uyarırlar.

- Büyük miktarlardaki üretimi kompleks bir proses gerektirmekle birlikte maliyeti yüksek bir işlemdir.
- Taşıyabileceği DNA miktarı sınırlıdır.



Şekil 4.6. Yaygın Olarak Kullanılan Viral Vektörler

Tablo 4.2. Viral Vektörlerin Avantaj ve Dezavantajları

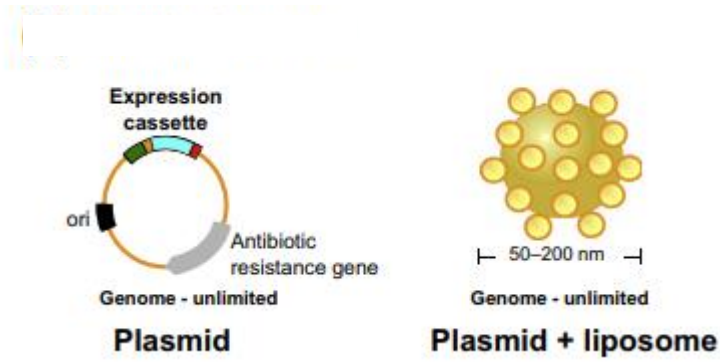
Viral Vektör	Avantaj	Dezavantaj
<b>Retrovirüs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Hücrelere etkili bir şekilde girmektedir.</li> <li>*Viral genler içermemektedir.</li> <li>*Stabil bir şekilde birleştirmektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Üretimi zordur.</li> <li>*Boyutu sınırlıdır.</li> </ul>
<b>Adenovirüs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Hücrelere etkili bir şekilde girmektedir.</li> <li>*Terapötik genin yüksek ekspresyonunu sağlamaktadır.</li> <li>*Konakçı kromozumuna birleştirmemektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Viral genlerin vektör içerisinde olması gerekmektedir.</li> <li>*İmmün sisteminin cevabına neden olmaktadır.</li> </ul>
<b>Adeno ilişkili virüs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Kromozoma spesifik kısımlardan birleştirmektedir.</li> <li>*İmmün cevaba neden olmamaktadır.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Küçük boyutta genleri içine alabilmektedir.</li> <li>*Üretimi zordur.</li> </ul>
<b>Herpesvirüs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Yüksek miktarda üretilmektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Üretimi zordur.</li> </ul>

Klinik güvenlik sorununun dışında, viral taşıyıcı sistemler; küçük taşıma kapasitesi, uzun süreli transgen ekspresyonunun olmaması, tekrarlayan uygulamalara direnç, büyük ölçüde farmasötik kalitede üretim zorluğu ve kalite kontrolü gibi bazı diğer kritik problemler göstermiştir. Bu da viral vektörlerin kullanımının yeniden gözden geçirilmesine yol açtı ve viral taşıyıcı için toksisite sorunlarının üstesinden gelebileceğinden dolayı viral-olmayan taşıyıcılar üzerindeki araştırmayı hızlandırmıştır (Yang ve ark., 2014).

Güvenli ve etkin bir şekilde hedef hücrelere terapötik genleri taşıyabilmek için, viral olmayan vektörler üzerine yapılacak çalışmalar oldukça önemlidir.

#### **4.10.2 Viral Olmayan Vektörler Hakkında Genel Bilgiler**

Viral olmayan vektörler Tablo 4.2.'de de kısaca değinilen viral vektörlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak üzere geliştirilmiştir. Viral olmayan vektörlerin terapötik geni taşıyabilmesi için plasmide ihtiyacı bulunmaktadır (Saka Ongun Mehmet, 2009, s. 145). Plasmid, kendi kendini eşleyebilen, kromozomdan ayrı bir DNA parçasıdır. Plasmidler, çok sayıda, kolay ve ucuz elde edilmeleri, çift iplikçikli, sarmal bir yapıya sahip olmaları, yapılarında seleksiyonda önemli fonksiyonu olan bazı spesifik markerlerin (ampr, telr, kanr, lac+, gibi) bulunması, belli uzunlukta yabancı genleri kabul etmeleri, infeksiyöz olmamaları, restriksiyon endonukleaz için bazılarında bir tek kesim yerinin bulunması, replikasyon orijinine sahip olmaları ve buna bağlı olarak hücre içinde bağımsız olarak replikasyon özelliği taşıması, gibi hususlar plasmidlerin fazla oranda vektör olarak kullanılmalılarının başlıca nedenleri arasında gelmektedir. Viral olmayan vektörler; çıplak plasmid DNA doğrudan vücuda uygulanabildiği ya da tedavi edici geni taşıyan plasmid DNA'nın ve kısa nükleik asitlerin transfeksiyon etkinliğini artırmak amaçlı çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler aracılığıyla da uygulanabilmektedir. Şekil 4.7.'de viral olmayan vektörler gösterilmektedir. Modern viral olmayan sistemler genelde transgenlerin lipidler, polimerler ya da polipeptidlerle kompleks yaparak / paketlenerek uygulanmasını baz almaktadır. (Kuscu ve Sezer, 2016).



**Şekil 4.7.** Yaygın Olarak Kullanılan Viral Olmayan Vektörler

\*Fiziksel Uygulamalar: Fiziksel gen iletim sistemlerinin ilkesi; hücreye difüzyonla DNA geçişine izin veren geçici yaralanma veya defektlere sebep olarak hedef hücrenin membranında geçici olarak zayıf noktalar oluşturmak için mekanik, ultrasonik, elektrik, hidrodinamik veya lazer-temelli enerji kullanmaya dayanmaktadır (Ibraheem ve ark., 2014).

\*Kimyasal Uygulamalar: Kimyasal uygulamalar viral vektörlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için umut verici alternatifler olarak önerilmektedirler. Bu vektörlerin hücre nükleusuna gen transferini artıran üç amacı vardır. Bunlar arasında (1) DNA negatif yüklerin maskelenmesi, (2) DNA molekülünü daha küçük hale getirmek için sıkıştırılması ve (3) Nükleik asitlerin intraselüler nükleazlar tarafından degradasyonundan korunması sayılabilmektedir. Bu hedefler, ya anyonik DNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimle ya da biyobozunur polimerlerle enkapsülasyonu veya adsorpsiyonuyla DNA'nın paketlenmesi yoluyla elde edilebilir (Ibraheem ve ark., 2014).

#### 4.11. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler

Kitozan deniz kabuklularının iskeletinde bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen katynoki bir polisakkarittir. Bazı mantar türlerinde bulunan kitin, doğada selüloza oranla daha yaygın bulunan bir polisakkarittir. Kitozan; D-glikozamin ve N-

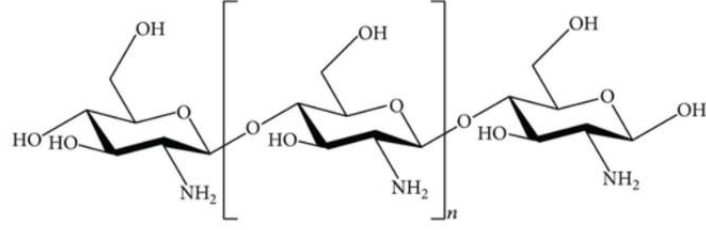
asetil-D- glukozamin birimlerinin tekrarlarından oluşan, 1-4 glikozidik bağ ile bağlı, biyobozunur bir polimerdir (Onishi ve Machida, 1999).

Kitozan birkaç fizikokimyasal özellikleri ile sınıflandırılabilir. Bu özellikler molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, vizkozite ve kristallanma derecesidir. Kitozanın çözünürlüğü deasetilasyon derecesine ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kitozan asetik asit, sitrik asit, hidroklorik asit, glutamik asit, aspartik asit ve laktik asit gibi asidik pH'lı ortamlarda çözünürken, nötr pH ortamında çözünmemektedir.

Kitin ve kitozan mikroorganizmada bulunan lizozomal enzimler tarafından enzimatik yıkıma maruz kalmaktadır. Bu enzimatik yıkım sonucunda glikozamin açığa çıkmaktadır. Kitozanın enzimler tarafından parçalanabilir olması ve açığa çıkan ürünün doğal bir monosakkarit olması, bu polimerin farmasötik alanında kullanılması açısından önem arz etmektedir (Shigemasa ve Minami, 1996).

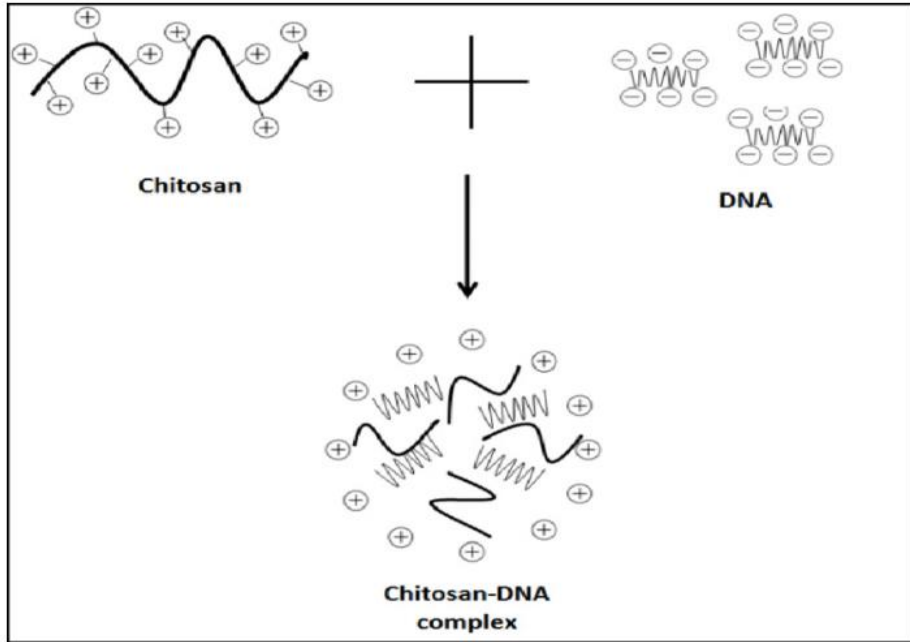
Doğal bir kitozan polimeri tarım, gıda, sağlık gibi birçok alanda kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde kitozan sıklıkla ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi sırasında nanopartiküler ve mikropartiküler sistemlerin hazırlanması için kullanılmaktadır. Kitozan sadece ilaç taşımak için değil aynı zamanda nükleik asit taşınmasında (pDNA, siRNA, shRNA, miRNA gibi) da en çok kullanılan doğal polimerlerden bir tanesidir (Katas ve Alpar, 2006). Mumper ve ark., tarafından ilk defa 1995 yılında yapılan bir in vitro çalışmada pDNA taşınması için kitozan potansiyel taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Kitozan biyouyumlu, düşük immünojeniklik ve düşük sitotoksikite nedeniyle tercih edilen bir polimer olmakla birlikte aynı zamanda doğal bir katyonik polisakarittir. Kimyasal yapısı Şekil 4.8.'de gösterilmektedir (Chen, 2013).



**Şekil 4.8.** Kitozan Molekülünün Kimyasal Yapısı

Kitozanın kationik yapısından kaynaklı sahip olduğu pozitif yükü, elektrostatik olarak negatif yüklü olan DNA ile bağlanmaktadır. Kitozan ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşim Şekil 4.9.'da gösterilmektedir (Raftery ve ark., 2013).



**Şekil 4.9.** Kitozan ve DNA Arasındaki Elektrostatik Etkileşim

Yapılan çalışmalarda kitozanın DNA'ya bağlanıp pozitif yüklü bir Kitozan-DNA kompleksinin oluşumuna yol açtığı görülmüş ve viral olmayan gen tedavi

yöntemleri için bir potansiyel olduğu belirtilmiştir (Corsi ve ark., 2003). Yüksek konsantrasyonlar altında dahi toksik olmaması, kitozanı en çok çalışılan viral olmayan vektörlerden biri yapmıştır (Ramamoorth ve Narvekar, 2015). miRNA ve kitozanla ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Safari, vd., 2012).

Viral olmayan vektörlerin biyoyumlu olması, güvenilir olup düşük toksisiteye sahip olması, biyobozunur olması, serum içerisinde stabil olması, kolay üretilmesi, üretim maliyetinin düşük olması, gibi avantajları bulunurken toplam aktarım veriminin düşük olması ve kısa süreli ekspresyon oluşturmaları dezavantaj olarak sayılabilmektedir.

#### **4.12. Kitozan ve miRNA Hakkında Genel Bilgiler**

Kitozanın miRNA taşıyıcısı olarak kullanıldığı çok az sayıda yayın mevcuttur. Kitozanla yapılan çalışmada (Chen ve ark., 2014), operasyon sonrası Achilles tendon iyileşmesindeki problemlerin çözümü için kitozan araştırılmış kitozanın miR-296 ekspresyonunu belirgin oranda artırdığı saptanmıştır. Diğer bir çalışmada akciğer kanseri teşhis ve görüntülenmesinde kitozan/miR-155 moleküler beakon kombinasyonu kullanılmıştır (Zhu ve ark., 2014). Deng ve arkadaşları üçlü negatif meme kanserinde, doksarubisin ve miR-34a içeren hyalunorik asit-kitozan nanopartiküllerini kullanmışlar, anti-tümör tedavide olumlu sonuç alındığını rapor etmişlerdir (Deng ve ark., 2014)

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemesi

Amonyum molibdat	Sigma (ABD)
Asetik asit	E. Merck (Almanya)
Borik asit	Sigma (ABD)
Bromfenol mavisi	Sigma (ABD)
Dimetil sülfoksit	Sigma (ABD)
DMEM	Biological Industries (İsrail)
EDTA	Sigma (ABD)
Etanol (absölü)	Riedel de Haen (Almanya)
Etidyum bromür	Sigma (ABD)
Fenol	Sigma (ABD)
Featal bovin serum	Biological Industries (İsrail)
Formaldehit	E. Merck (Almanya)
Glasiyal asetik asit	E. Merck (Almanya)
Gliserol	Fluka (Almanya)
Hidrojen florür	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit	E. Merck (Almanya)
Kitozan	Sigma (ABD)
Kloroform	E. Merck (Almanya)
Metanol	E. Merck (Almanya)

Sodyum hidroksit	J. T. Baker (ABD)
Sodyum klorür	Sigma (ABD)
Tripan mavisi	E. Merck (Almanya)
Tripsin 1:250	Sigma (ABD)
Trizma base	Roche (Almanya)

### 5.1.2. Kullanılan Cihazlar

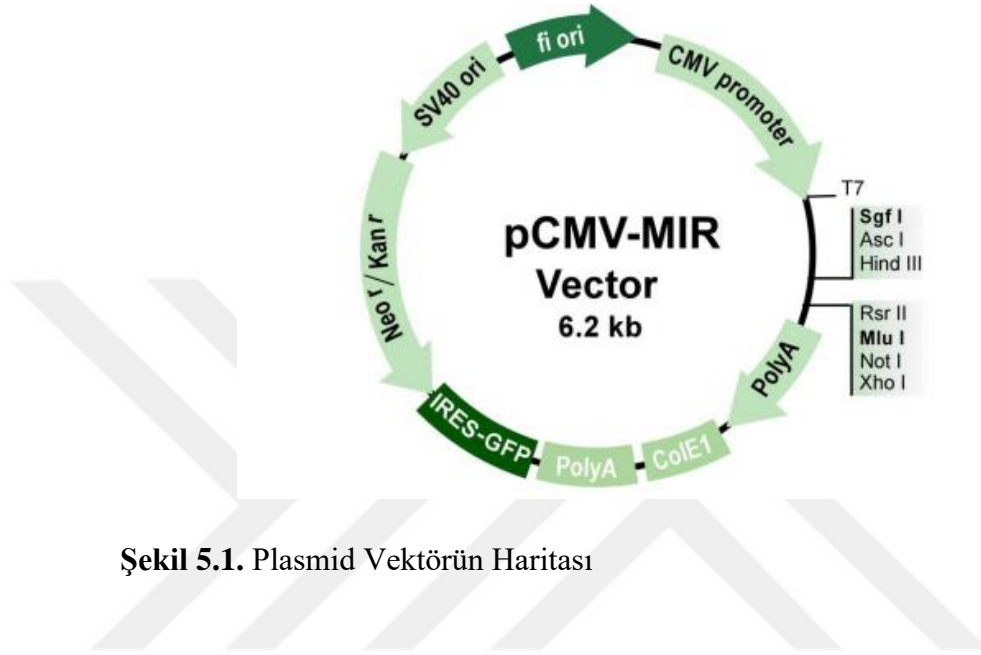
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-80)	Nuar (ABD)
Distile Su Cihazı	GFL (Almanya)
Elektrofez Güç Kaynağı	EC-Techne (İngiltere)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Etüv	Memmert (Almanya)
Floresan Mikroskop	Olympus BX50 (Japonya)
Dijital Fotoğraf Makinesi	Olympus (Japonya)
Hassas Terazı	Shimadzu (Japonya)
Horizontal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Isıtıcı Tabla	Ika - Werk (Almanya)
İnvert Mikroskop	Olympus BH40 (Japonya)
Jel Analiz Sistemi	Kodak 1D Dijital Science (ABD)
JVC Spot Junior Kamera Sistemi	JVC (Japonya)
Karbondioksitli Etüv	Sanyo (Japonya)
Konfokal Mikroskop	Zeiss

Laminar Akışlı Doku Kültürü Kabini	Holten – Safe 2000 (Danimarka)
Manyetik Karıştırıcı	Ika – Werk (Almanya)
Mekanik Karıştırıcı	Ika – Werk (Almanya)
Mikropipet Seti	Gilson (Fransa)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Mili-Q Su Sistemi	Milipore (ABD)
Otoklav	Kermanlar (Türkiye)
Partikül Ölçüm Cihazı	Malvem HSA 3000 (İngiltere)
pH Metre	WTW (Almanya)
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Spektrofotometre (Japonya)	Shimadzu BioSpec-1601
Tranmission Elektron Mikroskobu	Jeol (Japonya)
Terazi	Sartorius (Almanya)
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat (Fransa)
Vertikal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Yatay Jel Elektrofez Cihazı	Atto (Japonya)
Yüzey Yükü Ölçüm Cihazı	Malvern HSA 3000 (İngiltere)

### 5.1.3. Plasmid miRNA Yapısı

Tez çalışmasında ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen pCMV-MIR (Origene ABD) vektörü kullanılmıştır. pCMV-MIR, 6219 baz çifti uzunluğunda bir plazmid vektördür. Yapısında: İnsan CMV erken promotörü olarak “CMV Promoter”, insan büyüme hormonu sinyali olarak “PolyA”, yüksek kopya yapılabilmesi ColE1

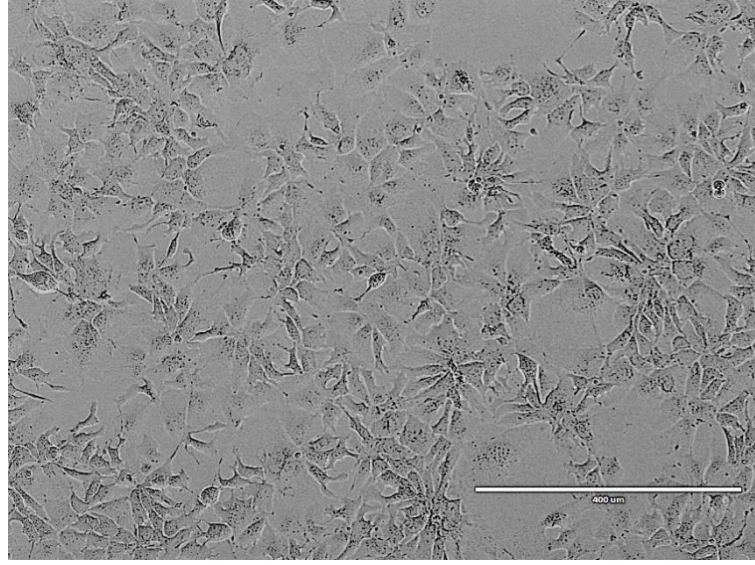
replikasyon kaynağı olarak “ColE1”, neomisin, kanamisin ve G418’e direnç kazandırılabilmesi için “Neor/Kanr”, dahili ribozom giriş bölgesi olarak “IRES”, yeşil floresan proteini olarak “GFP”, SV40 artırıcı ve erken promotörü olarak “SV40 ori” ve f1 bakteriyofaj replikasyon orijini olarak “f1 ori” bulunmaktadır. Plazmid vektörünün haritası Şekil 5.1.’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Plazmid Vektörün Haritası

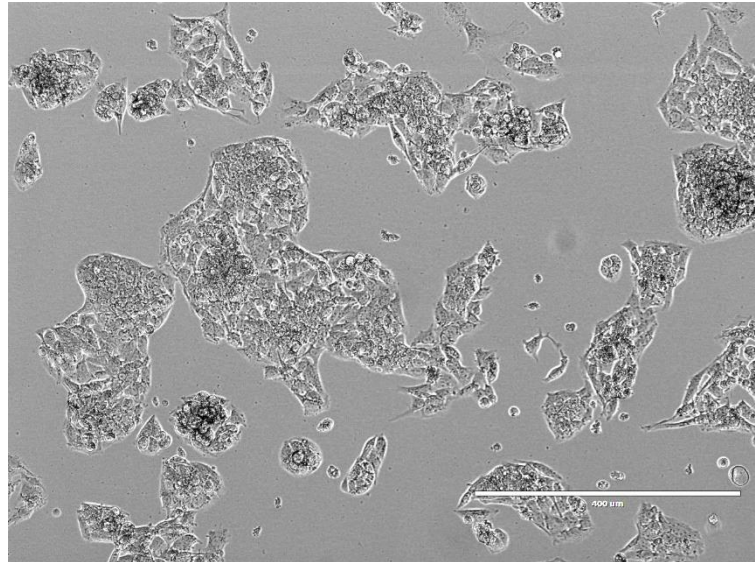
#### 5.1.4. Hücre Hatları Yapısı

Hep 3B: Hep 3B hepatoselüler karsinoması olan 8 yaşındaki siyahi bir erkek çocuğunun karaciğer dokusundan türetilmiş insan karaciğer karsinomu hücrelerinden oluşan bir hücre hattıdır. Hep3B hücrelerinin morfolojisi epiteldir. Hep 3B hücreleri HBV virüsü içermektedir.



**Resim 5.1.** Hep 3B Hücre Hattı Yapısı  
(<http://lccl.zucmanlab.com/hcc/cellLines/Hep3B>, Erişim tarihi: 9 Nisan 2019)

Hep G2: Hep G2 hepatoselüler karsinoması olan 15 yaşındaki genç bir Kafkas erkeğinin karaciğer dokusundan türetilmiş insan karaciğer karsinomu hücrelerinden oluşan bir hücre hattıdır. Hep G2 hücrelerinin morfolojisi epiteldir. Yapısında HBV virüsü içermemektedir.



**Resim 5.2.** Hep G2 Hücre Hattı Yapısı  
(<http://lccl.zucmanlab.com/hcc/cellLines/HepG2>, Erişim Tarihi: 9 Nisan 2019)

Yukarıda bahsi geçen özellikler Tablo 5.1.'de toplu bir şekilde gösterilmektedir.

**Tablo 5.1.** Hep 3B ve Hep G2 Hücre Hatlarının Özellikleri

<b>Hücre Hattı Yapısı</b>	<b>Yaş</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Coğrafi Köken</b>	<b>Etnik Köken</b>	<b>HBV</b>	<b>HBC</b>
Hep 3B	8	Erkek	ABD	Afrikan Amerikan	+	-
Hep G2	15	Erkek	ABD	Avrupa	-	-

#### 5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler

##### 5.1.5.1. Besiyerleri

- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**

- i) **4 X DMEM Çözeltisi (-)**

DMEM besiyeri 250 ml steril bidistile su içerisinde çözündürülmüş ve 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filtreden süzülerek sterilize edilmiştir.

- ii) **Sodyum Bikarbonat Çözeltisi (%10)**

100 g sodyum bikarbonat 1 litre steril bidistile su içerisinde çözündürülmüş ve 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filtreden süzülerek sterilize edilmiştir.

- iii) **1 X DMEM Çözeltisi**

100 mL serum, 250 mL 4X DMEM (-) çözeltisi, 100 IU/mL penisilin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomisin ve 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amfoterisin üzerine 20 mL %10 (a/h) sodyum

bikarbonat çözeltisi eklenerek pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır. Çözelti hacmi steril bidistile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında doğrudan bu çözelti kullanılmıştır.

- **MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit**

#### 5.1.5.2. Çözeltiler

- **Elektroforez Yürütme Çözeltisi (x10)**

6,055 g Tris (50 mM), 82 g Glisin (384 mM) ddH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür. ddH<sub>2</sub>O ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

- **Elektroforez Yükleme Tamponu (x6)**

%0,25 Bromfenol Mavisi

%0,25 Ksilen Siyanol

%30 Gliserol

Hazırlanan elektroforez yükleme tamponu, küçük hacimlere bölünerek 4°C'de muhafaza edilmiştir. Jel elektroforezi çalışmaları esnasında elektroforez yükleme tamponu, örnekler ile 1:5 oranda karıştırılarak kullanılmıştır.

- **Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0,5 M, pH 8)**

186,1 g EDTA 800 mL bidistile suda çözüldürülmüştür. Pellet halinde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlanmış ve hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir. (EDTA mol ağırlığı = 372.2)

- **Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (%5 (a/h) )**

5 g EDTA tartılıp 80 mL distile su içerisinde çözündürülmüş, hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7,2'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir.

- **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

0,1 g etidyum bromür 10 mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

- **Fenol – Kloroform – İzoamil Alkol (25 / 24 / 1)**

Kristal halde fenol, 65°C'de eritildikten sonra, oksidasyonu önlemek için son konsantrasyonu % 0.1 (a/h) olacak şekilde 8-hidroksikinolin eklenmiştir. Fenol, kloroform – izoamil alkol ile karıştırılmadan önce Tris-HCl tamponu ile doyurulmuştur. Bunun için fenol üzerine eşit hacimde 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) eklenmiş ve kuvvetlice karıştırılmıştır. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için emülsiyon +4°C'de 60 dakika bekletilmiştir. Üstte oluşan Tris-HCl fazı uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem 0,1 M Tris-HCl tamponu ile fenolün pH değeri 7,8'den büyük olana kadar tekrarlanmıştır. Tris-HCl tamponu ile doyurulan fenol eşit hacimde kloroform - izoamil alkol (24/1) ile karıştırılmış ve üzerine yaklaşık 0,1 hacim 0,1 M Tris-HCl tamponu eklendikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

- **Fizyolojik Fosfat Tamponu (PBS pH 7,4)**

2,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,190 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8 g NaCl tartılarak 800 mL bidistile suda çözündürülerek 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'sı ölçüldmüştür. Asidik ise Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; bazik ise KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek pH 7,4'e ayarlanmıştır.

- **Glukoz Çözeltisi (0,5 M)**

9,01 g glukoz bidistile su içerisinde çözündürülerek 100 mL'ye tamamlanmıştır. (Glukoz mol ağırlığı = 180.2)

- **5 N Hidroklorik asit (HCl) Çözeltisi**

41,44 mL % 37 (a/h)'lik HCl alınıp 100 mL'ye tamamlanmıştır.

- **Kitozan Çözeltisi**

Çözeltilerin hazırlanmasında molekül ağırlığı 70 kDa olan düşük (L) moleküler ağırlıklı kitozan kullanılmıştır. 1 g kitozan tartılıp 100 mL Tris-asetat tamponu (pH 5,0) içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan kitozan çözeltileri kompleks hazırlanmasında kullanılmıştır.

- **Liziz Tamponu**

25 mM Tris-PO<sub>4</sub> tamponu (pH 7,8)

2 mM EDTA

2 mM DTT

% 10 Gliserol

% 1 Triton X-100

Liziz tamponu 0,22 µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilize edilmiştir ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- **RIPA Tamponu**

10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, % 1 NP-40, PMSF, %25 gliserol, 0,2 mM EDTA içeren tampon hazırlanmıştır.

- **Sodyum Fosfat Tamponu (0.2 M, pH 7,5)**

10.74 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  150 mL bidistile su içerisinde konsantrasyonu 0,2 M olacak şekilde çözündürülmüştür. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mol ağırlığı = 358,14) 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mL bidistile su içerisinde konsantrasyonu 0,2 M olacak şekilde çözündürülmüştür. ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mol ağırlığı = 156,01) Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinin pH değeri yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi ile 7,5'e ayarlanmıştır.

- **Tripan Mavisi Çözeltisi (% 0.4 (a/h))**

0,4 g Tripan mavisi tartılıp PBS içerisinde çözündürülmüş ve hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

- **Tripsin Çözeltisi (% 0.25 (a/h))**

2,5 g Tripsin 1 litre steril PBS (pH 7.4) içerisinde çözündürülmüştür. 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Hazırlanan bu çözelti  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

- **Tripsin – EDTA Çözeltisi (% 0,05 (a/h) : % 0.05 (a/h))**

10 mL % 5 (a/h) EDTA çözeltisinin üzerine 200 mL % 0,25 tripsin çözeltisi eklenmiş, steril PBS pH 7,4 ile hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

- **5 X Tris – Borik Asit – EDTA (TBE) Çözeltisi**

54 g Tris ve 27,5 g borik asit 800 mL bidistile su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti üzerine 20 mL 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) eklenmiştir. Çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Elektroforez tamponu olarak veya agaroz jelin hazırlanmasında 1/5 oranında seyreltikten sonra kullanılmıştır.

- **Tris – HCl Tamponu (1 M, pH 8,0)**

121,1 g Tris, 800 mL bidistile su içerisinde çözündürülmüştür. 5 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan Tris - HCl tampon çözeltisi otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir. (Tris mol ağırlığı = 121.1)

## **5.2. Yöntem**

### **5.2.1. Plasmid miRNA ile Yapılan Çalışmalar**

Plazmid miRNA olarak tez çalışmasında ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen pCMV-MIR vektörü kullanılmıştır (Origene, ABD). pCMV-MIR plazmidine ilişkin bilgiler bölüm 5.1. Gereç kısmında 5.1.3. Plasmid miRNA Yapısı başlığı altında ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

### **5.2.2. Plasmid miRNA'nın Transformasyonu**

Ticari olarak satın alınan plazmid vektör *Escherichia coli* uygun konak bakterisine transforme edilmiş halde liyofilize diske emdirilmiş olarak gelmiş ve disk üzerine önceden 37 °C'a ısıtılmış 1 ml LB besiyeri eklenerek 37°C'da 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, pDNA'da marker gen olarak yer alan antibiyotiği içeren seçici besiyerine 0,1 ml hacimde yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim sonrası petriler, 37°C'daki etüve kaldırılmıştır. Petrilerde gelişen kolonilerden, gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılmak üzere petri, eğri besiyeri ve gliserine stok alınmıştır. Alınan stoklardan pDNA izolasyonu ve kontrolleri yapılmıştır.

### 5.2.3. Plasmid miRNA'nın İzolasyonu

Stoğa alınmış pDNA içeren uygun *Escherichia coli* suşundan plazmid DNA izolasyonu, Birnboim ve Doly'nin modifiye alkali-liziz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transforme edilen *E.coli* suşunun 100 µg/ml konsantrasyonda 10 ml LB besiyerinde doymuş kültürü hazırlanmıştır. Hazırlanan ön kültürden 1000 ml antibiyotikli LB besiyerine ekim yapılacak ve 37°C'da 18-24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Elde edilen doymuş kültürler, +4°C, 10000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Besiyeri kalıntılarının uzaklaştırılması amacı ile 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) ve 1 mM EDTA içeren STE tamponu ilavesi ile hücreler yıkanmış, hücre çöktürüsü 2,5 mg/ml nihai konsantrasyonda lizozim, 50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) ve 10 mM EDTA (pH 8.0) içeren 1 hacim Çözelti I içerisinde süspanse edilmiş ve 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Hücre süspansiyonu üzerine, taze hazırlanmış 2 hacim 0,2 N NaOH (10 N NaOH stok çözeltisinden seyreltilerek) ve % 1,0 SDS (% 10 SDS stok çözeltisinden seyreltilerek) içeren Çözelti II ilave edilecek ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Hücre lizatı üzerine, 1,5 hacim buzda soğutulmuş 5,0 M KAc (60.0 ml), Glasiyal Asetik Asit (11,5 ml) ve Bidistile H<sub>2</sub>O (28,5 ml) içeren Çözelti III ilave edilmiş ve lizat buz içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu aşamada hücre artıkları, genomik DNA ve proteinlerin önemli bir kısmının çökmesi sağlanmıştır. Lizat, +4 °C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant hacmi ölçülerek temiz bir tüpe aktarılmıştır. pDNA'yı içeren süpernatant üzerine 0.6 hacim izopropanol ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekleme süresi sonunda pDNA, +4 °C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür.

Çökelti 1 hacim Tris-EDTA (TE, pH 8.0) tamponu ilavesi ile çözündürülmüş, 20 µg/ml nihai konsantrasyonda RNAase A ve ardışık olarak 50 µg/ml nihai konsantrasyonda Proteinase K ile muamele edilmiştir. Enzimatik olarak kısmen saflaştırılan pDNA'nın üzerine 4 hacim PEG 8000/NaCl (% 13 / 1.6 M) çözeltisi ilave edilmiş ve karışım 3-4 saat buz içerisinde bekletilmiştir. Sürenin sonunda pDNA, +4

°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. 1 hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürülecek olan pDNA, fenol: kloroform: izoamil alkol ekstraksiyonunu takiben amonyum asetat (NH<sub>4</sub>Ac) / Etanol uygulaması ile +4 °C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pellet, % 70 etanol ile yıkanmış ve uygun hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan plazmid DNA stokları, küçük hacimlere bölünmüş, spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılmış ve 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **5.2.4. Plazmid miRNA'nın Kontrolü**

Plazmid miRNA örneklerinin miktar tayini, saflık derecesi ve konformasyonel yapı kontrolleri spektrofotometrik ve elektroforetik olarak yapılmıştır.

##### **5.2.4.1. pDNA'nın Elektroforetik Kontrolü**

Agaroz jel elektroforez yöntemi; DNA'nın ayırımı, tayin edilmesi ve saflaştırılmasında kullanılan standart bir yöntemdir. Basit, tekrarlanabilir ve diğer yöntemlerle ayırımı yapılamayan hassaslıkta DNA fragmanlarına ayırımını gerçekleştirebilecek kapasitededir. Agaroz jeller amaca göre farklı porozitede hazırlanabilmekte ve farklı şartlar altında yürütülebilmektedir.

İzole edilen plazmid miRNA'nın saflığı, içerdiği formlar ve plazmid yapısının doğruluğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. Elektroforez işlemi için %0,8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu amaçla agaroz %2 (a/h) olacak şekilde, 1xTAE içerisinde (RNaz ve DNaz içermeyen su ile hazırlanan TAE) kaynatılarak çözündürülmüştür. Çözeltinin sıcaklığı 55-60°C'ye indiğinde 0.05 µg/ml final konsantrasyonda nükleik asid boyama solüsyonu (RedSafe™, Intron Biotech.) eklenmiş ve yatay jel kasetlerine dökülmüştür. Jelin soğumasına yakın uygun tarak jel tepsisine monte edilmiş ve polimerleşmenin tamamen gerçekleşmesi için soğumaya

bırakılmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra, tarak ve yan destekler dikkatlice çıkarılmış, elektroforez tank sistemi içerisine yerleştirilmiştir. Uygulanacak örnekler örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tarak ile oluşturulan kuyucuklara aktarılmış ve agaroz jel donduktan sonra 1x TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. miRNA örnekleri 5:1 oranında 6x yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulanmıştır. Elektroforez işlemi 200 V / 80 mA sabit elektrik akımı altında 30 dakikada tamamlanmıştır. miRNA bandı UV transillüminatör ile görünür hale getirilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

#### **5.2.4.2. pDNA'nın Spektrofotometrik Kontrolü**

Bu çalışmada miRNA'ların spektrofotometrede maksimum absorbans gösterdikleri 260 ve 280 nm dalga boylarında miRNA'ların absorbansları ölçülmüş ve miRNA miktarları ve saflıkları belirlenmiştir.

#### **5.2.5. Kitozan/miRNA Komplekslerin Hazırlanması ve Kontrolü**

Kitozan, 40 mM Tris-asetat/asetik asit çözeltisinde (pH 5,0) çözündürülerek son konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. miRNA ve kitozan çözeltileri basitçe karıştırılmış ve vorteksenerek kitozan/miRNA kompleksleri hazırlanmıştır. % 1'lik konsantrasyonda 70 kDa düşük molekül ağırlığına sahip kitozan (10mg/ml) ile miRNA (0,5µg/µl) belli oranlarda karıştırılarak ağırlıkça 0.5/1, 1/1, 2/1, 5/1 oranlarında kompleksler hazırlandı. Kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 1 saat beklenmiştir. Kompleks hazırlanması süresince, miRNA'ların hacmi sabit tutulmuş ve kitozan solüsyonunun hacmi teorik yük oranını (+/-) (aminin fosfat gruplarına molar oranı) ayarlamak için değiştirilmiştir. Her bir kompleks 3 seri halinde hazırlanmıştır.

### **5.2.5.1. Agaroz Jel Elektrofrez ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesi**

Hazırlanan kompleksler % 2'lik (a/h) konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelinde elektrofrez yöntemiyle incelenmiştir. Kompleks oluşumu için 1 saat beklendikten sonra %2'lik jele uygulandı. Elektrofrez işlemi 200V/80mA sabit akım altında 30 dakikada tamamlanmıştır. miRNA, nükleik asid boyama solüsyonu ile boyanarak UV ışığı altında gözlenmiştir. Oluşan jel resmi dijital kamera ile görüntülenmiş ve kompleks oluşumu incelenmiştir.

### **5.2.5.2. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesi**

Komplekslerin partikül büyüklükleri, cihaza (Malvern Instruments, UK) entegre partikül ölçer birimiyle, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde ölçülmüştür. Her biri on ayrı ölçüm değeri veren üç ayrı örnekte ölçüm yapılmıştır. Komplekslerinin yanı sıra serbest miRNA'nın da partikül büyüklüğü ölçümleri yapılmıştır.

### **5.2.5.3. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi**

Komplekslerin zeta-potansiyel değeri elektrofretik mobilitelerini ölçen zeta ölçer (Malvern Instruments, UK) cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar Malvern PCS versiyon 4.41 yazılımında hesaplanmıştır. Ölçüm cam küvetlerde, 25°C' de ve PBS pH 7.4 tamponunda yapılmıştır. Her biri on ayrı ölçüm değeri veren üç ayrı örnekte ölçüm yapılmıştır. Komplekslerin yanı sıra serbest miRNA'nın da zeta-potansiyel değeri ölçülmüştür.

#### **5.2.5.4. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Seruma Karşı Stabilitésinin İncelenmesi**

Çıplak miRNA, kitozan/miRNA kompleksi üzerine %10 fetal bovine serum eklenerek 37°C'de inkübe edilmiş ve daha sonra 150 mM NaCl çözeltisi eklenmiştir. Belli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve elektroforetik olarak değerlendirilmiştir.

#### **5.2.6. In Vitro Transfeksiyon Çalışmaları**

##### **5.2.6.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları**

İçerisinde mir-7 barındıran kitozan kompleks formülasyonlarının in vitro transfeksiyon çalışmalarında Hep 3B ve Hep G2 hepatosellüler karsinoma hücre kültürleri kullanılmıştır. Hücre kültürlerine ilişkin bilgiler 5.1. Gereç bölümünde 5.1.4. Hücre Hatları Yapısı başlığı altında detaylı bir şekilde verilmiştir.

In vitro transfeksiyon çalışmaları T-25 cm<sup>2</sup> hücre kültürü şişeleri ile 6 ve/veya 24 kuyucuklu plate kullanarak gerçekleştirilmiştir. Hücre pasajları ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında, Hep 3B ve Hep G2 hücre hatları için % 10 fetal bovin serum, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren 0,22'lik filtre kullanılarak steril edilmiş DMEM doku kültürü besiyeri kullanılmıştır. In vitro transfeksiyon çalışmalarının ilk aşamalarında, belirtilen doku kültürü besiyeri, serum ilavesiz olarak kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarında hücre sayımı ve canlılık tayini yapılmıştır. Pasajlama işlemi hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 1-2 günde bir yapılmıştır. Pasajlama için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre tabakası 5 ml steril PBS (pH 7.4) tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. 1ml tripsin:EDTA (%0.05:% 0.05) çözeltisi ilave edilmiş ve 37°C' de 2-3 dakika kadar bekletilerek hücre kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlanmıştır. Hücre tabakasının tamamen dağıldığı invert ışık mikroskobu ile

gözlenererek onaylanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri ilave edilmiş ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücre kümelerinin ayrılması sağlanmıştır. Kültürler % 5 karbondioksit ve % 98 nem içeren 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir.

### 5.2.6.2. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler tek tabaka halinde büyütülmüştür. Hücre ekim işlemi için yöntem 5.2.6.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları başlığında belirtildiği şekilde tripsinize edilen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklenmiş ve 1000 rpm'de 4 dakika santifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve çökelti halindeki hücreler 1 ml besiyeri içerisinde tekrar dağıtılmıştır. Steril bir ependorfa 100 µl hücre süspansiyonu, 400 µl besiyeri ve 500 µl % 0.4'lük tripan mavisi çözeltisi konmuştur. Hücreler Thoma lamının 16 büyük karelik alanının en üst ve en sağ çizgisi dışında kalan alan üzerindeki toplam ölü ve canlı hücre sayısı şeklinde ters fazlı mikroskoptan gözlenererek sayılmıştır. Bu işlem Thoma lamının diğer 16 büyük karelik bölmesi için de tekrarlanmıştır. Ortalama hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre sayısı için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\frac{\text{Hücre Sayısı}}{\text{ml}} = \frac{\text{Ortalama Hücre Sayısı}}{10^{-4}} * (\text{Dilüsyon Faktörü} = 10)$$

6 kuyucuklu hücre kültürü plağına her bir kuyucuğa  $2 \times 10^6$  tane hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler bir gece 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. miRNA ile transfeksiyon işleminden önce hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 ml serumsuz taze besiyeri ilave edilmiştir. Her bir hücre hattı için ayrı hazırlanan kompleksleri besiyerine pipetleyerek süspansiyon edilmiş ve kompleksin besiyerinde eşit dağılmasını sağlamak için yaklaşık 1 dakika orbital çalkalayıcıda karışması sağlanmıştır. Transfeksiyondan 4 saat sonra 1 ml

serumlu besiyeri ilave edilmiş ev transfeksiyonunun 48. saatinde transfeksiyon kontrolleri yapılmış ve tayinler yürütülmüştür.

### **5.2.6.3. Sitotoksosite ve Hücre Proliferasyonu Çalışmaları**

Kitozan/miRNA-7 kompleks formülasyonlarının Hep 3B ve Hep G2 hücre hatlarına sitotoksik etkisinin olup olmadığı ve komplekslerin hücre proliferasyonuna etkileri MTT (3,4,5,dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum) ve BrdU testi ile belirlenmiştir. MTT testi, indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir duyarlık testidir. Canlı hücrelerde bulunan mitokondrial dehidrojenaz enziminin tetrazolyum halkasına uçuk sarı renkli MTT'nin bağlanması ile oluşan koyu renkli formazan kristallerin teşhisine dayanmaktadır.

Hücreler 96 kuyucuklu plate  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Üzerine 100 µl besiyeri (antibiyotiksiz 1xDMEM) ilave edilip bir gece inkübasyona bırakılmıştır, daha sonra besiyeri kaldırıl ve hazırlanan kompleksler 50 µl serumsuz besiyerinde süspande edilerek ilave edilmiştir. 4 saat sonra 50 µl %10 serumlu besiyeri ilave edilmiş ve 48 saat 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda hücrelerin üzerine 10 µl WST-1 hücre proliferasyon ajanı ilave edilerek 37 °C'da 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 1 dakika boyunca yatay çalkalayıcıda çalkalanması sağlanmış ve örnekler 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Yöntem üreticinin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

### **5.2.6.4. mTOR'un ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile İncelenmesi**

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında mTOR tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapılmıştır (BTLaboratory, China). Protokol adımları aşağıda yer almaktadır.

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş olup test oda sıcaklığında yapılmıştır.

2. Standart çözeltiler bahsedildiği şekilde hazırlanmış ve kuyucuklara 50µl olacak şekilde eklenmiştir. Standart çözeltiler biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart çözelti içerek kuyucuklara antikor eklenmemiştir.

3. İki farklı hücre hattı dikkate alınarak numune kuyucuklarına 40µl eklenmiş ve daha sonra numune kuyucuklarına 10µl anti Raptor antikor eklemiştir. Bunun ardından da numune kuyucuklarına ve standart çözelti içeren kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Plakayı bir sızdırmazlık maddesi ile örtünmüştür. 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

4. Sızdırmazlık maddesi çıkarılmış olup tüm kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Her yıkama için en az 0,35 ml yıkama tamponu kuyucuklara eklenmiş ve 30 saniye ile 1 dakika arasında muamele edilmiştir.

5. Her kuyucuğa 50µl substrat A çözeltisi eklenmiştir ve daha sonra her kuyucuğa 50µl substrat B çözeltisi eklenmiştir. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir sızdırmazlık maddesi ile kapalı şekilde inkübe edilmiştir.

6. Her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlenmiştir.

7. Durdurma çözeltisini ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her oyuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlenmiştir.

miRNA transfeksiyonu ile mTOR sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerdeki mTOR'un kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlanmış ve standard sapmaları ( $\pm$ ) hesaplanmıştır.

### 5.2.6.5. İnvazyon Yöntemi

Kuyuların içerisine öncelikle 500 mL PBS koymuş ve hücreler kaldırmadan hızlıca çekilmiştir. Bunun üzerine 200 mL tripsin eklenerek yaklaşık 2-3 dakika hücrelerin yüzeyden kalkması için beklenmiştir. Tripsin kuyular içerisinde yer alırken üzerine 300 mL serumsuz besiyeri eklenmiştir. Tüm kuyunun içinde kenar ve orta bölgelerinden köpürtmeden pipetaj yapılmıştır. Akabinde 300 mL serumsuz besiyeri koyup karıştırılmıştır. Bu karışım chamber'ın iç kısmına dik bir şekilde orta bölgeden koyulmuştur. Serumlu besiyeri de chamber'ın dış kısmına yaklaşık 600 mikrolitre olarak şekilde eklenmiştir. Bu şekilde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İşleme devam edebilmek için öncelikle formaldehit çözeltisi seyreltilmiştir. Üç tane 250 mL'lik beher alarak iki tanesine yaklaşık 150 mL kadar PBS doldurulmuştur. Etüvde bulunan insert'lerden iç kısımda yer alan chamber alınmış ve içindeki karışım boş olan behere boşaltılmıştır. Chamber sonra PBS'te sırasıyla iki kere yıkanmıştır. Bunun ardından seyreltilen formaldehit ile fikse edilmiştir. Seyreltilmiş formaldehit 1 mikrolitre chamber içine, 1 mikrolitre chamber dışına olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. Bu işlem için yaklaşık 2 dakika kadar beklemiş ve iç kısımda yer alan chamber boşaltılmış ve 2 kere PBS ile yıkanmıştır. İç kısımda yer alan chamber'ı kuyuya yerleştirmeden önce kuyuda kalan formaldehit pipetle çekilmiştir. Bunun ardından 1 mL iç chamber, 1 mL dış chamber olmak üzere Giemsa ile boyama sürecine geçilmiştir. Bunun sonucunda göç etmeyen hücreler kaldırılarak, göç eden hücrelerin invert mikroskopta sayımı yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

### 5.2.6.6. Apoptoz Çalışması

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde plasma membranının iç kısmında lokalize olan PS molekülleri, apoptozun erken aşamasında fosfatidilserin plasma dışına transloke olur ve hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkar. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı, apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Bu yöntemde Annexin V proteini, floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek apoptotik hücreler için fosfatidilserini saptayan ve hücreleri görünür kılan bir prob olarak kullanılmış ve FITC-Annexin V

kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı “Flow Sitometri” yöntemi ile ölçülmüştür. Apoptoz deneyi için 6 kuyucuklu well-plate’e HepG2 hücre hattından ekim yapılmış ve 24 saat inkübe edildikten sonra hazırlanmış olan kitozan/miR-7 kompleks formülasyonları, 1500 µl serumsuz besiyeri ile karıştırılarak kontrol kuyuları hariç her bir kuyuya ilave edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresini takiben kontroller de dahil tüm kuyucuklara 150 µl serum ilavesi yapılmıştır. Plate ekimi yapılan hücreler 48 saat inkübe edilmelerini takiben, hücreler üzerinden besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Üzerlerine 500 µl Tripsin-EDTA ilave edilmiş ve tripsinin aktivasyonu için 2-3 dk bekletilmiştir. Takiben kuyulardaki tripsin ve hücreler ayrı ayrı eppendorflara alınarak üzerlerine 1 ml PBS eklenmiştir. PBS ile iki kez yıkama işleminin ardından hücre çöktülerinin üzerine 1 ml 1XAnnexin Binding Buffer ilave edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonlarının her birinden 100 µl alınarak, üzerlerine 5 µl Annexin V-FITC eklenmiş ve eppendorflar 15 dakika süreyle karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunu takiben, 400 µl daha 1XAnnexin Binding Buffer ilavesi yapılarak Flow Sitometri yöntemiyle 1 saat içerisinde analiz edilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. miRNA Çalışmalarına İlişkin Bulgular

#### 6.1.1. miRNA'ların Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

miRNA'lar yöntem 5.2.1. Plasmid miRNA ile Yapılan Çalışmalar başlığında belirtildiği gibi son konsantrasyonu 50 nmol olacak şekilde 1XshRNA tamponu içerisinde çözülmüştür.

#### 6.1.2. miRNA'ların Kontrolüne İlişkin Bulgular

##### 6.1.2.1. miRNA'ların Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular

miRNA'lar yapısal olarak yöntem 5.2.4.1. pDNA'nın Elektroforetik Kontrolü başlığında belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. miRNA stoktan 5 mL çekilmiş, üzerine 95 mL TE eklenmiştir. Bunun içerisinde sırası ile 2, 4 ve 6 mikrolitre kuyulara yüklenmiştir.



**Resim 6.1.** Farklı Miktardaki miRNA'ların Agaroz Jeldeki Görünümü

### 6.1.2.2. miRNA'ların Spektrofotometrik Kontrolüne İlişkin Bulgular

Yöntem 5.2.4.2. pDNA'nın Spektrofotometrik Kontrolü başlığında belirtildiği şekilde miRNA'lar maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Liyofilize miRNA'ların nanomolü molekül ağırlığı ile çarpılarak mikrogram miktarları hesaplanmış ve aynı oranda seyreltilmiştir. Bu hesaba göre toplam hacimden 1µg miRNA ile yapılan spektrofotometrik ölçüm değerleri (A260/280 ve DNA konsantrasyonu) Tablo 6.1.'de verilmiştir.

**Tablo 6.1.** Spektrofotometrik Ölçüm Değerleri

<b>Spektrofotometrik Ölçüm</b>	
<b>A1/A2</b>	1,9896
<b>DNA Konsantrasyonu (µg)</b>	1,1477

Teorik olarak hesaplanan miRNA konsantrasyonları spektrofotometre ile doğrulanmıştır.

## 6.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması / Kontrolüne İlişkin Bulgular

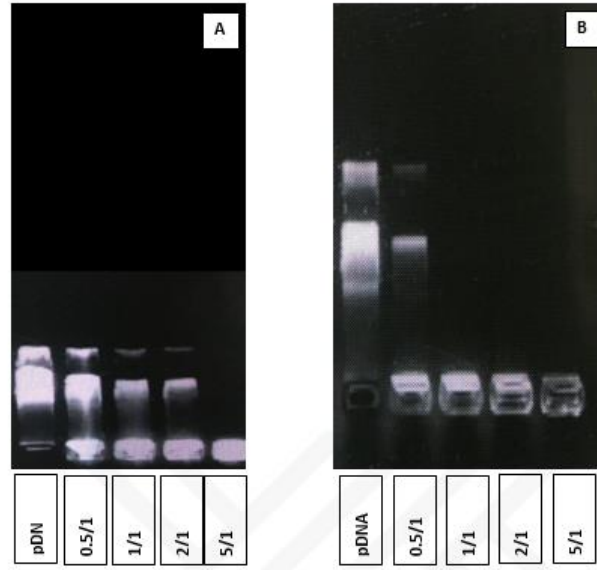
### 6.2.1. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması

Kitozan/miR-7 kompleksleri yöntem 5.2.5. Kitozan/miRNA Komplekslerin Hazırlanması ve Kontrolü başlığında belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

## 6.2.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular

### 6.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesine İlişkin Bulgular

miRNA içeren kitozan komplekslerine ilişkin elektroforetik inceleme bulguları Resim 6.2’de verilmiştir. Kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile incelenmesinin sonucunda sentetik miRNA ile kitozan arasında %0,25’lik çalışma formülasyonu içerisinde tam kompleks oluşumu 1/1 ve 2/1 oranlarında gözlenmiştir. 0,5/1 oranındaki komplekste ise kısmi kompleks oluşumu görülmüştür. %0,10’luk çalışma formülasyonu içerisinde ise tam kompleks oluşumu gösteren bir oran gözlenmemiştir.



**Resim 6.2.** Kitozan/miRNA Komplekslerinin Elektroforetik Görünümü

Resim 6.2.’de verilen (A) görselinde %0,10’luk Kitozan-pDNA çalışma formülasyonu oranlarının elektroforetik görünümü, (B) görselinde ise %0,25’lik Kitozan-pDNA çalışma formülasyonu oranlarının elektroforetik görünümü gösterilmiştir.

### 6.2.2.2. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular

Serbest miRNA-7 ve kitozan/miRNA komplekslerinin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları Tablo 6.2.'de verilmiştir.

**Tablo 6.2.** miRNA ile Hazırlanan Kompleks Formülasyonlarına, Serbest miRNA'lara ve Kitozana Ait Boyut ve Yüzey Yükü Ölçüm Sonuçları

Formülasyonlar	Oran	Zeta Potansiyeli mV( $\pm$ SD)	Partikül Boyutu d.nm ( $\pm$ SD)
Kitozan/miR-7	0,5/1	0,85 $\pm$ 0.5	170,5 $\pm$ 8
	1/1	5,75 $\pm$ 1.2	254,3 $\pm$ 12
	2/1	18,8 $\pm$ 0.6	305,6 $\pm$ 26
	5/1	27,2 $\pm$ 0.2	410,4 $\pm$ 50
Kitozan	-	27.8 $\pm$ 4.21	416 $\pm$ 15
Serbest miR-7	-	-10.6 $\pm$ 0.7	-

Yapılan ölçümlerde, kitozan/miR-7 formülasyonlarının partikül boyutları 170,5  $\pm$  8 nm ile 410,4  $\pm$  50 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

### 6.2.2.3. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular

Kitozan/miRNA kompleksleri ve serbest miRNA'ya ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları Tablo 6.2.'de verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda, serbest miR-7'lerin negatif yüzey yük yoğunluğuna sahip olduğu gözlenmiştir. 1/1 ve 2/1 (+/-) oranında hazırlanmış olan formülasyonların pozitif yük yoğunluğuna sahip oldukları ve zeta potansiyel değerleri kitozan/miR-7 kompleksleri için 0,85-27,2 mV arasında değiştiği saptanmıştır.

#### **6.2.2.4. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Serum Stabilitesine İlişkin Bulgular**

Komplekslerin serumun parçalayıcı etkisine karşı stabilitesini belirlemek üzere; yöntem 5.2.5.4. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Seruma Karşı Stabilitesinin İncelenmesi başlığında belirtildiği şekilde serbest miRNA ve kompleks formülasyonu ile serum stabilite çalışması yapılmıştır.

Stabilite çalışması öncesinde miRNA'ların ve hazırlanan komplekslerin agaroz jel elektroforezinde elektroforetik kontrolü yapılmıştır.

### **6.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular**

#### **6.3.1. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon Çalışmaları**

Transfeksiyon öncesinde hücre ekimi ve transfeksiyonu yöntem 5.2.6.2. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon başlığında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

#### **6.3.2. Transfeksiyon Kontrol Çalışmaları**

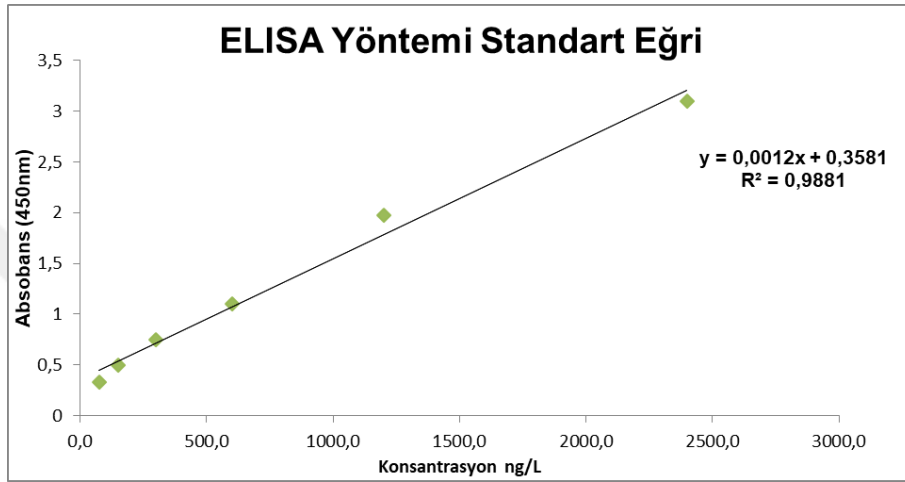
Kitozan/miRNA-7 kompleksleri Hep 3B ve Hep G2 hücre hatlarına verilerek komplekslerin içerisindeki lokalizasyonları floresan ve konfokal mikroskop ile incelenmiştir.

Söz konusu hücre hatlarında Rhodamin filtre ile floresan mikroskop altında alınan görüntülere göre tüm hücrelerde kitozan taşıyıcısı ile miRNA transfeksiyonunda transfeksiyon etkinliği gözle tespit edilmiş ancak yüksek verimde olmaması sebebi ile fotoğrafı çekilmemiştir.

## 6.4. Protein Ekspresyonunun ELISA Yöntemi ile Tayinine İlişkin Bulgular

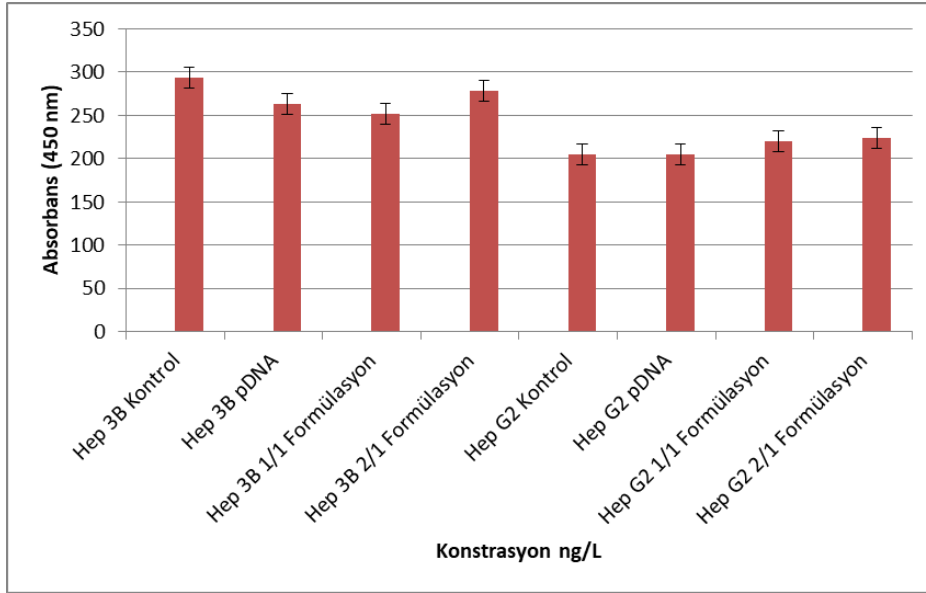
### 6.4.1. mTOR'un ELISA Yöntemi ile Tayinine İlişkin Bulgular

Hep 3B ve Hep G2 kanserli hücre hatlarında kitozan/miR-7 transfeksiyon sonrası hücrelerdeki mTOR miktarını ölçmek amacı ile yöntem 5.2.6.4.'te belirtildiği gibi ELISA tayini yapılmıştır.



**Resim 6.3.** Standart Çözeltilerin Konstrasyon Değerlerine Karşılık Gelen Absorbans Değerlerine İlişkin Standart Eğri

Yapılan ELISA tayini sonucunda; Hep3B hücre hattında kitozan/miR-7 1/1 ve 2/1 formülasyon oranına sahip kompleksinde transfeksiyon sonrası mTOR sırasıyla %14 ve %5 oranında azaldığı gözlenmiştir. HepG2 hücre hattında kitozan/miR-7 1/1 ve 2/1 formülasyon oranına sahip kompleksinde transfeksiyon sonrası ve tümör kontrol grubunda mTOR protein miktarı kıyaslandığında mTOR seviyesi transfeksiyon sonrasında sırası ile %7 ve %9 oranında arttığı gözlenmiştir.

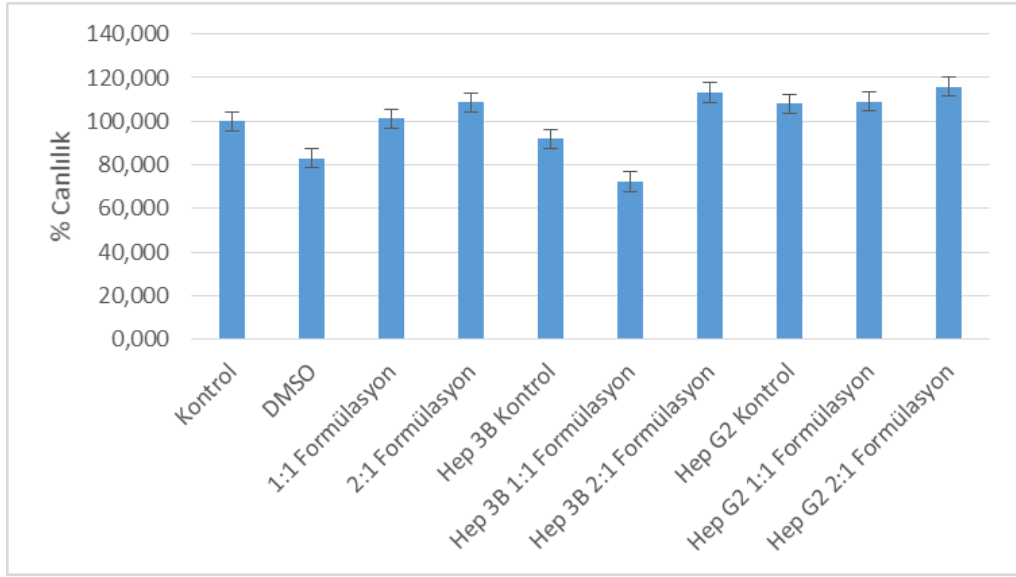


**Şekil 6.1.** Tümör Hücrelerinde Tedavi Öncesi ve Sonrası Arasında mTOR Ekspresyonunun Karşılaştırılması

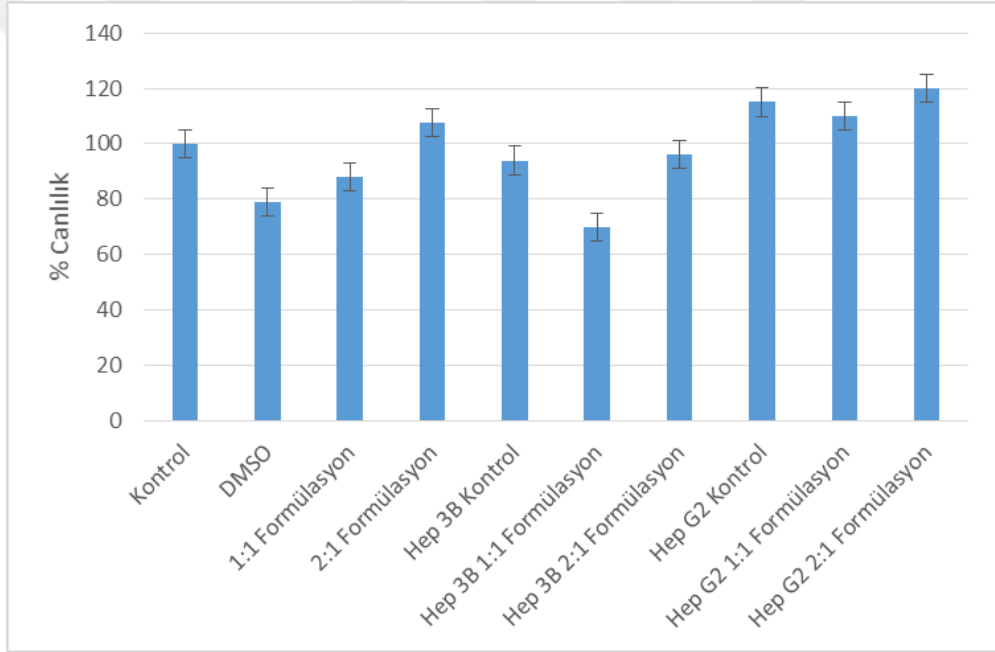
### 6.5. Sitotoksisite ve Hücre Proliferasyonu Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Sağlıklı hücre hattı (L-929) ve kanserli hücre hatlarında (Hep 3B ve Hep G2) yapılan hücre proliferasyon çalışması 5.2.6.3. Sitotoksisite ve Hücre Proliferasyonu Çalışmaları başlığında belirtildiği gibi yapılmıştır.

Şekil 6.2.'de MTT ve Şekil 6.3.'de BrdU çalışmalarının bulgularına göre, sağlıklı hücre hattı L929 fare fibroblast hücresinde kitozan/miR-7 1/1 oranındaki formülasyonu pozitif kontrole göre değişmediği ancak kitozan/miR-7 2/1 oranındaki formülasyonu pozitif kontrole göre proliferasyonu artırdığı tespit edilmiştir. Hep 3B hücre hattına uygulanan kitozan/miR-7 1/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre azalttığı, kitozan/miR-7 2/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre artırdığı gözlenmiştir. Hep G2 hücre hattına uygulanan kitozan/miR-7 1/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunun kontrole göre değişmediği, kitozan/miR-7 2/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre artırdığı gözlenmiştir.



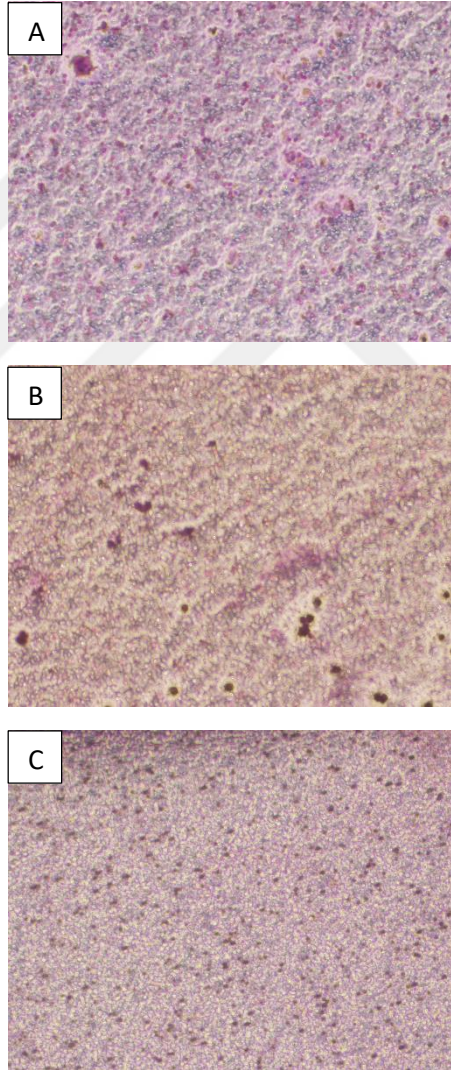
**Şekil 6.2.** Sağlıklı ve Kanser Hücre Hatlarında Yapılan Hücre Proliferasyon Çalışması (MTT)



**Şekil 6.3.** Sağlıklı ve Kanser Hücre Hatlarında Yapılan Hücre Proliferasyon Çalışması (BrdU)

## 6.6. İnvazyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

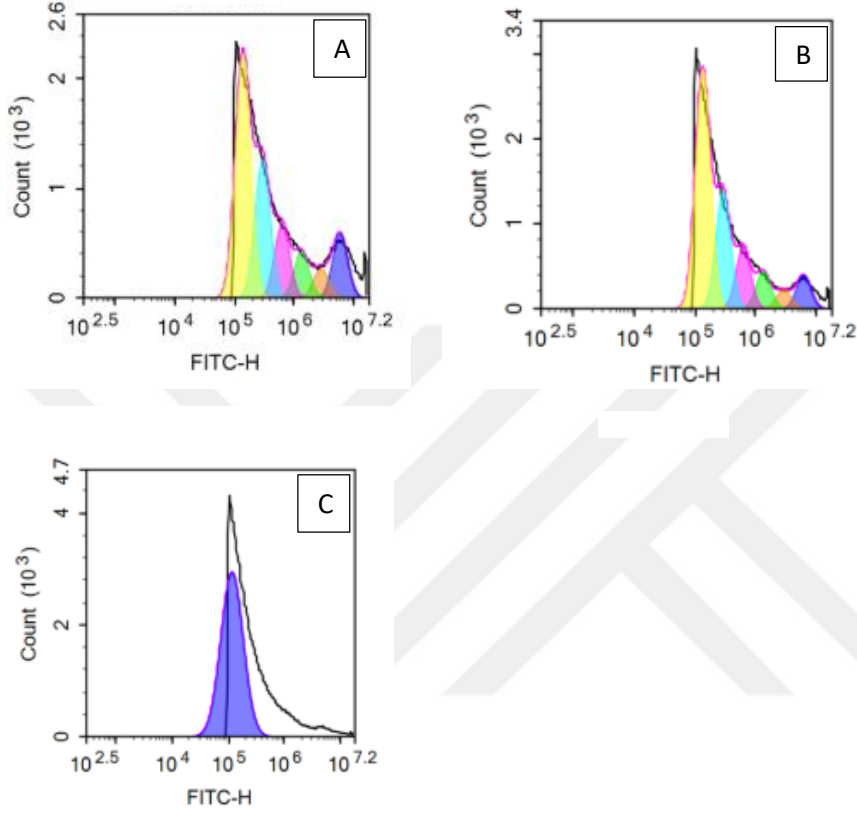
İnvazyon testi yöntem 5.2.6.5.'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Tümör kontrol grubu, kitozan/miR-7 kompleksleri için  $1 \times 10^5$  hücre / insert olacak şekilde DMEM besiyeri ile süspande edilmiş, 8 µm por filtreye sahip insertlere ekim yapılmıştır. Hücreler tutunduktan sonra besiyeri kaldırılmış ve 1 mL serum free besiyeri içerisinde kompleksler süspande edilerek inserte eklenmiştir. 24 saat sonra %4 Paraformaldehit (PFA) ile fiksasyon ve giemsa ile boyanmasının ardından hücre hatlarında invazyon bulgularına ait görüntüler Resim 6.4'te verilmiştir.



**Resim 6.4.** HepG2 Hücre Hattında Kitozan/miRNA Transfeksiyonu Sonrası İnvazyon  
A: Kontrol B: 1/1 Formülasyon C: 2/1 Formülasyon

## 6.7. Apoptoz Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Apoptoz çalışması yöntem 5.2.6.6.'te belirtildiği şekilde yapılmış ve sonuçlar Resim 6.5'te verilmiştir.



**Resim 6.5.** HepG2 Hücre Hattında Kitozan/miRNA Transfeksiyonu Sonrası Apoptoz  
A: Kontrol B: 1/1 Formülasyon C: 2/1 Formülasyon

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayımlanan raporda kanserin dünya genelinde ölüme neden olan birinci hastalık grubu olduğu belirtilmiştir. Kanser aşırı hızlı yayılım göstermesi özelliğinden dolayı tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Yayılım konusunda agresif bir kanser türü olduğu bilinen HCC, 2018 yılında dünya genelinde en sık tanı konan altıncı kanser olup kanser ile alakalı ölümlerde ise üçüncü sırada yer almaktadır. Etiyoloji ve insidansı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir.

Kanser tedavisinde standart olarak kabul edilen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere ek olarak aşılardan, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş ve gen terapilerinden giderek sık bir şekilde kullanılmaktadır. Bu farklı olan tedavi yöntemlerinin ortak bir amacı ise tümörün büyümesini kontrol altına alarak yok edilmesini sağlamaktır. Fakat bu süreç yan etkiyi de beraberinde getirmektedir. Bu sebeple son yıllarda kanser tedavisinde yeni bir seçenek olarak gen tedavisi yaklaşımları araştırılmaktadır.

Başarılı ve etkin bir gen tedavisi için genlerin hücre içerisine taşıyıcı sistemler ile aktarılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda önemli sonuçlar elde edilse de viral gen taşıyıcı sistemlerde gözlemlenen olumsuzluklar nedenleriyle; son yıllarda viral olmayan gen taşıyıcı sistemler üzerine yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Katyonik özellik gösteren lipidler ve polimerik taşıyıcı sistemler gen taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, doğal bir katyonik polimer olan kitozan kullanılarak plasmid bazlı kitozan/miRNA-7 kompleksleri hazırlanmış ve bu komplekslerin in vitro olarak hepatosellüler karsinoma hücre hatlarındaki (Hep G2 ve Hep 3B) etki mekanizması araştırılmıştır.

Gen aktarımı için kullanılacak taşıyıcı vektörün fizikokimyasal karakterizasyonu yapılarak, serum stabilitesi, hücre proliferasyonuna etkisi (sitotoksitesi), transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. mTOR geninin ekspresyonunu baskılayacak miRNA kodlayan plasmid DNA'nın hücreye transfeksiyonunu sağlayacak taşıyıcı sistem iki farklı yüzdeye (%0,25 ve %0,10) sahip

olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla miR-7'nin elektroforetik ve spektroforetik yöntemle kalite kontrolleri yapılarak, kitozanla kompleksleri hazırlanmıştır. Denenen farklı N/P oranlarında (0.5/1, 1/1, 2/1, 5/1) tam kompleks oluşumu Resim 6.2.'de görüldüğü gibi katyonik bir doğal polimer olan kitozan negatif yüklü pDNA ile elektrostatik etkileşim göstererek kompleks oluşturulmuştur. miRNA ile kitozan arasında %0,25'lik çalışma formülasyonu içerisinde tam kompleks oluşumu 1/1 ve 2/1 oranlarında gözlenmiştir. Daha sonra komplekslerin boyut, yüzey yükü ölçümleri ve serum stabilitesi çalışılmıştır. Tablo 6.2.'de görüldüğü gibi kitozan miR-7 komplekslerinin boyutları  $170,5 \pm 8$  nm ile  $410,4 \pm 50$  nm arasında; zeta potansiyel değerleri ise 0,85-27,2 mV arasında değişmektedir. Hücre membranı negatif yüke sahiptir ve hazırlanan polimerik taşıyıcının yüzey yükünün pozitif olması hücre membranı ile etkileşimini sağlayarak, aktarılan genetik materyalin hücre içine girmesini kolaylaştırmaktadır (Ulasov ve ark., 2011; Raftery ve ark., 2013).

Çalışmalar sırasında kullanılacak terapötik etkili pDNA için saflık tayini yapılmıştır. A260/280 oranı DNA'nın saflığını göstermekte ve saf DNA çözeltilerinin 260/280 oranı 1.8-2 arasında yer almaktadır. (Chiang ve ark., 2005). Çalışmada izole edilen pDNA'ların saflığı bu aralıkta bulunmuştur.

Transfeksiyon çalışmaları kapsamında; transfeksiyon işlemi sonrası hücreler floresan mikroskop altında değerlendirilerek, gen aktarımı veriminin düşük olmasına rağmen başarılı olduğu, yeşil floresan protein ekspresyonunun gözlemlendiği formülasyonlar formülasyonlar üzerinden deneylere devam edilmiştir.

Hücre proliferasyon hızının belirlenmesi tümörün parametrelerinin anlaşılmasında oldukça önemlidir (Gökhan Terzioğlu, 2013). Hücre proliferasyon testleri DNA sentezi, metabolik aktivite ve ATP içeriğinin ölçümlerine bakılarak yapılan testlerdir. DNA sentezinin belirlenmesine dayalı hücre proliferasyon testinde floresan özellikli BrdU kullanılmış olup böylece hücre proliferasyonu timidin analoglarının yeni sentezlenen DNA'ya katılımı üzerinden izlenebilmektedir. Metabolik aktivite temelli proliferasyon testi ise bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin

hücre tarafından kullanılmasına dayanmaktadır. Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların in vitro sitotoksitesilerinin değerlendirilmesi yapılan MTT ve BrdU testi sonucunda belirlenmiştir. Ön çalışma olarak pDNA ile hazırlanan komplekslerin hücre sitotoksitesi üzerine etkileri ölçülmüştür. MTT ve BrdU testi sonucunda; Hep G2 ve Hep 3B hücre hattına uygulanan kitozan/miR-7 1/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre azalttığı, kitozan/miR-7 2/1 oranındaki formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre artırdığı gözlenmiştir.

Daha sonra hazırlanan kompleksler içinde iki farklı N/P oranı olan 1/1 ve 2/1 oranı seçilerek in vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Belirlenen dozda kitozan/miRNA komplekslerinin uygulanmasından sonra miR-7'nin anjiyogenez mTOR etkisini saptamak için mTOR tayini ELISA yöntemi ile yapılmıştır. mTOR tayini bulgularına göre Şekil 6.1.'de görüldüğü gibi Hep 3B hücre hattında kitozan/miR-7 1/1 ve 2/1 formülasyon oranına sahip kompleksinde transfeksiyon sonrası mTOR sırasıyla %14 ve %5 oranında azaldığı gözlenmiştir. miR-7 miRNA'larının mTOR'u hedefleyerek ekspresyonunu regüle ettiğine ilişkin bu bilgi literatüre uygundur (Zhang ve ark., 2017)

## 8. KAYNAKÇA

Baykara O. Horizons in Cancer Research vol.57. Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment. 2015; s.105-156.

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. 2007; 447:799–816.

Chang YL, Zhou PJ, Wei L, Li W, Ji Z, Fang YX, Gao WQ. MicroRNA-7 inhibits the stemness of prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway. 2015;6:24017–24031.

Chiang CL, Sung CS, Wu TF, Chen CY, Hsu CY. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. 2005; 822, 1-2, 54-60.

Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. 2003;24:1255-64.

Davis CD, Emenaker NJ, Milner JA. Cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis: molecular targets for nutritional preemption of cancer. 2010;37:243-57.

Dogan, R. Gulhan Aktas, R. Epigenetic Mechanisms and Hepatocellular Carcinoma. Maltepe Tıp Dergisi 2016; 8, 3, 029-035.

Erson AE, Petty EM. MicroRNAs and in development and disease. Clin Genet 2008; 74:296-306.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. Nat Rev 2006;5:671-8.

Fang Y, Xue J-L, Shen Q, Chen J, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma, Hepatology 2012; 55:1852-62

Fang YX, Xue JL, Shen Q, Chen JZ, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55:1852-62.

Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C ve ark. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*. 2015;1(4):505-27.

Fu X, Wen H, Jing L, Yang Y, Wang W, Liang X, et al. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Sci*. 2017;108:620-31

Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a sup-presses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial po-larity and metastasis. *EMBO Reports* 2009;10:400-405

Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 2010;466:637-41.

Glover AR, Zhao JT, Gill AJ, Weiss J, Mugridge N, Kim E, Feeney AL, Ip JC, Reid G, Clarke S, et al: MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. 2015.

Gökhan Terzioğlu, A. Ü. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari. *Turkish Journal of Immunology*, 74-89.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.

Herath N.I, Leggett B.A, MacDonald G.A. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis, *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2006;15-21.

Hilscher M, Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy and mesenchymal cell fibrogenesis. 2012;1831:972-978.

Horsham JL, Kalinowski FC, Epis MR, Ganda C, Brown RA, Leedman PJ. Clinical potential of microRNA-7 in cancer. *J Clin Med*. 2015;4:1668-1687

Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*. 2014; 459:70-83.

J. Zhao, Y. Tao, Y. Zhou, N. Qin, C. Chen, D. Tian, L. Xu. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy, *Cancer Cell International*, 2015;15:103.

Kabir TD, Ganda C, Brown RM, Beveridge DJ, Richardson KL, Chaturvedi V, et al. A microRNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness of sorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67:216-31.

Kalinowski FC, Brown RA, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, Leedman PJ. microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:312–317.

Kalinowski FC, Brown RAM, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, Leedman PJ. microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2014;54:312–7.

Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*. 2006;115,2,216-225.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. MicroRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. 2008;68:3566-3572.

Kucukkkartallar Tevfik, Nadir Görülen Bir Olgu: Hepatoselüler Karsinomun Spontan Rüptürü 2007.

Kuscu L. Gen Tedavisi İçin Tasarlanan ve Patent Başvurusu Yapılan Farmasötiklerin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. A D Sezer).

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. 2001;294(5543):853–8.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. 2009;122:3589-92.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–854.

Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology*. 2010;4:230-41.

Li J, Tian H, Yang J, Gong Z. Long noncoding RNAs regulate cell growth, proliferation, and apoptosis. *DNA Cell Biol*. 2016;35:459-70.

Lindsey I. Who should treat rectal cancer and how? 2012;14(12):1439–1440.

Liu Z, Wang Y, Dou C, Sun L, Li Q, Wang L, et al. MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR-gamma-mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:49.

London WT, Petrick JL, McGlynn KA. Liver cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018:635-660.

Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834–8.

Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M. Metabolic regulation of apoptosis in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016; 327: 43-87.

Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*. 2017;22:1487-509.

Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*. 1999;20,2,175-182.

Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases. *Oncol Rep*. 2015;33(1):3-18.

Raftery R, O'Brien FJ, Cryan SA. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. *Molecules* 2013;18:5611-47.

Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-An overview. 2015;9,1,GE01-06.

Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*. 2016;15:196-212.

Saka, O. M. Anti-anjiogenik etki gösteren non-viral gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2009, Ankara (Danışman: Prof. Dr. A Bozkır).

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.

Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 1996;13,1,383-420.

Turati F, Edefonti V, Talamini R, Ferraroni M, Malvezzi M, Bravi F, Franceschi S, Montella M, Polesel J, Zucchetto A, La Vecchia C, Negri E, Decarli A. Family history of liver cancer and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012;55:1416-1425.

Ulasov AV, Khramtsov YV, Trusov GA, Rosenkranz AA, Sverdlov ED, Sobolev AS. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy. *The American Society of Gene & Cell Therapy.* 2011;19,1,103-112.

Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stuhmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369:20130094.

Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 2009;136:669–87.

W.R. Chen, Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: thenovel adjuvants for cancer vaccine, *Clin. Dev. Immunol.* 2013.

Wang Y, Wang Q, Song J. Inhibition of autophagy potentiates the proliferation inhibition activity of microRNA 7 in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017;14:3566-3572.

Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg* 2007;94: 23–30.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S., Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, 2009;11(3):228-34.

Zhang Y., Bo H., Wang H., Chang A., and Zheng X.F. Emerging Role of MicroRNAs in mTOR Signaling, 2017;74(14):2613-2625.

Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1058-64.

Zhang B., Pan X., Cobb G., Anderson T. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, 2007.

Zhang JJ, Wang CY, Hua L, Yao KH, Chen JT, Hu JH. miR-107 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Axin2. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:5168-74.

Zhang X, Hu S, Zhang X, Wang L, Zhang X, Yan B, et al. MicroRNA arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:1078-84.

Zhang X, Hu S, Zhang X, Wang L, Zhang X, Yan B, Zhao J, Yang A, Zhang R. MicroRNA-7 arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:1078–1084.

Zhu Z, Zhang X, Wang G, Zheng H. Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon* 2014.

Xu X., Tao Y., Shan L., Chen R., Jiang H., Qian Z., Cai F., Ma L., Yu Y. The Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. 2018; 9(19): 3557-3569.

## 9. EKLER



### 2<sup>nd</sup> International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019)

28-29 June 2019, Ankara, Turkey  
[www.EurasianBioChem.org](http://www.EurasianBioChem.org)

#### ➤ POSTER PRESENTATION

##### *In vitro* study of mTOR gene expression in plasma based microRNA-7 / chitosan complexes in hepatocellular carcinoma cell lines

Melek Evirgen\*, Ceyda Ekentok Atici, Suna Ozbas Turan

Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Marmara University, Tıbbiye Street, 34668 Istanbul, Turkey

\* Corresponding author e-mail: [melekevirgen@gmail.com](mailto:melekevirgen@gmail.com)

#### Abstract

MikroRNAs are small, endogenous and non-coding RNA molecules which regulate gene expression. Recent studies show that deregulation of miRNAs have been associated with different diseases including cancer. Therefore, miRNAs are important therapeutic target in cancer. However, major obstacles of usage miRNAs in therapy are stability, rapid clearance and internalization. For this reason, it is important in terms of therapy with appropriate carrier system to the cells. Aim of this study is to investigate efficacy (invasion, apoptosis and cell proliferation) and usability in hepatocellular carcinoma (HCC) cancer cell lines (Hep3B and HepG2) of polyplexes forms of chitosan and miR-7 mimic. miR-7 mimic and chitosan complex was prepared. In vitro characterisation of these complex was done. With these dosage have used to investigate mTOR protein levels by using ELISA assays and invasion, apoptosis and cell proliferation assays have done. Our studies show that chitosan/miR-7 complex was internalized stably to cancer cells, thus deregulated miRNA levels repaired. Invasiveness of cancer cells was reduced. Chitosan complexes were shown to be safe and efficient delivery system for miRNA.

**Keywords:** chitosan, chitosan/miR-7 complex, hepatocellular carcinoma, miR-7, miRNA delivery system.

## 10.ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Melek	<b>Soyadı</b>	Evirgen
<b>Doğum Yeri</b>	Manisa	<b>Doğum Tarihi</b>	07/04/1990
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>Tel</b>	+905423855307
<b>E-mail</b>	melekevirgen@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	-	-
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Üniversitesi	2019
<b>Lisans</b>	Ege Üniversitesi	2012
<b>Lise</b>	Dündar Çiloğlu Anadolu Lisesi	2008

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
Genel Müdür	Novicor Araştırma Geliştirme Danış.ve Yazılım Hizm. A.Ş.	2017-2019
Proje Ofisi Yöneticisi	Novicor Araştırma Geliştirme Danış.ve Yazılım Hizm. A.Ş.	2015-2017
Proje Yöneticisi	Novicor Araştırma Geliştirme Danış.ve Yazılım Hizm. A.Ş.	2013-2017

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

<b>Yabancı Dil Sınav Notu #</b>								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
-	-	5.0	-	-	-	-	-	-

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	-	-	-
<b>(Diğer) Puanı</b>	-	-	-

#### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
MS Office Programları	İyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.