

**MEME KANSER HÜCRELERİNDE, ABCE1 VE eRF3  
PROTEİNLERİNİN siRNA TAŞIYAN  
NANOPARÇACIKLARLA İNHİBE EDİLMESİ**

**INHIBITION OF ABCE1 AND eRF3 PROTEINS IN BREAST  
CANCER CELL LINES WITH siRNA LOADED  
NANOPARTICLES**

**BAĞDAT BURCU CENGİZ**

**Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Ana Bilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2013

**Bağdat Burcu Cengiz**'in hazırladığı '**Meme Kanser Hücrelerinde, ABCE1 ve eRF3 Proteinlerinin siRNA Taşıyan Nanoparçacıklarla İnhibe Edilmesi**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'NDA YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Zakir RZAYEV

Danışman

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye

Doç. Dr. Handan YAVUZ

Üye

Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Üye

Doç. Dr. Sibel PEHLİVAN

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma Sevin DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçlarımı bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

\_ / \_ / 2013

İmza

Bağdat Burcu Cengiz

## ÖZET

# MEME KANSER HÜCRELERİNDE, ABCE1 VE eRF3 PROTEİNLERİNİN siRNA TAŞIYAN NANOPARÇACIKLARLA İNİBE EDİLMESİ

**BAĞDAT BURCU CENGİZ**

**Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ**

**Mart 2013, 74 sayfa**

Nanoteknolojinin en önemli ürünlerinden olan nanopartiküler sistemler birçok hastalık için teşhis ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Kitosan nanopartiküller; biyobozunurluk, yüksek biyoyumumluluk, düşük toksisite ve pozitif yüklü olması gibi özellikleriyle kanser teşhis ve tedavisinde oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir. Kanser tedavisinin geleneksel yaklaşımları olan cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi tedavilerin yerini, tümöre özgü hedeflenmiş yeni nesil tedaviler almaktadır. Hedefe yönelik tedaviler sağlıklı hücrelere zarar vermediği ve yüksek seçiciliğe sahip oldukları için oldukça ilgi görmektedirler. Ayrıca, bu tedavilerde ilaç yüklenmiş nanopartiküllerle yüksek etkili tedaviler geliştirilebilmektedir. Kanser tedavisinde dikkat çeken diğer bir yenilik ise mRNA düzeyinde etki etmeyi amaçlayan siRNA tedavisidir.

Sunulan tez kapsamında meme kanseri tedavisi için kitosan nanopartiküller kullanılmış ve hazırlanan nanopartikülere siRNA yüklenerek ABCE1 ve eRF3 proteinlerinin inhibe edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, kitosan polimeri asetik asitte çözüldükten sonra uygun pH'a ayarlanmış ve TPP ile çapraz bağlanarak kitosan nanopartiküller elde edilmiştir. İyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan nanopartiküllerin önce zeta-sizer'da boyutları ve yükleri

ölçülmüş daha sonra AFM, SEM gibi morfolojik tekniklerle partiküllerin topografisi incelenip, bu değerlendirmeler sonucunda istenilen özellikte nanopartiküller elde edilmiştir. eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve kontrol siRNA kitosan nanopartiküllere yüklenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerine siRNA yüklü nanopartiküller eklenmiş ve nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. RTCA ile hücreler hücre yaşam indekslerine bakılmıştır. WST-1 testi yapılarak da hücre ölümlerine bakılmıştır. Ölen hücrelerin apoptotik-nekrotik yollardan hangisinin seçtiğinin belirlenmesi için hücreler boyanarak floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin ABCE1 ve eRF3 proteinlerini inhibe ederek meme kanseri hücrelerinde etkin bir şekilde proliferasyonu durdurduğunu göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** Kitosan nanopartiküller, kanser tedavisi, siRNA tedavisi, ABCE1, eRF3

## **ABSTRACT**

### **INHIBITION OF ABCE1 AND eRF3 PROTEINS IN BREAST CANCER CELL LINES WITH siRNA LOADED NANOPARTICLES**

**BAĞDAT BURCU CENGİZ**

**Master of Science, Department of Nanotechnology and  
Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ**

**March 2013, 74 pages**

Nanoparticulate systems are the most important output of nanotechnology and can be used for diagnosis and treatment of many diseases. Chitosan nanoparticles have a widespread use in cancer treatments due to its properties such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. Novel tumor targeted therapies take places of surgery, chemotherapy and radiotherapy type conventional treatments. Targeted therapies preferred because of their specificity and minimal effect on healthy cells. These studies include drug loaded nanoparticulate systems which can help to the development of more effective cancer treatments. siRNA treatments which has an effect on an effect on mRNA level, are another novel technique for cancer treatment.

The presented study proposed the application of siRNA loaded chitosan nanoparticles on cell lines to inhibit ABCE1 and eRF3 proteins for breast cancer treatment. In the first part of the study, chitosan polymers dissolved in acetic acid and crosslinked with TPP in a certaion pH to form nanoparticles. Particles prepared with ionic gelation method, characterized with zeta-sizer for size distribution and surface charge, then examined topologically with AFM and SEM to determine the desired nanoparticle forulations. Control, ABCE1 and eRF3 siRNA's

were loaded to chitosan nanoparticles. The affect of the siRNA loaded chitosan nanoparticles on breast cancer cell line (MCF-7) was observed in the second part of the study. A RTCA was used to determine the cell index of the nanoparticle applied cell lines. Moreover, WST-1 test was performed to determine the cell viability after the nanoparticle application. Fluorescent microscopy techniques were used determine whether the apoptotic or necrotic pathways were chosen by the cells after nanoparticle application. Results shows that, ABCE1 and eRF3 loaded chitosan particles dramatically reduces the proliferation of the breast cancer cells.

**Keywords:** Chitosan nanoparticles, cancer treatment, siRNA treatment, ABCE1, eRF3

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca sahip olduğu bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zamanını ve desteğini esirgemeyen, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı, danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve sevgili ailesine,

Tez çalışmalarımı yakından takip edip, tezimin şekillenmesinde büyük bir emeği olan ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Mustafa Türk'e,

Tezimin en başından sonuna kadar bilgisi ve tecrübesini benimle paylaşan, zorlu günlerimde bile yanımda olan, çalışma ortamı dışında da arkadaşlığını esirgemeyen sevgili Mehmet Doğan Aşık'a,

Çalışmalarıma büyük katkısı ve emeği olan Esra Arat ve Kırıkkale Üniversitesi ekibine,

Çalışmalarım süresince, desteği, yardımseverliği ve arkadaşlığı için Göknur Kara'ya,

Tez boyunca yakalarından düşmediğim, her seferinde yardım taleplerimi geri çevirmeyen, dostlukları ve tecrübelerini benden esirgemeyen Tamer Çırak, Tayfun Vural, Cem Bayram ve Doğa Kavaz'a,

Bana her konuda destek olan ve eğlenceli vakitler geçirdiğim Deniz İrem Bulut, Sema Tuncer ve Kübra Kıcır'a,

Birlikte olmaktan ve aynı ortamda çalışmaktan zevk duyduğum Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyeleri Ali Örs, Betül Bozdoğan Pala, Damla Türkay, Demet Çatçat, Ebru Erdal, Eda Yalçın, Esmâ Alp, Ekin Çelik, Fatma Demir, Gökçe Bozolkalfa, Murat Demirbilek, Öznur Akbal, Pezhman Hosseinyan ve Zeynep Karahaliloğlu'na,

Beni bugünlere getiren, her daim beni destekleyen, sonsuz sevgilerini esirgemeyen canım aileme,

Sonsuz Teşekkürler

Bağdat Burcu Cengiz



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Nedir? .....	3
2.1.1. Kanser Tedavisinde Geleneksel Yöntemler.....	4
2.1.1.1. Cerrahi.....	4
2.1.1.2. Radyoterapi .....	5
2.1.1.3. Kemoterapi .....	5
2.1.1.4. İmmünoterapi.....	6
2.1.1.5. Fotodinamik Terapi.....	7
2.1.1.6. Hipertermi.....	7
2.1.2. Meme Kanseri .....	9
2.1.2.1. Meme Kanseri Türleri ve Teşhisi .....	9
2.1.2.2. Meme Kanseri Tedavisi .....	11
2.1.3. Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar .....	12
2.1.3.1. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları.....	12
2.1.3.2. Kanser Tedavisinde Moleküler Hedefler .....	14
2.1.3.2.1. Protein Sentezi .....	14
2.1.3.2.1.1. Aminoasitlerin aktivasyonu .....	15

2.1.3.2.1.2. Sentezin Başlaması.....	15
2.1.3.2.1.3. Zincirin Uzaması.....	16
2.1.3.2.1.4. Sentezin Sonlanması.....	16
2.1.3.2.2. Kanser Tedavisinde Protein Sentezi.....	16
2.1.3.3. Diğer Hedeflemeler.....	17
2.1.3.4. siRNA Tedavisi.....	18
2.2. Kitosan Nanopartiküller .....	20
2.3. ABCE1 Proteini.....	22
2.4. eRF3 Proteini .....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1. Kimyasallar .....	24
3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	25
3.2.1. Kitosan Nanopartiküllerin Boyut ve Yük Analizi .....	25
3.2.2. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi..	26
3.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması .....	27
3.4. Kitosan Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileştirilmesi .....	28
3.5. Hazırlanan Tüm Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi .....	28
3.5.1. MCF-7 Hücrelerinin in vitro Kültürünün Hazırlanması.....	29
3.5.2. MCF-7 Hücreleri Üzerinde Toksisitenin Belirlenmesi.....	30
3.5.3. xCELLigence RTCA ile MCF-7 Hücreleri Üzerinde Proliferasyonun Belirlenmesi .....	32
3.5.4. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.....	33
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR .....	34
4.1. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	34
4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi.....	34
4.1.1.1. Çözelti pH'ının Nanopartikül Boyutuna Etkisi .....	34
4.1.1.2. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun	

	Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	36
4.1.2.	Nanopartikül Yük Analizi.....	37
4.1.2.1.	Çözelti pH'ının Nanopartikül Yüküne Etkisi .....	38
4.1.2.2.	Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Nanopartikül Yüküne Etkisi.....	39
4.1.3.	Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu.....	40
4.2.	Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi Sonuçları .....	42
4.3.	Hücre Canlılık Testi Sonuçları .....	43
4.4.	Apoptoz/Nekroz Sonuçları.....	51
5.	SONUÇLAR .....	61
	KAYNAKLAR.....	64
	ÖZGEÇMİŞ .....	74

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 2.1.	Kültür ortamındaki normal hücreler ve kanser hücreleri.....	4
Şekil 2.2.	Prostat kanserinde T-hücrelerinin immünoterapideki davranışı..	6
Şekil 2.3.	Hastaya fotodinamik terapinin uygulanışı .....	7
Şekil 2.4.	Isının artması veya ısıya maruz kalma süresinin artması ile hücre ölümünün ilişkilendirilmesi grafiği .....	8
Şekil 2.5.	Memenin makroskobik görüntüsü .....	9
Şekil 2.6.	EPR etkisiyle tümörlü dokularda nanopartikül birikmesinin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.7.	Protein sentezinde translasyonun 3 aşaması .....	15
Şekil 2.8.	siRNA çalışma mekanizması .....	19
Şekil 2.9.	Kitosanın kimyasal yapısı .....	21
Şekil 3.1.	Kitosan nanopartiküllerin hazırlanışının şematik gösterimi .....	25
Şekil 3.2.	Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun (AFM) şematik görünümü .....	27
Şekil 3.3.	WST-1 yapısında tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1.	Kitosan çözeltisinin pH'ının, nanopartikül boyutuna etkisi .....	35
Şekil 4.2.	Çapraz bağlayıcı derişiminin Kitosan nanopartikül boyutuna etkisi.....	37
Şekil 4.3.	Kitosan çözeltisinin pH'ının, nanopartikül yüküne etkisi.....	39
Şekil 4.4.	Çapraz bağlayıcı derişiminin kitosan nanopartikül yüküne etkisi.....	40
Şekil 4.5.	Nanopartiküllerden alınan AFM görüntüleri .....	41
Şekil 4.6.	Nanopartiküllerden alınan SEM görüntüleri .....	42
Şekil 4.7.	Nanopartiküllerle etkileştirilmiş Hela hücre hattının 20 kat büyütölmüş floresan mikroskobu görüntüsü.....	43
Şekil 4.8.	Kontrol grubu ve nanopartikül grubu RCTA karşılaştırmalı hücre indeksi grafiği.....	44
Şekil 4.9.	Kontrol grubu ve nanopartikül grubu WST-1 sonuçları .....	44
Şekil 4.10.	Kontrol grubu ve kontrol siRNA grubu RCTA karşılaştırmalı hücre indeksi sonuçları .....	45

Şekil 4.11. Kontrol grubu ve kontrol siRNA grubu WST-1 karşılaştırmalı sonuçları.....	46
Şekil 4.12. Kontrol, Kontrol siRNA, eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve ABCE1-eRF3 siRNA gruplarının karşılaştırmalı RCTA hücre indeksi sonuçları.....	47
Şekil 4.13. Hücre çoğalma eğrilerinin zamana göre grafiklerinden elde edilen eğimler .....	48
Şekil 4.14. ABCE1 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş ABCE1 siRNA'nın hücre çoğalması üzerine etkileri .....	49
Şekil 4.15. eRF3 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş eRF3 siRNA'nın hücre çoğalması üzerine etkileri.....	50
Şekil 4.16. Kontrol grubu, ABCE1-eRF3 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-eRF3 siRNA WST-1 karşılaştırmalı sonuçları.....	51
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerine eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	52
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerine ABCE1-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	53
Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerine eRF3-ABCE1 siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	54
Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri.....	55
Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri.....	56
Şekil 4.22. MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	57
Şekil 4.23. MCF-7 hücrelerine kitosan nanopartikül uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	58
Şekil 4.24. MCF-7 hücrelerine kontrol-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 3.1. MCF-7 hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması .....	29
Çizelge 3.2. 96 well-plate'e ekilen hücreler üzerine farklı oranlarda eklenen partikül ve siRNA'lar.....	31
Çizelge 4.1. Farklı pH'larda %0,25'lik Kitosan çözeltisine 0,30%'luk TPP eklenmesiyle elde edilen Boyut özellikleri.....	35
Çizelge 4.2. pH 4,5'de %0,25'lik kitosan çözeltisinin çeşitli derişimlerde TPP eklenmesiyle elde edilen Boyut özellikleri.....	36
Çizelge 4.3. Farklı pH'larda %0,25'lik kitosan çözeltisine 0,25'lik TPP eklenmesiyle elde edilen yük özellikleri .....	38
Çizelge 4.4. pH 4,5'de %0,25'lik kitosan çözeltisinin çeşitli derişimlerde TPP eklenmesiyle elde edilen Yük özellikleri.....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

ABC	ATP Bağlayıcı Kaset
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
CI	Elektrot empedansı hücre indeksi
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM-F12	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DsRNA	Çift sarmallı RNA
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EF2	Uzama faktörü 2
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELİSA	Enzim bağlantılı immün analiz
EPR	Artan geçirgenlik ve retansiyon
eRF1	Ökaryotik translasyon sonlandırma faktörü 1
eRF3	Ökaryotik translasyon sonlandırma faktörü 3
FCS	Fetal buzağı serum
FITC	Yeşil floresan
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
IC50	İnhibisyon Konsantrasyonu
MCF-7	İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	Memeli rapamisin hedefi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid

NaOH	Sodyum hidroksit
NH <sub>3</sub>	Amonyak
PI	Propidium İyodit
RISC	RNA-indüklü susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
RNAz	Ribonükleaz
RTCA	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	Küçük interferans RNA
ssRNA	Tek sarmallı RNA
TPP	Sodyum tripolifosfat
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WST	Suda çözünebilir tetrazolyum tuzu



# 1. GİRİŞ

Günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser, araştırmacıların üzerinde en çok çalıştığı hastalıklardan biridir. Kanser, hücrelerdeki DNA yapısının bozulması sonucu, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmasdır [1]. Kadınlarda en çok görülen kanser tipi olan ve meme hücrelerinde başlayan meme kanserinin görülme sıklığı günden güne artmaktadır [2]. Dünyada görülme sıklığı ise yüksek olan kanser türlerinden biridir [3]. Yapılan araştırmalar meme kanserinin genellikle memedeki somatik hücrelerdeki genetik değişimlerden kaynaklandığını göstermektedir [4].

Kanser teşhis ve tedavisinde pek çok klasik yöntem olmasına rağmen, araştırmacılar klasik yöntemlerin sahip olduğu yan etkiler sebebiyle yeni yöntemler üzerinde araştırmalar yapmakta, en etkili tedaviyi bulmak için çalışmaktadırlar. Araştırmalar sonucunda kanser tedavisinde başarılı çalışmalar elde edilmiş ve klasik yöntemler zamanla yerini yeni tedavilere bırakmaya başlamıştır. Geleneksel kemoterapötik ajanlar kanserli hücredeki proliferasyonu durdurabilmekte fakat kanserin ileriki evrelerinde özellikle metastaz durumunda kemoterapi ile tedavi oranı azalmaktadır [5]. Ayrıca bu kemoterapik ajanlar sadece kanserli bölgedeki DNA hasarının dışında sağlıklı hücrelere de hasar verebilmektedir [6]. Bütün bu sebeplerden dolayı son yıllarda kanser tedavisinde yeni nesil bir yöntem olarak spesifik tümör hedeflemeye yönelik yeni metodlar geliştirilmekte ve tercih sebebi olmaktadır. Hedefli tedavi sürecinde kullanılan ajanlar yalnızca hastalıklı bölgeye gönderilebilmektedir ve böylece sağlıklı hücrelerin zarar görmesi engellenebilmektedir [7]. Bu da hedefli tedavinin yüksek seçiciliğe sahip ve daha etkili olduğunun göstergesi olmaktadır [8]. Kanser tedavisinde yeni bir hedefli çalışma yöntemi olan siRNA tedavisi ise direkt olarak sorunlu geni veya sorunlu genden sorumlu mRNA'yı hedef almaktadır [9]. Bu yeni nesil tedavi yöntemi olan hedefli tedavide kullanılan ajanların hücre içine alınmalarını kolaylaştırmak ve daha da etkili olmasını sağlamak için küçük boyutlarıyla tercih sebebi olan nanopartiküller kullanılmaktadır [10]. Nanopartiküller kullanılarak yapılan bu tedavideki amaç, geleneksel tedavilerdeki olumsuzlukları en aza indirmek, etken maddenin hücresel yüzeylere etkin bir şekilde taşınımını sağlamak, ilaçtan kaynaklanabilecek toksisiteyi minimuma indirmek, vücudun herhangi bir bölgesine

zarar vermeden sadece tümörlü dokuya ulaştırmak ve ilacın çözünlüğünü artırmaktır [10].

Kanser tedavilerinde en çok kullanılan biyobozunur polimerler arasında kitosan en çok dikkat çeken ve en çok üzerinde çalışıldır. Hücre hedefleme çalışmaları ve birçok biyomedikal uygulamada kimyasal modifikasyona uygunluğu, toksisitesinin olmaması, biyoaktif özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir [11; 12; 13; 14].

Protein sentezinin uzama basamağı kanser tedavisi araştırmacıları için oldukça dikkat çekmektedir. ABCE1 ve eRF3 proteinleri protein sentezinin translasyon basamağında görev almaktadır. Bu yüzden protein sentezinin translasyon basamağında görev alan eRF3 ve ABCE1 proteinlerinin baskılanmasının kanser tedavisine yeni bir bakış açısı getireceği düşünölmektedir.

Sunulan çalışmanın hedefi, meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerin hazırlanması, karakterize edilmesi ve bu partiküllerin kanser hücrelerine gönderilerek oradaki istenen proteinleri hedefleyip kanserli hücrelerinin proliferasyonuna engel olmasıdır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kitosan nanopartiküller kullanılmış, yöntem olarak iyonik jelasyon yöntemi seçilmiş ve bu kitosanlar TPP ile çapraz bağlanmıştır. Bu partiküllerin zeta-sizer, AFM, SEM ile boyut-yük dağılımına bakıp, karakterizasyon ve topografik özellikleri incelendikten sonra boyut ve yüklerinin uygunluğu belirlenmiştir. En uygun partiküller seçildikten sonra eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve kontrol siRNA yüklenmiş partiküller hazırlanmıştır. Çalışmanın devamında MCF-7 hücre hattı ekimi yapılmış, hücreler çoğaltılmış ve nanopartiküller hücrelere eklenmiştir. Nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkilerine bakıldıktan sonra, RTCA cihazı ile hücre sayımı yapılmış ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonuna bakılmıştır. En son olarak hücreler ikili boyama yöntemi ile boyanmış ve hücre etkileşimleri apoptotik-nekrotik mekanizmaların değerlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir.

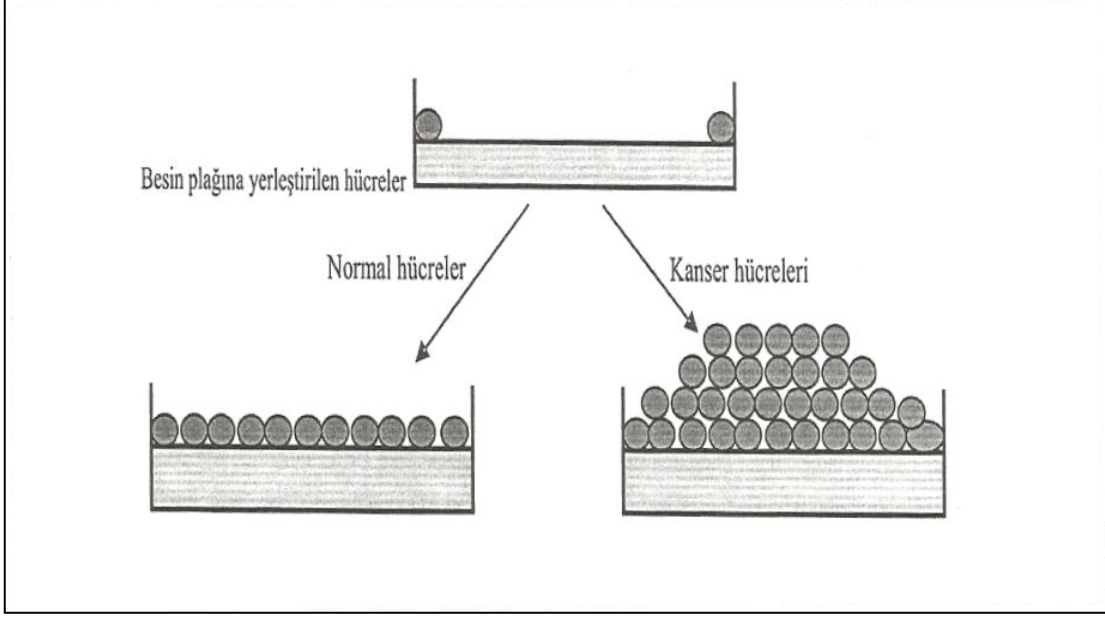
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser Nedir?

Kanser; ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde, en çok ölüme sebep olan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almakta ve sigara, fiziksel tembellik, beslenme şekli gibi faktörler kanser oranını günden güne artırmaktadır [2]. 2008 yılında elde edilen verilere göre dünyada 12.7 milyon kanser vakası görülmüş ve 7.6 milyon kanser vakasının ölüme sonuçlandığı belirtilmiş, bayanlarda en çok görülen kanserin meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseri olduğu kaydedilmiştir [2].

Kanser, hücre çoğalmasındaki dengenin bozulması ve hücre ölümüne yol açan genlerde meydana gelen pek çok değişiklik sonucu hücrelerin anormal bir şekilde büyümesidir [1]. Hücre farklılaşması veya çoğalması, hormon ve büyüme faktörlerinin miktarıyla ilişkilidir [16]. Canlıların tüm yaşam faaliyetleri için gerekli en basit yapı taşı olan hücreler, yaşam döngülerini kontrol altına alırlar ve eğer bu döngüde bir şeyler yanlış giderse yani bazı hücreler düzensiz büyürse ve vücuttaki diğer yapılara zarar verirse, kanser oluşmaya başlar [16]. Hücre döngüsünde sağlıklı hücreler, kansere sebep olan ajanlarla karşılaşabilirler [17]. Kansere sebep olan maddeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik kanserojen maddeler olabilir ve bu maddeler sağlıklı hücrelerin büyümesini ve onarımını engeller [17].

Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelere göre kendilerini daha fazla yönetebilme özelliğine sahiptir ve büyümeleri çevreden bağımsız olarak ilerler [18]. Bu hücrelerin farklılaşması gen mekanizmasıyla açıklanabilir ve düzenli gen transkripsiyonu önce dokularda farklılaşır [18]. Doku kültüründe sağlıklı hücreler bazı büyüme faktörleri varlığında gelişir ve yaşam süreleri sınırlı olmakla beraber yaklaşık 50 kez bölünebilirler ve bir süre sonra proliferasyon durur. Buna karşılık kültür ortamındaki kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine gereksinimleri azdır çünkü birikerek yığılma yaparlar ve apoptoz yokluğunda hücreler sonsuz bölünebilmektedir [19]. Ayrıca kanser hücreleri in vivo ortamda yaşamlarını sürdürebilmek için kan dolaşımını sağlama ve bağışıklık sisteminin kontrolünden kurtulma gibi yetenekler de gösterirler [19].



**Şekil 2.1.** Kültür ortamındaki normal hücreler ve kanser hücreleri [19]

Şekil 2.1.'e göre normal hücreler birbirine temas ettiklerinde üreme dururken, kanser hücrelerinde üreme devam etmektedir [19].

### 2.1.1. Kanser Tedavisinde Geleneksel Yöntemler

Kanser tedavisinde cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Büyüyen kanser hücreleriyle savaşan immün sistem için biyolojik tedavi de kanser tedavisinde bir yöntem olmuştur. Her tedavinin kendi içinde farklı prosedürleri, riskleri ve yan etkileri bulunmaktadır [20].

#### 2.1.1.1. Cerrahi

Cerrahi girişim, kanser tedavisinde en eski, en başarılı yöntemlerden biridir ve bölgesel bir tedavidir. Tümör, köken aldığı dokular ve lenf nodülleriyle sınırlı kalabildiği durumlarda tam iyileşme sağlanabilmektedir [21]. Cerrahi uygulama yapılacak hastanın önce kanser gelişimi incelenmeli, daha sonra tümörün metastaz yapıp yapmadığına, hangi evrede olduğuna ve son olarak ameliyat risklerinin neler olacağına bakılmalıdır [22]. Modern kanser cerrahisi tümörün doğrudan alınması ve mümkün olduğu durumlarda lenf nodüllerinin çıkarılmasından oluşmaktadır [21]. Kötüye giden kanserlerde ise ameliyat öncesi veya sonrası birincil tümör hücrelerini yok etmek için adjuvan terapi uygulanır ve böylece tümörde küçülmeler gözlenir [17]. Yapılan birçok cerrahi tedavide hastanın ameliyattan sonra yaşam kalitesinin arttığı da kanıtlanmıştır [23; 24].

### **2.1.1.2. Radyoterapi**

Radyoterapi, kanser hastalarının yaklaşık olarak %50'sinde tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır ve bu tedavi ile pek çok hastada başarıya ulaşılmıştır [25]. Radyoterapi, sadece uygulandığı bölgedeki hücreleri etkilemektedir [26]. Radyasyonun dozu normal hücrelerin etrafındaki hassasiyete göre belirlenir [27]. Amaç, tümör hücrelerin bölünmesini durdurup yenilenemez hale getirmek ve radyasyonun sağlıklı hücreler etrafındaki etkinliğini azaltıp tümör hücreleri etrafındaki etkinliğini artırmaktır [27]. Bu yöntem, birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılmakla birlikte cerrahi, kemoterapi veya immünoterapiyle birlikte yapılan tedavilerin bir parçası da olabilmektedir [25]. X-ray, gama ışınları ve elektron ışınları, kanser tedavisinde kullanılan radyasyon çeşitleridir [28]. Radyasyon, tümör hücrelerinde bulunan DNA'ya zarar vererek hücrelerin yapısını bozar, hücre bölünmesini engeller, kompleks biyokimyasal reaksiyonlara sebep olarak hücre ölümünü sağlar [29; 30]. Hücreye verilen zarar ise absorblanan radyasyon dozu ile doğru orantılıdır [31].

### **2.1.1.3. Kemoterapi**

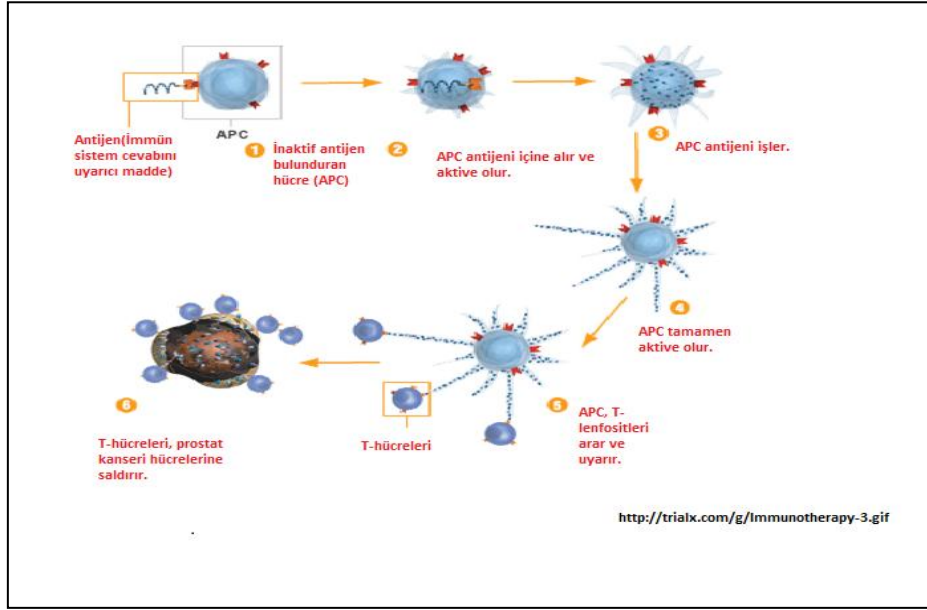
Kanser hücrelerinin büyüme eğilimleri sağlıklı hücrelerin tersine daha fazladır çünkü büyüme faktörlerine karşı hassasiyetlerini kaybetmişlerdir [32]. Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi veya kontrolsüz bölünmesi kemoterapiye karşı olan duyarlılıklarıyla önlenabilir [32]. Kimyasal ajanlar kullanılarak kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen veya yok olmasını sağlayan yöntem kemoterapi denmektedir [33]. Kemoterapiyle, kanser hücrelerin yayılması engellenebilir veya kanser tamamen tedavi edilebilir.

Kemoterapötik ajanlar, kan dolaşımına katılarak kanser hücrelerini parçalamayı hedefleyen ilaçlardır ve vücuttaki tüm kanser hücrelerini etkileyebilirler bu yüzden kemoterapi, radyasyon gibi lokal bir uygulama olmayıp sistemik bir tedavi sürecidir [34]. Bazı hastalarda kemoterapi tek başına bir tedavi yöntemi olmakla birlikte, bazı hastalarda da cerrahi girişim veya radyasyonla birlikte uygulandığında bir tedavi yöntemi olabilmektedir [17].

Kemoterapi için uygulanan bu ilaçlar kan dolaşımına katıldığında, kan veya lenf damarları yoluyla vücudun başka bölgelerine gidebilirler ve oluşturdukları toksisiteden dolayı kan hücreleri, saç hücreleri ve intestinal bölge etkilenebildiği için saç dökülmesi, mide bulantısı gibi yan etkiler görülebilir [34].

#### 2.1.1.4. İmmünoterapi

İmmün sistem vücuttaki yabancı maddeleri tanıyabilen ve denetleyebilen bir sistemdir. İmmünoterapi ise kanser tedavisinde kanser hücreleri için daha fazla öldürücü olarak tasarlanmış terapötik antikolar gerektirmektedir [35]. Kanser immünoterapisi, kötü huylu tümörler için immün sistemin özgünlüğünü ve üstün gücünü kullanan bir yöntem olmuştur. Kanser hücreleri patojenlerden daha az immünojenik olmalarına rağmen, immün sistem tümörlü hücreleri hiç aksamadan tanıyarak savaşıp yok edebilen bir sistemdir [36]. Tümör hücreleri bazı spesifik moleküllerle büyürler ve kemoterapi hücrelerdeki hücre bölünmesini engellerken antikolar da bu spesifik moleküllere engel olarak kanser hücrelerinin yayılmasını engellerler [17]. Makrofajlar, T-lenfositler ve doğal öldürücü hücreler, anti-tümör immün cevapta hücreler için öldürücü olan yani sitotoksik etkileyici hücreler olarak nitelendirilirler [37; 38].



**Şekil 2.2.** Prostat kanserinde T-hücrelerinin immünoterapideki davranışı

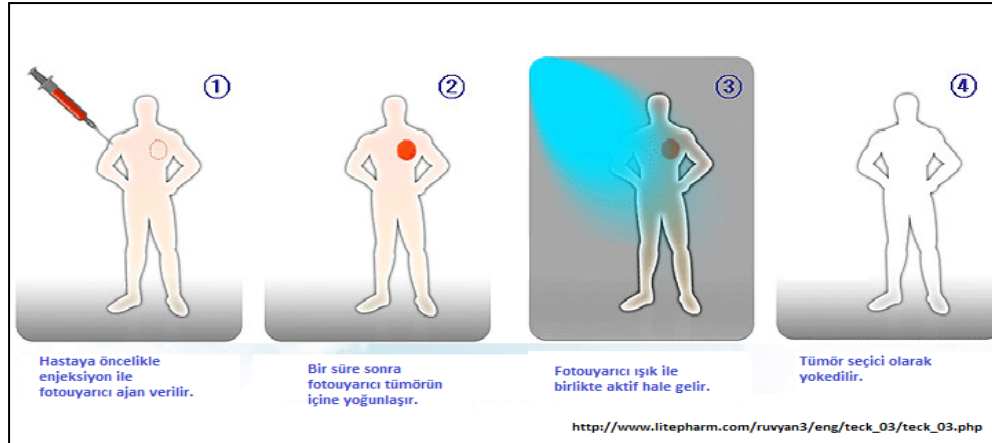
İmmünoterapinin başarısı bazı kanser hücrelerinde kendini gösteremeyebilir. İmmün sistem kanser hücrelerine karşı antikor üretmesine rağmen tümör hücreleri buna karşı önlem alıp, hücre zarlarında immün sistemin tanıyacağı antijenleri buldurmayıp normal hücre gibi davranabilmektedir [39; 40]. Bu yüzden de immünoterapi her kanser tipinde tedavi edici olamamaktadır [39; 40].

İmmünoterapi sitokin ve antikoları kapsayarak kanser tedavisinin bir parçası olmuştur [41]. Sitokin tedavisi immün sistemi aktive etmek ve etkinliğini artırmak

için tasarlanmıştır. İnterferon, sitokin proteinlerinin en iyi bilinenlerindedir. Araştırmacılar interferon alfa ile birkaç çeşit kanseri kontrol altına alarak başarı elde etmişlerdir [42].

### 2.1.1.5. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi, hedeflenmiş dokuyu uygun dalga boyu ile uyararak, ilaç ve ışığın kombinasyonu ile doku hasarını gerçekleştirir [43]. İlaç, tedavide genelde sistemik olarak kullanılırken, lazer kaynağından gelen ışık absorblanarak bölgesel tedavi de gerçekleştirilebilmektedir [43; 44]. Fotodinamik terapide hedef hücreye önce foto-uyarıcı ajan verilir ve sitotoksik maddelerin üretimi ışığın absorblanması ile başlar [45]. Fotodinamik terapi ilaçları belli dalga boyundaki ışığa duyarlıdır ve bu ilaçlar hastaya damar yoluyla verildikten sonra ilaç tümörlü dokuda birikir ve ışık ile uyarıldığında tümörlü dokuyu yok eder [46; 47]. Hiperisin, tümörlerin fotodinamik terapisinde kullanılan doğal bir fotosensitizördür ve en yaygın kullanılan doğal ilaçtır [48]. Non-invaziv ve bölgesel hedefli olması yönüyle cerrahi tedavi ve radyoterapiden üstündür [43].

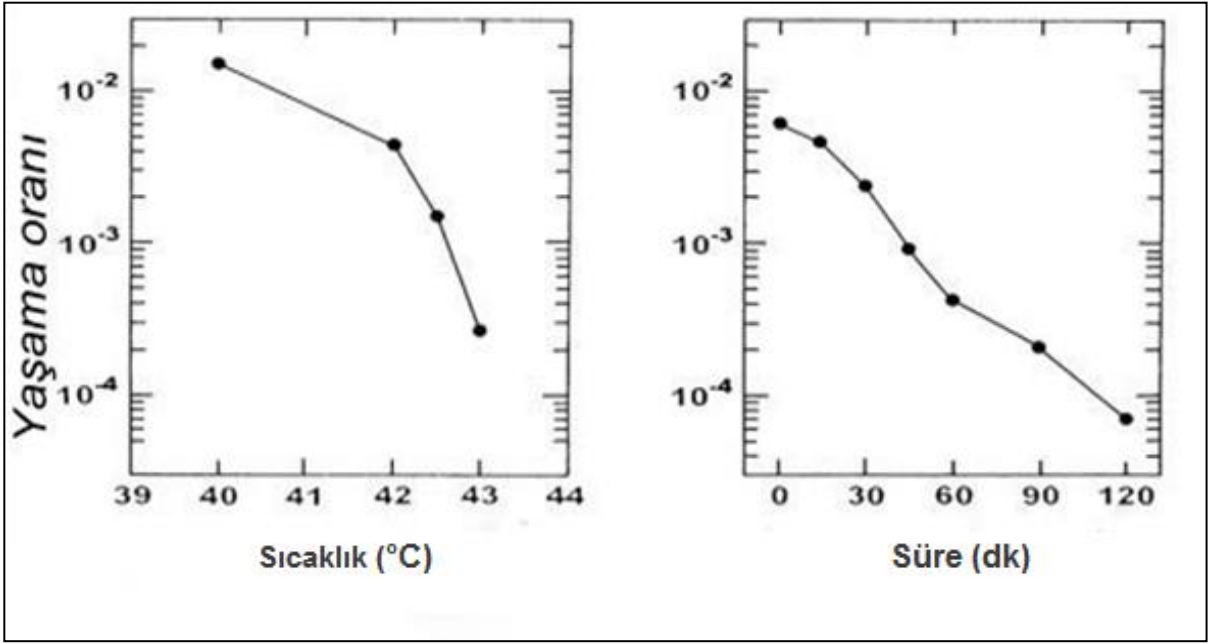


Şekil 2.3. Hastaya fotodinamik terapinin uygulanışı

### 2.1.1.6. Hipertermi

Kanser tedavisinde ısının kullanımı yıllardır süre gelmektedir ve bir hastanın ısı ile meme kanseri tedavisi ilk olarak 5000 yıl öncesine dayanan “Edwin Smith Papirus’u” adı verilen en eski cerrahi dökümanda yer almaktadır [12]. 1800’lü yıllara bakıldığında ise yüksek ateşten sonra tümörün büyümesinin kontrol altına alındığı gözlenmiştir [49].

Hipertermi, radyoterapi ve kemoterapi gibi kanser tedavilerini birleştirerek uygulanan ve tümörlü hücrenin sıcaklığını 40-43°C'ye çıkararak uygulanan bir yöntemdir ve bu yöntem tümörün kan akışını artırırken oksijen konsantrasyonunu da artırmaktadır [50]. Radyoterapi ve ısının birleştirilerek kullanıldığı bu yöntemde, ısı ilk olarak hücreleri etkilerken, radyasyon ile birlikte uygulandığında DNA'ya hasar verdiği görülmüştür [51; 52]. Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak 41-42°C'den sonra hücrelerin zarar gördüğü gözlemlenmiştir [53].



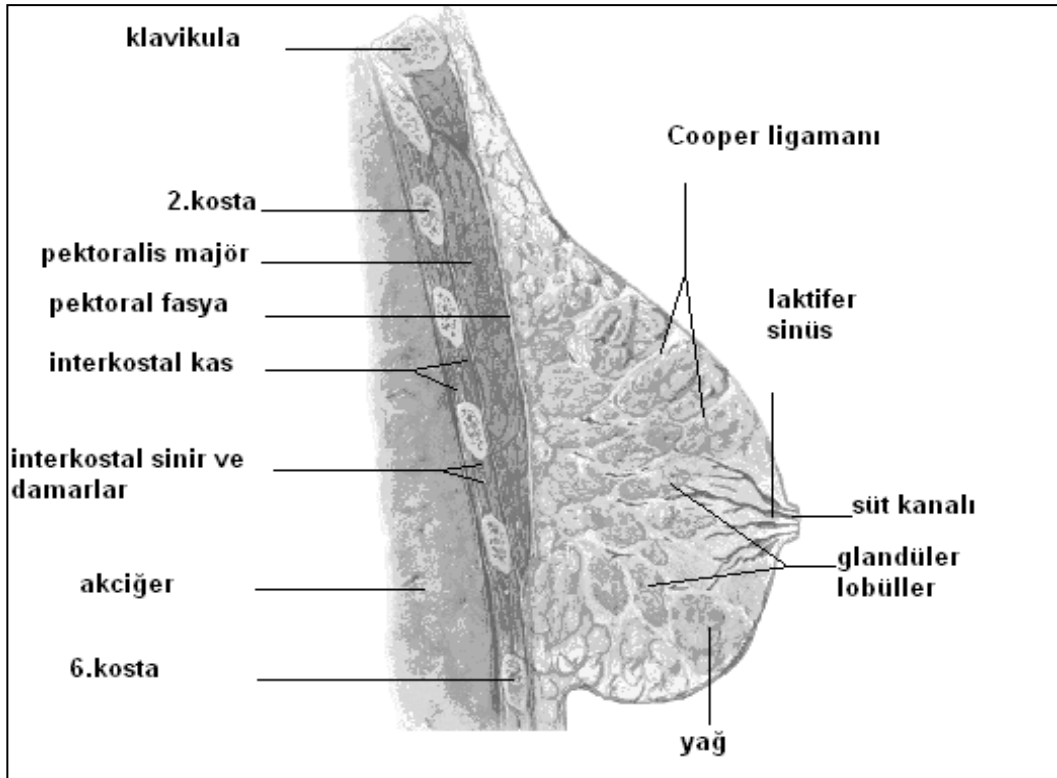
**şekil 2.4.** Isının artması veya ısıya maruz kalma süresinin artması ile hücre ölümünün ilişilendirilmesi grafiği [12]

Hipertermi; bölgesel, lokal veya tüm vücuda uygulanış olarak farklı metodlar içermektedir. Lokal hipertermi, küçük bir bölgeye yani sadece tümörlü alana uygulanır ve bu yöntemde mikrodalga, radyo dalgaları gibi enerjiler kullanılır, bölgesel hipertermi tümörün olduğu organa doğrudan uygulanır, tüm vücuda uygulanan hipertermi ise genelde metastaz yapmış olan tümör tedavisinde uygulanmaktadır [50].



### 2.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokularındaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle oluşur ve dünyada akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser tipidir [54; 55]. Erken yaşta ergenlik, geç yaşta menopoza girme, menopoz sonrası dönemde kadınlarda obezite gibi faktörler östrojen hormonunu artırmakta ve böylece meme kanseri riskini de artırmaktadır, çocuk doğurmak ise bu riski azaltmaktadır [55]. Doğum kontrol hapları, menopoz sonrası kullanılan hormon bantları, alkol, sigara, genetik faktörler ve genlerdeki değişim de kanser riskini artıran sebepler arasında yer almaktadır [56].



**Şekil 2.5.** Memenin makroskobik görüntüsü [57]

#### 2.1.2.1. Meme Kanseri Türleri ve Teşhisi

Meme kanseri türleri hücresel özelliklerine, tedavilerine, yaşam süresini etkileyişlerine ve yayılmalarına göre farklılaşırlar. Meme kanseri duktusların ya da lobülüslerin epitelinden kaynaklanışlarına göre duktal ve lobüler olarak ikiye ayrılır [58]. Meme kanserinin bir kısmı 'lobül' adı verilen süt bezlerinden, bir kısmı da lobüllerle meme ucunu bağlayan meme kanallarından köken almaktadır ve eğer kanser meme kanalların duvarındaysa 'ductal karsinoma' , lobüllerdeyse 'lobüler karsinoma' adını almaktadır [59].

Meme kanserini belirlemedeki tek ve en önemli faktör ise invaziv olup olmadığıdır [59]. İnvaziv olmayan kanser [in situ], kanal ve lobüllerin etrafındadır ve yayılım göstermez. Bu da kendi içinde 'ductal karsinoma in situ' ve 'lobüler karsinoma in situ' olarak ikiye ayrılır [59].

İn situ duktal karsinom heterojen bir lezyon grubunu ifade etmektedir [60]. Bunlar duktus sistemi içinde kalmış, invazyon göstermeyen malign epitelyal hücre proliferasyonunu ifade eder [61]. Bu karsinom türünde meme süt kanallarında anormal hücreler bulunur ve bunlar büyük, sayılabilir ve yağ bezesi şeklindedir [59; 60; 61; 62]. Tedavisi genellikle cerrahi girişim veya cerrahi girişimden sonra destekleyici radyoterapi ile birlikte uygulanmalıdır ve eğer tümör uzaklaştırılmazsa zamanla invaziv bir kanser şekline dönüşebilir [63].

İn situ lobüler karsinom, süt bezleri etrafındaki anormal hücreler olup biyopsi veya mamografi ile teşhis edilebilmekte ve genellikle kadınlarda menopoz öncesi dönemde görülmektedir [58; 59]. Mikroskobik olarak lobulusları doldurup genişleten, üniform, yuvarlak, genellikle küçük ve kohesiv olmayan hücrelerin solid proliferasyonu görülür ve genel olarak nekroz yoktur. Duktal karsinom hücrelerine göre küçük, üniform ve non-kohezivdir [64].

İnvaziv meme kanseri ise en yaygın kanser türü olmakla beraber heterojen tümör grubuna sahiptir ve olduğu bölgenin dışına sıçrayabilir yani meme dışındaki bölgelere de yayılabilir [65]. İnvaziv meme kanseri de kendi içinde invaziv duktal ve invaziv lobüler olarak ayrılır [65]. Meme kanserlerinin dörtte üçü invazif duktal karsinoma aittir [58]. Memenin duktus epitelinden gelişen tümör olmakla birlikte, hissedilebilir, sert kıvamlı ve çevreye yayılmayacak görünümde kitleler oluşturmaktadırlar [66]. Sınırlar düzensiz ve değişken boyutludur, koheziv özellikleri azalmıştır ve tanı koydurucu bir özelliği de malignite bulguları taşıyan, ancak tek tek duran hücrelerdir [67]. İnvaziv meme kanserinin %10'unu süt bezlerinde görülen invaziv lobüle karsinoma oluşturmaktadır ve bu karsinom tipinde kitle pek hissedilmez daha çok meme dokusunda incelmeler hissedilir ve memeden parça alınarak teşhis edilir [65]. Hücreleri, invaziv duktal karsinomanın hücrelerine göre daha küçük boyutludur ve daha düzensizdir [68]. Genelde gözle görülür kitle oluşturmadığı için mikroskobik tanı konulamaz [64].

Bunlar dışında enflamatuar meme karsinomu ve paget karsinomu da diğer meme kanseri türleridir. Enflamatuar meme kanseri, süt kanallarında ortaya çıkar ve memede ödem, hiperemi, hassasiyet görülür, biyopsi yapılarak teşhis edilebilir [64]. Paget karsinomu ise, meme karsinomlu hastaların %1-2 sinde görülür ve tümörün meme ucuna göçü olarak adlandırılabilir [64; 69]. Meme başı epidermisinin invazyonu önce meme başında kaşıntı ve yanma hissiyle başlar, epitel kalınlaşır ve meme başında erozyon ortaya çıkar [58]. Paget hastalığı çoğunlukla duktal karsinomun ilk evrelerinin sinyalini vermektedir [70].

### **2.1.2.2. Meme Kanseri Tedavisi**

Meme kanserinin tedavisi hastalığın evresine göre planlanmalıdır. Tümörün yeri ve sınırları belli olduğu zaman, meme kanserindeki ilk tedavi, hormon tedavisi, kemoterapi, immün terapi ve radyoterapiyi içeren destekleyici tedaviyle birlikte cerrahi girişimdir [54].

Erken meme kanseri tedavisinin en önemlilerinden biri cerrahidir. Lokal tedavi ancak hastalığın memenin dışına taşmadığı durumlarda uygulanabilir ve eğer hastalık yayılmışsa ameliyata yardımcı sistemik kemoterapi uygulanır [58]. Her meme kanseri tipinde farklı cerrahi girişimler uygulanmaktadır.

-Lobüler in situ karsinomlarda memenin tümünün çıkarılması yani total mastektomi,

-İntraduktal karsinomlarda total mastektomi veya radyoterapi destekli eksizyonel biyopsi yani şüpheli lezyonun çıkarılması,

-İnvazif tümörlerde memenin tümü, meme cildinin ve lenf bezlerinin tümünün alındığı modifiye radikal mastektomi veya radyoterapiyle destekli cerrahi,

-Paget hastalığında total mastektomi veya modifiye radikal mastektomi,

-Gizli meme kanserlerinde ise modifiye radikal mastektomi uygulanması önerilen cerrahi tedavilerdir [71].

Meme kanserinin erken tedavisinde sıklıkla cerrahiye ek olarak radyoterapi kullanılmaktadır. Radyoterapi, meme kanserlerinde lokal ileri hastalıkta tümörü küçültmek için neo-adjuvan kemoterapi ile beraber pre-operatif, meme koruyucu olarak ameliyattan sonra lokal nüksleri önlemek amacıyla post-operatif, özel durumlarda metastatik hastalıkta hafifletici yani palyatif amaçlarla kullanılır [72].

Tümör ne kadar küçükse, radyoterapi ile ortadan kaldırılması da o kadar kolay olur çünkü, büyük tümörler için gereken yüksek doz radyasyon, çevredeki normal dokulara da zarar verebilmektedir [58].

Kemoterapi, daha sonraki cerrahi girişimi kolaylaştırmak, lokal kontrolü arttırmak, uzun vadeli sonuçları düzeltmek amacıyla sistemik tedavinin lokal tedaviden önce yapılmasıdır ve lokal ileri meme kanserinde verdiği yüksek yanıt oranı, enflamatuvar meme kanserinde tek tedavi biçimi olması, bu tedavinin vazgeçilmez bir tedavi olduğunu göstermiştir [73].

Tümör immünoterapisi tedavide yeni bir alandır. Pasif immünoterapide hastaya anti-tümör etkisi olan lenfoid hücre ürünleri enjekte edilirken, aktif immünoterapide ise, hastaya tümör antijenleri enjekte edilerek kendi immün sisteminin bu antijenleri uyarması sonucu tümör hücrelerini yok etmesi sağlanır [58].

Meme kanseri hormona duyarlı bir tümör olduğu için ve birçok meme kanseri proliferasyonlarının devamı östrojenlere bağımlı bulunduğu için bu hücreler hormonal manipulasyonlara yanıt verir [74]. Meme kanserinin hormonal tedavisindeki hedef, tümör hücresinin östrojenlerin etkisinden yoksun bırakılmasıdır [75]. Metastatik meme kanserinde hormon tedavisi, etkisi yüksek ve yan etkisi az olduğu için hastanın semptomlarını hafifletip, tümör yükünü azaltarak yaşam süresini uzatmak için palyatif amaçlı kullanılır [74].

### **2.1.3. Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar**

Günümüzde geleneksel tedaviler haricinde birçok yeni tedavi yaklaşımı ortaya konmuştur. Giderek farklılaşan bu çalışmalar gelecekte geleneksel yöntemlerle beraber ve tek başlarına uygulanarak kanser tedavilerinde daha etkin rol oynayacaklardır. Bu şekilde henüz kullanılmakta olan tedavilere göre daha yüksek sağkalım oranıyla kanser tedavisi yapılması beklenmektedir.

#### **2.1.3.1. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Yaklaşımları**

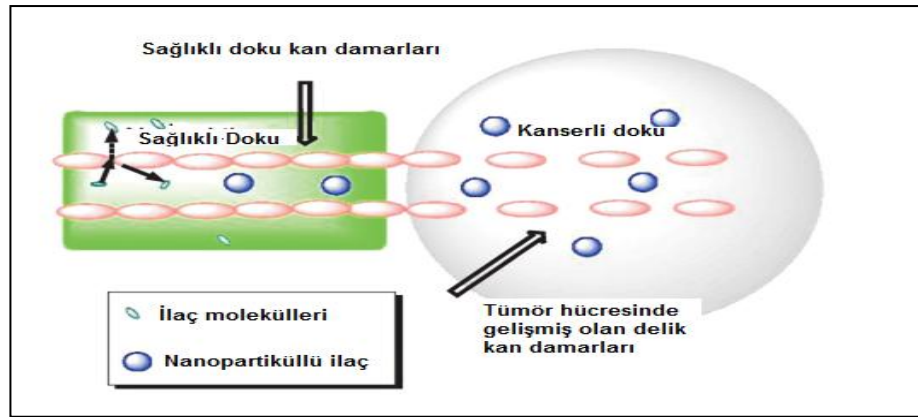
Nanoteknoloji alanındaki çalışmalarda 21. yüzyıl başlarında başarılar elde edilmeye başlanmış ve araştırmacılar nanoteknoloji sayesinde çok küçük boyutlarda moleküler malzemeler, daha güçlü elektronik araçlar ve yenilikçi malzemeler üretmişlerdir [76]. Nano boyuttaki materyaller metrenin milyarda biri kadar yani hücreden daha küçük boyuttadırlar ve bu küçük boyutlarından dolayı gerek hücrenin yüzeyindeki gerekse hücre içindeki biyomoleküllerle kolayca

etkileşebilmektedirler [77]. Nanoteknolojinin bir parçası olan nanopartiküller kullanılarak ilacın dolaşım süresi, ilaç etkinliği ve ilacın etkisi artırılabilir [78].

Nanoteknoloji kanser için iki genel yaklaşımda bulunmuştur; bunlardan ilki tümör hedeflemek amaçlı ilaç ve görüntüleme ajanı yüklenmiş nanopartikül gibi nanovektörlerin geliştirilmesi diğeri de kansere dair biyolojik sinyallerin bulunabilmesi amacıyla geliştirilmiş yüksek işlem hacmine sahip nanosensörlerdir ve uygulamalar sayesinde kanserde erken teşhis ve daha iyi tedavi hedeflenmektedir [79].

2006 yılında Nie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kanser teşhisi için kuantum parçacıkların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Silika çubukların içine hem kuantum parçacıklar hem de demir oksit kristalleri yerleştirilerek çift fonksiyonlu parçacıklar oluşturulmuştur. Demir oksitler sayesinde spesifik hücreleri hedeflemekte, kuantum parçacıklar sayesinde de yüksek görüntü kalitesine sahip olmakta böylece en iyi görüntü kalitesi elde edilebilmektedir [80].

Tümörlerin hedeflenmesinde EPR (artan geçirgenlik ve retansiyon) etkisinin etkili bir şekilde kullanımını sağlayan polimerik misellere antitümör antikolar bağlanarak immünomiseller oluşturulmakta ve bunların çeşitli kanser hücrelerine bağlandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [81].



**Şekil 2.6.** EPR etkisiyle tümörlü dokularda nanopartikül birikmesinin şematik gösterimi [82].

Şekil 2.6. da endotel hücreler tarafından çevrelenmiş olan sağlıklı hücreler sıkı bir şekilde dizilmiştir. Bu yüzden ilaçlı nanopartiküllerin kaçışı sağlıklı hücrelerde engellenirken tümörlü hücrelerin boşluklu yapıda olmasından dolayı ilaçlı

nanopartiküller endotel hücrelerin arasından sızmaktadır ve böylece tümörlü dokuya ilaçlı nanopartiküller dağılmaktadır [82].

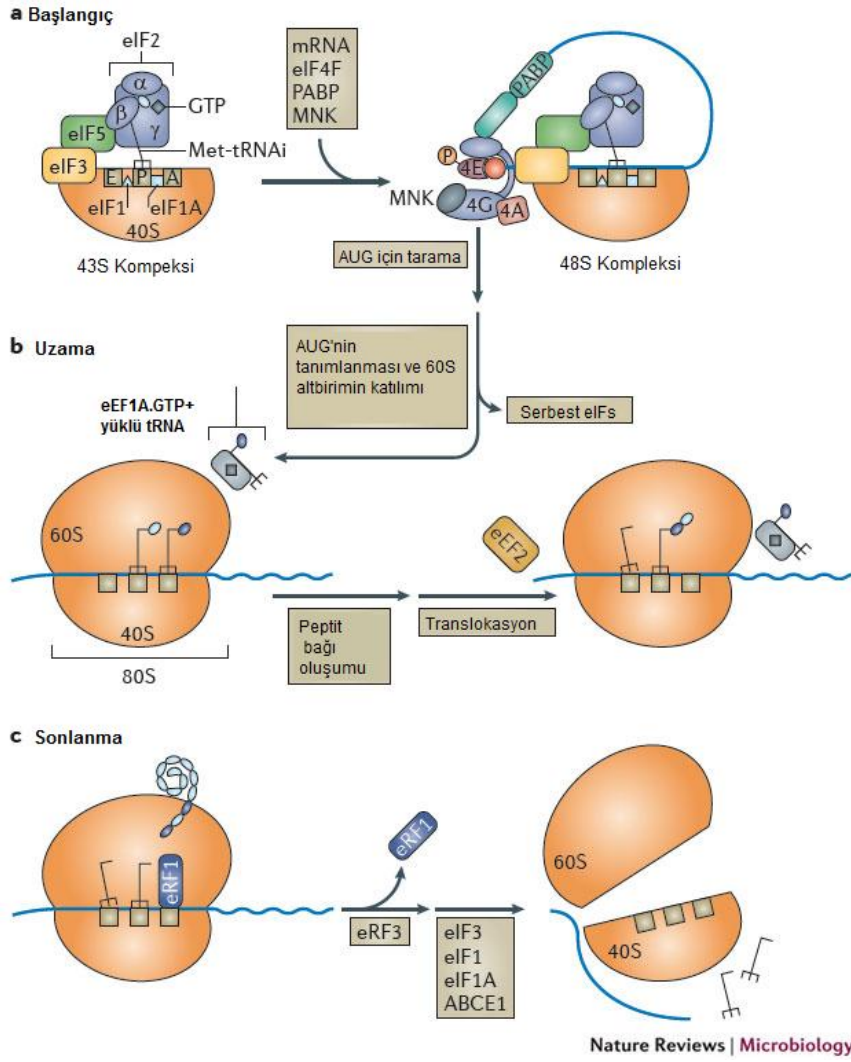
### **2.2.3.2. Kanser Tedavisinde Moleküler Hedefler**

Kanser tedavisinde bir yöntem olan kemoterapide kullanılan ilaçlar DNA'nın yapısını bozarak etkinlik gösterir ve sadece kanser hücrelerini seçmez diğer bölünen hücrelerin de ölümüne sebep olabilir [6]. Moleküler hedefli kanser ajanları ise geleneksel kemoterapötik ajanlardan oldukça farklıdır. Bu yeni tip ajanlar sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerindeki moleküllere hedeflenmiş ve kanser hücrelerinin direnç göstermeyeceği şekilde tasarlanmışlardır [32].

Kanser tedavisinde çeşitli hedef moleküller çalışılmaktadır. Hücre döngüsünü, hücre ölümünü, protein sentezini, hücre büyümesini ve hücrel sağkalımı kontrol eden genler, proteinler ve yolaklar kansere özgü yaklaşımda tercih edilmektedir [83].

#### **2.1.3.2.1. Protein Sentezi**

Organizmaların DNA'nın nükleotid dizisinde saklanan ve nesilden nesile aktarılan genetik bilgiyi kullanabilmesi için, hücre çekirdeğinde, bu bilgiyi içeren kısmın RNA'ya aktarımı (transkripsiyon) ile mRNA'nın oluşması gereklidir [19]. Sitoplazmada mRNA'nın aktardığı bilginin okunması sonucu protein sentezi gerçekleşir [19]. Protein sentezinin başlayabilmesi için önce DNA replikasyonu gerekir yani polimerazlar tek ipliği kalıp olarak kullanabildikleri için iki ipliğin küçük bir bölgede ayrılması gerekir [84]. DNA replikasyonundan sonra protein sentezi 4 basamakta gerçekleşmektedir. Bu basamaklar; amino asitlerin aktivasyonu, sentezin başlaması, zincirin uzaması ve sentezin sonlanmasıdır [85].



**Şekil 2.7.** Protein sentezinde translasyonun 3 aşaması [86]

### 2.1.3.2.1.1. Aminoasitlerin Aktivasyonu

Hücre sitoplazmasında bulunan 20 amino asitin her biri kendilerine özgü tRNA'larla esterleşmektedir ve her biri bir amino asitin tRNA'lara bağlanması, spesifik ve magnezyum bağımlı olan aminoasit-tRNA sentetaz adı verilen enzimler sayesinde esterleşmektedir [84; 87]. Amino asitin senteze katılabilmesi için önce aktifleşmesi gerekir ve bu aktifleşme de sitozolde doğru amino asitin doğru tRNA'ya bağlanması için enerji harcanan süreçtir [19].

### 2.1.3.2.1.2. Sentezin Başlaması

Protein sentezinde hız kısıtlayıcı olay olarak adlandırılan sentezin başlama aşamasında tüm bileşenler bir araya gelmelidir ve bu bileşenler;

-İki ribozomal alt birim,

- Sentezlenecek proteinin mRNA'sı,
- mRNA'daki ilk kodona uygun aminoaçil-tRNA
- GTP (enerji kaynağı),
- Başlangıç faktörleridir (üç tane IF) [84; 88].

Sentez, polipeptit zincirinin amin ucundan başlar ve mRNA üzerindeki ilk kodon her daim metiyonindir [19]. mRNA molekülü IF proteinlerinin yardımıyla önce ribozomun küçük alt birimlerine bağlanır ve daha sonra mRNA 5'-ucundan 3'-ucuna doğru okumaya başlar [88]. Başlangıç kodonuna met-tRNAi molekülü bağlanarak ribozomun büyük ve küçük alt birimleri proteinleri P(peptid) ve A(amino) bölgelerini meydana getirir, bunlar birleşerek protein sentezi başlar ve gerekli enerji de GTP den sağlanır [88].

#### **2.1.3.2.1.3. Zincirin Uzaması**

Sentezin başlamasıyla birlikte uzayan polipeptid zincirinin karboksil ucuna aminoasit eklenmesidir ve uzama süresince ribozom, okunan mRNA'nın 5' ucundan 3' ucuna doğru ilerlemeye devam eder ve aminoasitini veren tRNA serbestleşip, peptidil tRNA bölgesine kayar ve A bölgesi yeni bir amino açil-tRNA için hazır hale gelir [84].

#### **2.1.3.2.1.4. Sentezin Sonlanması**

mRNA'daki üç sonlanma kodonundan birisi (UAA, UGA, UAG) A bölgesine gelince GTP kullanılarak peptid zincir sentezi durur, release faktörler ile terminasyon kodonu reaksiyona girince peptid-tRNA birbirinden kopar ve böylece sentezlenen protein ribozomdan sitozole salınır ve aynı anda ribozom mRNA'dan ayrılır [88]. Ökaryotlardaki tek faktör eRF'dir [84].

#### **2.1.3.2.2. Kanser Tedavisinde Protein Sentezi**

Hücre proliferasyonun düzenlenmesinde ve hücre homeostasinin onarımında protein sentezinin önemi oldukça büyüktür [89]. Hücre döngüsü ve protein sentezinin kanser hücrelerinde anahtar görevi vardır ve protein sentezi uzama basamağı kanser araştırmalarında oldukça ilgi çekmektedir [90]. Kanser gelişimindeki düzensizlikte protein sentezinde hem anti-apoptotik hem de pro-mitotik etkiler rol oynamaktadır [91; 92]. Anti-apoptotik proteinlerin yarı ömürleri kısa oldukları için protein sentezinin durması ve hücre ölümü oldukça hızlı gerçekleşir [93].



Apoptoz normal dokulardaki hücrelerin kaybı yani protein sentezi seviyesinde bir bölümde programlanmış hücre ölümü anlamına gelmektedir [89; 94]. Apoptoz malignant tümörlerde gerçekleşirken onların büyümesini geciktirerek, kanser hücrelerinin radyasyon, kemoterapi, hormon ablasyonu gibi tedavilerine cevabını hızlandırmaktadır [89].

Proteozom, tüm ökaryotlar, arkeobakteriler ve bazı bakterilerde bulunan proteolitik aktiviteye sahip bir komplekstir ve proteozom inhibitörleri kanser hücre kültürlerinde apoptozu uyararak anti-tümör aktivite göstermektedirler [95]. Proteozom, hücre döngüsü, endositoz, transkripsiyon, apoptozis ve protein sentezi gibi birçok hücreysel olayda görev alan proteinlerin yıkımını sağlayarak bu hücreysel mekanizmalara katkıda bulunmaktadır [96; 97; 98]. Proteozom inhibitörleri spesifik olarak bölünebilen tümör hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır [95]. Yapılan bir çalışmada sağlıklı ve kanserli hastaların plazmaları karşılaştırılmış ve kanserli hastalarda proteozom miktarının daha fazla arttığı görülmüş, bunun sonucunda da proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptoza neden oldukları ve diğer anti-kanser ilaçlara göre daha etkili olduğu gösterilmiştir [95; 99].

Protein sentezinin uzama basamağı kanser araştırmacıları için oldukça ilgi çekmektedir ve protein sentezinde kodonların A'dan P'ye yer değiştirmesinden sorumlu EF2 yeni tedavilere ve geleneksel tedavilere katkıda bulunması açısından iyi bir hedeftir [89]. Yeni bir ilaç olan Ontak, EF2'yi hedeflemek üzere dizayn edilmiş ve hematolojik tümör tedavilerinde protein sentezinin inhibisyonuyla hücre ölümünü sağlayarak tümör tedavisinde başarıyla kullanılmıştır [90].

### **2.1.3.3. Diğer Hedeflemeler**

Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapiler seçici olmadıkları için sağlıklı hücrelere de zarar verebilmekte, hedeflenmiş terapötikler ise kemoterapinin aksine seçici oldukları için yalnızca kanser hücrelerini öldürmekte ve sağlıklı hücrelere zarar vermemektedir [100]. Kanser hedefli terapilerde antikor veya küçük moleküller kullanılmakta ve bunlar tümör için daha spesifik ve daha az toksik olması sebebiyle tercih edilmektedir [101]. Günümüzde her ne kadar kanserin mortalite hızı veya sağkalım süresi düzelmediyse de, farklı tümör varlıklarının özellikleri ve yolları belirlenmiştir [101]. Hedefli tedaviler tümör gelişimi ve büyümesini gerektiren spesifik moleküllerle interfere olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu engeller [102]. Hedefli kanser tedavisinin gelişiminde

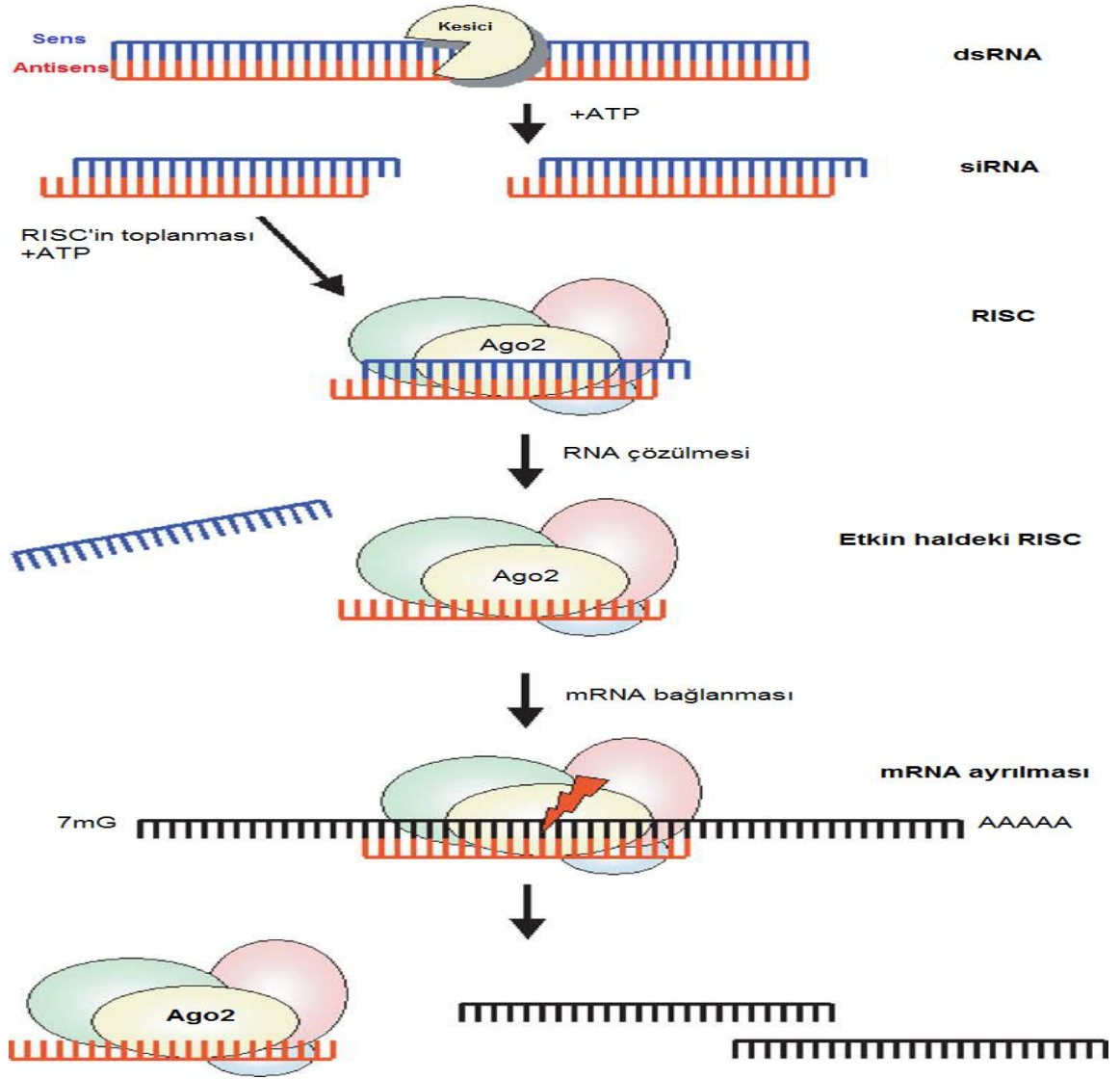
yolaklar son derecede önemli rol oynamaktadır [103]. Hedeflenmiş terapide iki farklı yaklaşım vardır: İlkinde hedef proteinlerle interfere olan monoklonal antikorlar veya küçük moleküler ilaçlarla doğrudan tümör antijenleri hedeflenir, diğerinde ise dolaylı bir yol olan anti-kanser ilaçlar tümör yüzeyindeki reseptörlere bağlanan tümör spesifikleri kullanarak tümörü hedeflemektedir [101].

Çeşitli hedef moleküllere yönelik moleküler antikorlar, yüksek seçicilik, olumlu toksisite profilleri ile kanser hedefli tedavilerden biri olmuştur [104]. Vasküler endotelial büyüme faktörü'nü (VEGF) hedefleyen ve monoklonal antikor olan Bevacizumab'ın [Avastin; Genentech], anjiyogenezi engelleyerek kanser gelişimini durdurduğu gösterilmiştir [101; 105; 106].

Epitelyal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR, HER2) ve ligandları insan tümör hücreleri üzerinde bulunmaktadır ve normal epitel hücreler ile çok sayıda tümör epitel hücrelerinin yüzeylerinde yüksek miktarda eksprese olma özelliklerinden dolayı yeni bir hedef olarak seçilebilecek özelliklere sahiptir [100]. Küçük molekül inhibitörleri de hedef tedavide kullanılan diğer bir yöntem olmakta, monoklonal antikorlara göre daha az spesifikite göstermekte ve oral yolla kullanılmaktadır [102]. İmatinib (Gleevec, NOVARTIS Pharma), Bcr-Abl füzyon geninin tirozin kinaz enzim aktivitesini durdurarak, hücre içi sinyal mekanizmalarını engelleyen ve lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eden küçük organik bir moleküldür [100]. Tirozin kinazlar hücre sinyalleri ile interfere olarak hücresel süreçleri durdurmaktadırlar [102].

#### **2.1.3.4. siRNA Tedavisi**

RNA interferans bitkilerde, bazı omurgasızlarda ve memelilerde bulunan, hedef mRNA'ya komplementer, çift zincirli RNA'ların hücreye verildiğinde bunların sitoplazmada mRNA'ya bağlanıp degradasyonda dolayısıyla translasyona engel olmasında rol oynadığı gen susturma mekanizmasıdır ve bu mekanizma direkt sorunlu geni veya ondan kodlanan mRNA'yı hedefler [9]. siRNA'nın mRNA ile etkileşimi sentezden önceki zararlı proteinlerin üretimini azaltır [54].



**Şekil 2.8.** siRNA çalışma mekanizması [107]

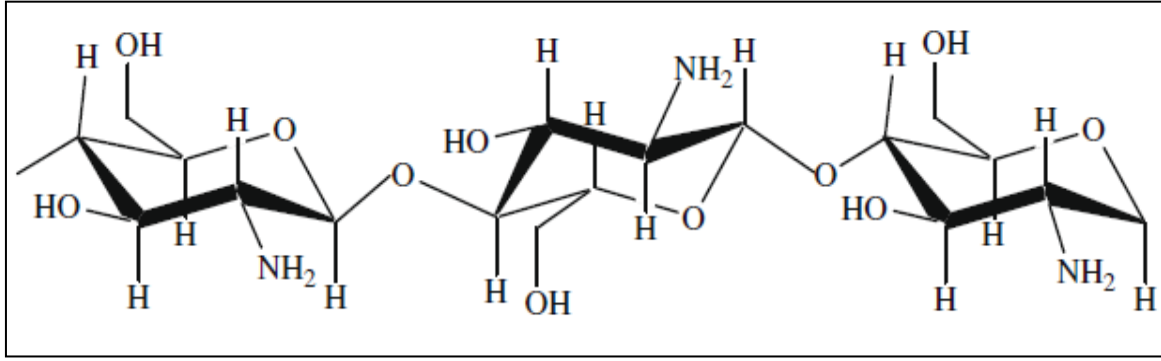
Şekil 2.8.'de gösterilen siRNA çalışma mekanizması siRNA'nın protein sentezinde kullanılan ve hastalığı üreten mRNA'yı nasıl etkisiz hale getirdiğini göstermektedir [108]. Çift zincirli RNA'lar kesici ile ayrılır. siRNA'lar RNA uyarımlı susturma kompleksi (RISC) ile birleşir ve açılmamış halde olur. Antisens zinciri mRNA'yı hedeflemek için aktif RISC kompleksine rehberlik eder. En son olarak da mRNA ayrılır ve etkisiz hale gelir [107]. Çift zincirli RNA olan dsRNA, RNA baskılama(silencing) mekanizması tarafından kırılarak 21-23 nükleotid uzunluğundaki küçük interfere edici RNA'yı (siRNA) oluşturur ve bu siRNA'lar da, tamamlayıcı mRNA moleküllerini arayıp bağlayan RNA-indüklü susturma kompleksi (RISC) tarafından antisens, tek zincirli RNA (ssRNA) yapısına

dönüştürülür [109]. RISC; antisense diziyeye sahip siRNA zincirini, kendisine komplementer olan mRNA'yı Watson-Crick baz eşleşmesine göre bulması ve hibridleşmesi için rehber olarak kullanır ve bu enzim kompleksi hedef mRNA'nın 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağı endonükleaz aktivitesiyle keser [110]. siRNA, uzun zincire sahip dsRNA'dan doğal yolla üretilmiş olmasına rağmen, 21 nükleotitli sentetik siRNA, RNAi (RNA interferans)'yi etkileyebilir ve sentetik siRNA memeli hücrelerinde gen susturmayı tetikleyebilir [111].

Etkili gen baskılama üretimi için sadece birkaç siRNA molekülünün varlığının yeterli olması sebebiyle siRNA oldukça önemlidir [112; 113]. siRNA, spesifik genlerin fonksiyonel analizinde, kanser hücrelerinde gen ekspresyonunda, çeşitli tedavi edilemeyen hastalıkların terapötiklerinin gelişiminde, göz, akciğer gibi lokal hedeflemelerde, genetik bozuklukların tedavisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır [54; 114]. siRNA, in vivo sistemik hedefleme sistemlerinde biyo-uyumlu, biyo-bozunur, immünojenik olmayan, etkili şekilde hücre hedefleme ve sadece ilgilenilen mRNA'yı hedefleme gibi karakteristik özelliklere sahip olmalıdır [54]. İn vivo ve in vitro çalışmalarda hücrelerde siRNA kullanımı hızlı degradasyona ve zayıf hücresel alıma engel olmaktadır [112].

## **2.2. Kitosan Nanopartiküller**

Kitin, böceklerin ve deniz kabuklularının yapısında yer alan beyaz renkte, biyo-bozunur ve toksik olmayan, selülozdan sonra doğada en fazla bulunan ikinci doğal biyopolimerdir [11; 12; 13]. Kitosan ise kitinin deasetile edilmesiyle oluşan ve yüksek biyoyumluluk, biyolojik olarak bozunabilme, non-toksik ve yüzeyde tutunma gibi mükemmel özellikleri olan, biyomedikal ve endüstriyel uygulamalardaki ideal kullanımıyla dikkat çeken doğal bir katyonik polimerdir [11; 12; 13].



**Şekil 2.9.** Kitosanın Kimyasal Yapısı (115)

Kitosan'ın büyük bir moleküler ağırlığa ve pozitif yüke sahip olması nedeniyle negatif yüklü yüzeylere yapışması, film ve jel formülasyonlarında olabilmesi endüstride yaygın kullanımını gerektirmiştir [13]. Ayrıca jel formunun, kontrollü ilaç salım formülasyonlarında kullanılabilirdiği raporlanmıştır [116; 117; 118].

Kitosan ilaç taşıyıcı sistemlerde ve özellikle gen terapide geniş bir kullanım alanına sahiptir ve pozitif yükünden dolayı negatif yüke sahip DNA ve protein ile etkili bir şekilde kompleks oluşturur [114; 119; 120]. Kitosanın moleküler ağırlığına bağlı olarak DNA-kitosan partikül kompleksinin ortalama boyutu 100-600 nm arasında değişim göstermektedir [120]. Birçok çalışmada kitosan, düşük toksisiteye sahip olma, biyolojik olarak uyumlu olma ve biyolojik olarak bozunabilme gibi özelliklerinden dolayı siRNA taşıyıcısı olarak kullanılmıştır [114]. Kitosan nanopartikülünü sodyum tripolifosfat ile çapraz bağlamak için basit kompleksleşme ve iyonik jelleşme olmak üzere iki yöntem vardır ve bu iki yöntem de kitosanın moleküler ağırlığına, konsantrasyonuna, kitosan/TPP oranına ve pH a bağlı olarak 500 nm den daha küçük partikül elde edilmesini sağlar [114].

100-200 nm boyutlarında hazırlanabilen kitosan nanopartiküller, taşınma sırasında siRNA' yı degradasyondan korur ve hücreye yabancı nükleik asitlerin daha etkili aktarılmasını sağlar [121]. Kitosan'ın yüksek degradasyon derecesi onun pozitif yükünü artırdığı gibi siRNA'ya da daha iyi bir bağlanma gerçekleştirmektedir ve bunun sonucunda kitosanın protonlanmış amin grupları negatif yüklü siRNA'yı nötralize etmekte ve siRNA'nın hücre içine alımını kolaylaştırmaktadır [121].

Kitosan nanopartiküller hem kanser tedavisinde hem de görüntülenmesinde anti-kanser ajan olarak kullanılmaktadır [122]. Diğer nanopartiküllere göre ilaç salımında EPR (artan geçirgenlik ve retansiyon) etkisiyle tümör dokularında daha fazla lokalize olmaktadır ve daha fazla kullanılmaktadırlar [123]. Suda

çözünebilen polimer-ilaç konjugatları yüksek geçirgenlikteki kan damarlarına sahip katı tümörleri hedefleyebilir, yani; kitosan da suda çözünebilen bir polimer olduğu için tümör hedeflemesi mümkündür [124]. Çünkü geleneksel anti-kanser ilaçlar yüksek toksisiteye sahiptir ve suda çözünürlükleri düşüktür [125]. Yapılan in vitro ilaç salım çalışmaları, kitosan nanopartikülün boyut ve kararlılığı, enkapsülasyon etkinliği gibi özelliklerini öne çıkarmaktadır [126]. Küçük partikül boyutuna ve pozitif yüke sahip kitosan nanopartiküller, diğer kitosan türevlerine göre daha iyi anti-tümör etkinliği göstermektedir [127]. Kitosan nanopartikülün anti-tümöral mekanizması hücrenin normal olarak ölümünü tetiklemesiyle ilişkilidir [127]. In vitro ortamda yapılan çalışmalarda hücrelerin yaşama sürelerinin kısalması, negatif yüzey yükünün azalması, DNA'nın parçalanması gibi güçlü aktiviteler, kitosan nanopartikülün tümörün etkinliğini azalttığını kanıtlamıştır [127]. Bütün bu sebeplerden dolayı kitosan nanopartiküllerin kanser tedavilerinde kullanımı günden güne artmaktadır.

### **2.3. ABCE1 Proteini**

ABC taşıyıcılar karakteristik şekilde organize olmuş polipeptit veya protein domainlerinin fonksiyonlarını gerektirir ve insanda 49 üyesi bulunmaktadır [128]. ABCE1 geni ABC (ATP bağlayıcı kaset) çoklu gen ailesi üyelerinden biri olmakla birlikte bağlayıcı etkisi olan nükleotidleri içerir ve nakil olması mümkün değildir [126]. ABCE1 geni, sadece memeli hücrelerde bulunan interferon ile indüklenmiş ribonükleaz L'nin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiş olan proteini şifreler [129; 130]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ABCE1'in protein sentezi çalışmalarında ribozomal alt birim ve üst birimin birbirine bağlanmasında ve ayrılmasında görev aldığı ve protein sentezinin sonlandırılmasında rol oynadığı gösterilmiştir [129; 131]. ABCE1'in fonksiyonlarının ilk buluşu siRNA vektörünün ABCE1 genini hedeflemesi ile olmuştur [129]. Translasyon, kanser gibi patolojik gelişimlerde çok önemli bir süreç olmaktadır ve terapötikler için ABCE1'i potansiyel hedef yapmaktadır [129]. Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ABCE1 proteini ve mRNA 48 akciğer tümör dokusu örneğinde aşırı derecede eksprese edilmiş ve ABCE1'in ekspresyonu akciğer kanserinin klinik evresi ve oluşumuyla ilişkilendirilmiştir [133].

#### **2.4. eRF3 Proteini**

Hücre çoğalması ve kanser gelişiminde translasyonun ilişkisini destekleyen kanıtlar vücut gelişiminde görülmektedir ve başlangıç, uzama ve sonlanma faktörlerinin fazla ekspresyonunu içermektedir [134; 135; 136]. Ribozomal A bölgesine bağlanan ve ökaryotik translasyonun sonlanmasında görev alan ve eRF1 ve eRF3 olmak üzere iki tane serbest bırakıcı faktör vardır [137]. eRF1, üç sonlanma kodonunu tanır ve bu kodonlardan gelen sinyali peptidil transferaz bölgesine transfer eder [138]. eRF3 ise hidroliz enzimi olan küçük GTPaz'dır ve eRF1'in aktivitesini artırır [139]. Yapılan çalışmalar eRF3'ün hücre döngüsü, hücre iskeleti oluşumu ve kanser oluşumundaki genlerle alakalı olduğunu göstermiştir [140]. eRF3 hücre döngüsünde G1-S fazı geçişlerinin düzenlenmesini ve zincir sonlanma basamağında eRF1'in GTP bağımlı uyarıcı olduğu durumlarda protein sentezinin düzenlenmesini kontrol etmektedir [139; 141]. Yapılan çalışmalarda eRF3a'nın siRNA'lar kullanılarak azaltılması, hücrenin G1 fazında yakalanmasını sağlamaktadır ve eRF3'ün mTOR yolağında düzenleyici olarak görev üstlendiği gösterilmiştir [140].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde uygun pH'da kitosan nanopartiküller hazırlanmıştır. Kitosan nanopartikülü hazırlamak için TPP çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Bu bölümde partiküller, farklı pH'larda ve farklı derişimlerde çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanmış ve zeta-sizer ile boyutlarına ve yüklerine bakılmış, AFM ve SEM ile görüntü ve boyutları kontrol edilerek en uygun olanı seçilmiştir. Burdan elde ettiğimiz en uygun pH ve en uygun derişimdeki TPP'de elde edilen partiküllerden siRNA yüklü partiküller hazırlanmıştır. Bu aşamada eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ABCE1-eRF3 siRNA ve kontrol olarak dört farklı nanoparçacık hazırlanmıştır.

İkinci bölümde, MCF-7 tümör hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmış, inkübe edilmiş ve belli sayıya ulaştıktan sonra well-plate'lere ekimi yapılmıştır. Bu well'lere hazırlanan nanoparçacıklar ve kontrol grubu içinde medium uygulanmıştır ve nanoparçacıkların hücreler üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Daha sonra gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre sayımı yapılmış ve zamana bağlı hücre proliferasyonlarına bakılmıştır. En son olarak da apoptoz- nekroz görüntüleri değerlendirilmiştir.

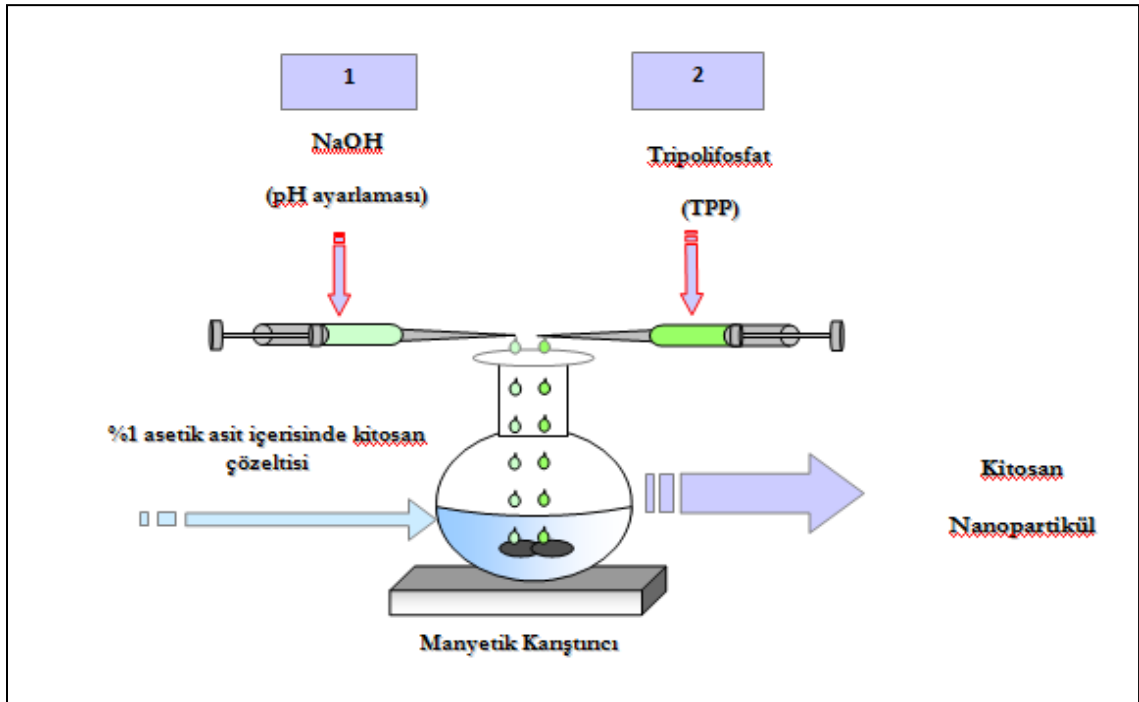
#### 3.1. Kimyasallar

Kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında bulunan kitin'in deasetiasyonu sonucu elde edilen ve 25 °C'de saf suda çözüldüğünde 20-300 cp viskoziteye sahip düşük molekül ağırlıklı kitosan (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Kitosan çözeltisini hazırlamak için organik çözücü olan %100 ultra saf asetik asit [Riedel-de Haën, Almanya] kullanılmıştır. NaOH (Fluka, İsviçre), kitosan çözeltisinin pH'ını ayarlamamız için kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak Tripolifosfat (TPP; Sigma, ABD) kullanılmıştır. Hazırlanan nanoparçacıkların içine hapsolması için eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve kontrol olarak insan genleri ile ilişkisi olmayan, ateş böceği lusiferaz enzimi siRNA kullanılmıştır. Hücresel uptake'in belirlenmesinde ise nanoparçacıkların işaretlenmesi için floresein kullanılmıştır. Ekimi yapılan ve kullanılan hücreler MCF-7 tümör hücreleridir. Nanoparçacıkların sitotoksitelerinin belirlenmesinde de boya olarak tripan mavisi işaretlemek amacıyla kullanılmıştır. Hücre ekiminde pozitif kontrol olarak medium, negatif kontrol olarak ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li medium hücrelere uygulanmıştır.



### 3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında kitosan nanopartiküller iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. 0,25 gram düşük viskozite ve %80 deasetilasyona sahip kitosan, %1'lik asetik asit içerisinde çözünerek %0,25'lik (w/v) kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisinin pH'ını 4,0-5,0'e ayarlayabilmek için 10 M'lık NaOH çözeltisi damla damla manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan kitosan çözeltisine damlatılmıştır. Kitosan çözeltisi için en uygun pH bulunup sabitlendikten sonra 12 ml kitosan çözeltisi max. hızda manyetik karıştırıcı üzerindeki bir behere alınarak, üzerine, %0,15, %0,20, %0,25 ve %0,3'lük TPP çözeltileri (w/v) damla damla eklenmiştir. TPP eklendikten sonra bu çözelti oda sıcaklığında 30 dk en yüksek karıştırma hızında karışmıştır. Daha sonra bu çözelti tüplere alınarak 12000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Yine 12000 rpm de 10 dakika iki kez yıkanmıştır. Böylece kitosan nanoparçacıklar boyut-yük analizi ve karakterizasyon için hazır hale gelmiştir.



Şekil 3.1. Kitosan nanopartiküllerin hazırlanışının şematik gösterimi

#### 3.2.1. Kitosan Nanopartiküllerin Boyut ve Yük Analizi

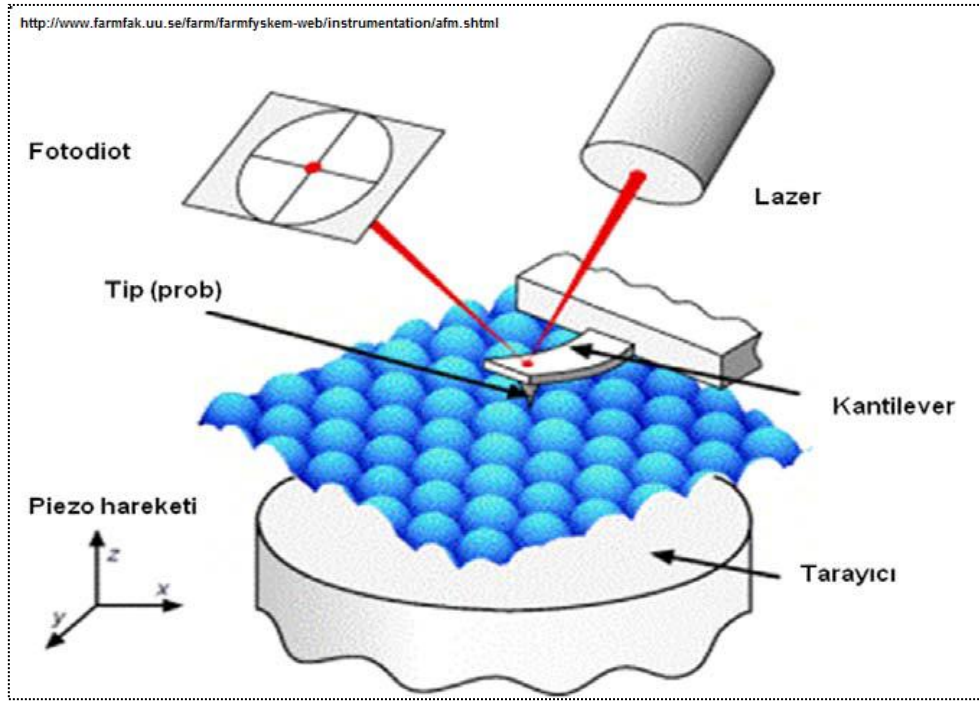
Hazırlanan kitosan nanopartiküllerin büyüklüklerini, dağılımlarını ve yüklerini belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır.

Zeta-Sizer dinamik, statik ve elektroforetik ışık saçılma yöntemleri ile çalışmaktadır. Dinamik ışık saçılmasını kullanarak mikrondan nanometreye kadar partikül ve molekül boyutu, elektroforetik ışık saçılmasını kullanarak da zeta potansiyeli ölçmektedir. Bu çalışmada yıkanarak çöktürülen kitosan nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilmiş ve seyreltikten sonra yaklaşık 2 ml hacimli örnek çözelti, polistiren küvet içerisine konulmuştur. Deneyler polistiren küvet içerisindeki örnek çözeltinin içerisinden lazer ışığının geçirilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Kitosan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics, UK) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) kullanılmıştır. Aynı zamanda zeta sizer'da elde edilen verileri karşılaştırmak amacıyla da AFM ve SEM kullanılmıştır ve böylece boyutları bir kez daha kontrol edilmiştir. Hazırlanan örneklerin geometri, şekil ve boy dağılımları da bu mikroskoplarla belirlenmiştir.

AFM bir tür taramalı uç mikroskobudur. Yaklaşık 20 yıl önce Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından geliştirilmeye başlanmış atomik kuvvet mikroskobu, mekanik bir ucun örnek yüzeyini algılaması ile çalışmaktadır [142; 143]. Cihaz çok yüksek çözünürlükteki bir taramalı kuvvet mikroskobu olmakla beraber nanometre skalasındaki örneklerin dahi yüzeylerinin mekanik özelliklerinin araştırmasını kapsamaktadır [143]. Tipik bir AFM sistemi mikro boyutta manivela probu ve onun altına yerleştirilmiş moleküler sivri bir uçtan oluşmaktadır [144]. AFM manivelanın sivri ucu örnek üzerindeyken yüzey ile fiziksel etkileşim halindedir. Örneğin yüzeyini yukarı aşağı doğru hareket eden bu sivri uç tararken lazer ışığı manivelaya çarpar ve yüzey ile sivri uç arasındaki kuvvet ölçülür [144]. Manivela yüzeyi tarayarak üç boyutlu görüntü oluşturabilmektedir. En önemli avantajı özel bir hazırlama işlemi olmadan örneklerin doğrudan her ortamda görüntülenebilmesidir [142].



**Şekil 3.2.** Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun (AFM) şematik görünümü

Nanopartiküllerin AFM (Nanomagnetics,UK) görüntüsünü elde etmek için örnekten 10 µl alınmış ve mika yüzey üzerine damlatılarak azot gazı altında kurutulmuş, oda koşullarında görüntüleri alınmıştır. Görüntüler 300 kHz rezonans frekansı ve 40 N/m kuvvet sabitine sahip silikon uç kullanılarak dinamik modda alınmıştır.

### **3.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması**

0,5 gram düşük vizkozite ve %80 deasetilasyona sahip kitosan, %1'lik asetik asit içerisinde çözünerek %0,50'lik (w/v) kitosan çözeltisi hazırlanmıştır ve yarı yarıya seyreltilip %0,25'lik (w/v) kitosan çözeltisi elde edilmiştir. Kitosan çözeltisinin pH'ını 4,5'e ayarlayabilmek için 10 M'lık NaOH çözeltisi damla damla manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan kitosan çözeltisine damlatılmıştır. 12 ml kitosan çözeltisi max. hızda manyetik karıştırıcı üzerindeki bir behere alınarak, üzerine %0,20'lik TPP çözeltisi (w/v) ile beraber siRNA damla damla eklenmiştir. TPP ile beraber eklenen siRNA'ların nanopartiküllerin içine hapsolmesi beklenmiştir. Çalışmada eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve kontrol olarak insan genleri ile ilişkisi olmayan, ateş böceği lusiferaz enzimi siRNA'ı ile nanoparçacıklar hazırlanmıştır. TPP-siRNA eklendikten sonra bu çözelti oda sıcaklığında 30 dk en yüksek karıştırma hızında karışmıştır. Daha sonra bu çözelti tüplere alınarak 12000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Yine 12000 rpm de 10 dakika iki kez yıkanmıştır. Böylece siRNA yüklü kitosan nanoparçacıklar hücre çalışmaları için hazır hale gelmiştir.

### **3.4. Kitosan Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileştirilmesi**

MCF-7 ve Hela tümör hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanır. Hücreler %10 FCS, %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 kültür ortamında flasklarda 37C<sup>o</sup>'de karbondioksit etüvünde inkübe edilir. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar 2 gün ara ile besi ortamının vasatı değiştirilir. Belli sayıya ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılarak 24 well platelere (20.000hücre/well) ekimi yapılır. 24 welllerdeki hücreler belli bir sayıya ulaştıklarında, serum ve antibiyotik içeren vasatlar, serum ve antibiyotik içermeyen vasat ile değiştirilir. Well'lere, hazırlanan nanopartiküller uygulanır. Belirtilen süreler sonunda nanopartiküllerin etkileri araştırılır. Nanopartiküller hazırlanırken, TPP çözeltisinin içerisine 1 ml floresein çözeltisi eklenir. Nanopartikül hazırlanma prosedürü aynen uygulanır. Sonrasında hücrelerin bulunduğu, 24 well platelere hazırlanan nanopartikül çözeltisinden 1 ml eklenir. 1 saat inkübasyon sonrasında 3 kez mediumla yıkanan hücreler inverted floresan mikroskobunda görüntülenir.

### **3.5. Hazırlanan Tüm Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi**

Hücre kültürü in vitro koşullarda hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Hücrelerin üremeleri için ortama çeşitli besiyerler eklenmelidir ve bu besiyerlerin içinde de aminoasitler, vitaminler, glikoz ve organik maddeler, sığır serumu, sığır ve tavuk embriyon ekstreleri, sığır amniyotik sıvıları bulunabilmektedir [145]. Hücre kültüründe in vivo ortamda yapılamayan deneyler belirli bir hücre hattından alınıp çoğaltılan hücrelerde in vitro olarak yapılabilir ve buna göre bir sonuca varılabilir. Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllarda başlamış ve ilk başarılı çalışma 1907 yılında Ross Harrison tarafından kurbağa embriyoları ile yapılan deneyde normal fonksiyonun in vitro olarak da uygulanabilirliği gösterilmiş ve bu çalışma doku kültürünün gerçek başlangıcı olarak kabul edilmiştir [146].

Hücre kültürü tümör tedavisi, somatik gen tedavisi, kemik iliği nakli, aşı, hormon üretimi, yapay deri gibi birçok alanda kullanılmaktadır [147].

### 3.5.1. MCF-7 Hücrelerinin In vitro Kültürünün Hazırlanması

Dondurulmuş şekilde -80 C° de derin dondurucuda bulunan kriyotüplerdeki MCF-7 hücreleri derin dondurucudan alınarak çözülür. %10 FCS, %10 DMEM-F12 , %1 penisilin/streptomisin solüsyonundan oluşan besiyeri ortamı hazırlanır. Çözülen MCF-7 hücreleri falkon tüp içerisine koyulur ve üzerine 1 ml hazırlanan medyumdan koyulur ve 2000 rpm'de 1,5 dk santifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet 4 ml medyum ile süspanse edilip 25cm<sup>2</sup> lik flaska aktarılır. Flaskın kapağı hafif gevşetilir ve flask 37 C° de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre koyulur. Her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandığında kültür tripsinize edilerek hücreler yeni bir flaska aktarılır.

#### Çizelge 3.1. MCF-7 hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması

---

<b>Hücre Türü:</b>	MCF-7 hücreleri
<b>Kültür kabı:</b>	25 cm <sup>3</sup> 'lük polistren flask (yüzeyi, hücre tutunmasına uygun)
<b>Kültür vasatı:</b>	%10 Fetal sığır serumu içeren DMEM-F12; %1 penisilin streptomisin.
<b>Rutin sub-kültür:</b>	1/3
<b>Kültür özelliği:</b>	Monolayer
<b>Toplam hacim:</b>	5 ml
<b>pH:</b>	7,2-7,5
<b>Sıcaklık:</b>	37±0,5°C
<b>İnkübasyon ortamı:</b>	% 5'lik CO <sub>2</sub>

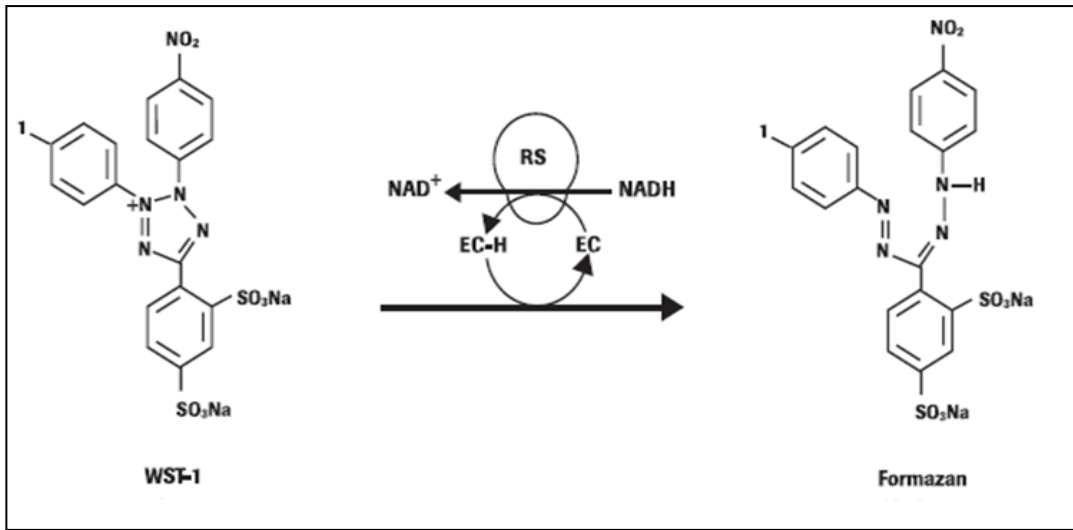
---

Belli sayıya ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılarak 96 well platalere (5.000hücre/well) ekimi yapılır. 96 welllerdeki hücreler belli bir sayıya ulaştıklarında serum ve antibiyotik içeren vasatlar, serum ve antibiyotik içermeyen vasat ile değiştirilir. Wellere hazırlanan nanopartiküller uygulanır. Belirtilen süreler

sonunda nanopartiküllerin etkileri araştırılır. Kontrol grubu olarak wellere sadece medium ilave edilir.

### 3.5.2. MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Toksisitenin Belirlenmesi

Toksik olduğu düşünülen maddenin hücre üzerindeki etkisi dikkate alınarak hücre sayısını belirlemek amacıyla yapılan testler sitotoksisite testleridir. Hücre sayısının belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarındaki en önemli amaçlardan biridir. Spesifik enzimler, boya veya substratlar kullanılarak sadece canlı hücreler veya sadece ölü hücreler sayılabilmektedir. Yapılan çalışmada hazırlanan nanoparçacıkların MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 metodu ve tripan mavisi ile boyanarak incelenecektir. WST-1 yapısında tetrazolyum tuzları bulunmaktadır ve bu tuz canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle formazan kristallerine dönüşmektedir. Bu test canlı hücre sayısını vermektedir ve canlı hücre sayısındaki artış ile birlikte mitokondriyal enzim aktivitesinde de artış olmakta bunun sonucunda formazan kristallerinin miktarı artmakta ve formazan kristalleri artışı koyu renk oluşumuna sebep olmaktadır bu da hücre sayısı ile doğru orantılıdır [148].



**Şekil 3.3.** WST-1 yapısında tetrazolyum tuzları formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi [149]

Toksisite deneyi için 96 well plate kullanılır. İlk aşamada MCF-7 kanser hücrelerinin 96 well platalere her bir kuyucuğa  $5 \times 10^3$  hücre düşecek şekilde ekimi yapılır ve 24 saat inkübasyona bırakılır. 24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilecektir. Kuyucuklardaki medyum boşaltılır. Kuyucuklara 100 µl medyum koyulur. Kitosan nanopartikül, ABCE1

siRNA, eRF3 siRNA, kontrol siRNA, ABCE1-eRF3 siRNA, kontrol siRNA yüklü nanopartiküller, ABCE1 siRNA yüklü nanopartiküller ve eRF3 siRNA yüklü nanopartiküller hücrelere ilave edilerek 72 saat inkübe edilir. Pozitif kontrol olarak sadece medium hücrelere uygulanır. İnkübasyon sonunda well platelerdeki medium boşatılır. Fenol red'siz DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM-F12 medium'dan 100 µl kuyucuklara koyulur, üzerine 10 µl WST-1 çözeltisi eklenir. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420-480 nm'de okunur. Canlı hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez.

**Çizelge 3.2.** 96 well-plate'e ekilen hücreler üzerine eklenen partikül ve siRNA'lar

Medium	eRF3 siRNA
Nanopartikül	ABCE1-eRF3 siRNA
Kontrol siRNA	Nanopartikül-ABCE1 siRNA
Nanopartikül-Kontrol siRNA	Nanopartikül- eRF3 siRNA
ABCE1 siRNA	

İkinci aşamada yukarıda belirtildiği gibi hücrelerin ekimi yapıp nanopartiküllerle etkileştirildikten sonra enzim ile kaldırılarak tripan mavisi ile boyanıp otomatik hücre sayım cihazı ile sayılır. Bu sayımda mavi boyanmış hücreler ölü, parlak ve boyanmamış hücreler canlı hücreleri göstermektedir. Sayım cihazı otomatik olarak canlı ve ölü hücre oranlarını vermekte olup buradan nanopartiküllerin sitotoksitesisi tespit edilecektir.

### 3.5.3. xCELLigence RTCA ile MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun Belirlenmesi

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

Elektrotların üzerindeki hücrelerin varlığı, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki iyonik ortamı etkiler, bunun sonucunda da elektrot empedansı artar. Ne kadar çok hücre elektroda tutunursa, empedanstaki artışta o kadar çok olur. Elektrot empedansı hücre indeksi (CI) olarak adlandırılır. Eğer ortamda hücre yoksa veya hücreler elektroda iyi tutunmadıysa CI değeri sıfır olur. Elektroda ne kadar çok hücre tutunursa, CI değeride o kadar çok büyür.

MCF-7 kanser hücreleri normal flasklarda çoğaltılıp belli bir sayıya ulaşıldıktan sonra hücrelere 0,5 ml tripsin-EDTA eklenir ve flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska medium eklenip hücreler falkon tüpe aktarılarak 2000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1ml DMEM-F12 medium eklenerek süspanse edilerek hücre sayımı yapılır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA SP instrument, Roche, Almanya) ile hücre IC50 (inhibisyon konsantrasyonu) belirlenir. Hücreler 20.000/well olacak şekilde altın kaplı 96 well plate ekimi yapılacak hücrelerin bir gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilecektir. E-plate'in her well'ine 100 µl medium koyulur. E-plate etüvde bulunan xCELLigence'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenir. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarılır. Tekrar e-plate etüve yerleştirilip, 10 dakika beklenir. 10 dakika sonunda okuma başlatılır. Hücrelerin plate'e tutunması ve çoğalması için 24 saat bekletilir. 24 saat sonunda hücreler growth fazına geçtiğinde ekstraktlar uygulanır. E-plate etüvden çıkarılır, wellerdeki medyumlar boşaltılır ve tekrar tüm kuyucuklara 100 µl medyum konulur ve kontrol siRNA, ABCE1 siRNA, eRF3 siRNA, ABCE1-eRF3 siRNA, nanopartikül, kontrol siRNA yüklü nanopartikül, ABCE1 siRNA yüklü nanopartikül ve eRF3 siRNA yüklü nanopartikül hücrelerin üzerine ilave edilerek 96 saat süre ile



kültürü yapılacak ve 30 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alınacaktır. Böylece cihaz monitöründen zamana bağlı hücre proliferasyonu kayıt edilerek gözlenir. Sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonu gösteren bir grafik ve yine zamana ve miktara bağlı IC50 değerlerini gösteren bir grafik elde edilecektir.

#### **3.5.4. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi**

Hücre ölümleri morfolojik ve biyolojik olarak değerlendirildiğinde apoptotik ve nekrotik olarak ayrılmaktadır. Apoptoz programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken, nekroz hasar yolu ile ölüm anlamını taşımaktadır [150].

Hücrede nekroz toksik madde varlığı ve oksijen yetersizliği gibi sebeplerden kaynaklanabilir ve hücrede şişme görülür. Apoptoz ise fizyolojik ve patolojik sebeplerden olmaktadır. Apoptoz olan hücrelerin komşu hücrelerle bağlantısı kalmaz ve hücrede küçülme görülür [150].

96 well platelere ekilen hücreler konfluent hale geldikten sonra siRNA'ler ve partiküle yüklenmiş siRNA'ler uygulanmıştır. 48 saat sonra ise Annexin V/Propidyum İyodit boyaması yapılmıştır. Boyama için, hücre mediumu çektikten sonra , hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuk başına 100 µl 1:200 oranında seyreltilmiş FITC işaretli Annexin V ve 1:200 oranında seyreltilmiş 100 µl Propidyum iyodit eklenmiştir. Oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dk bekleyen hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskobu (Leica DMI70, Almanya) altında incelenmiştir. İkili boyama sonucunda canlı ve apoptoza girmiş tüm hücrelerin çekirdekleri Annexin V boyası ile boyanırken, nekroza uğramış hücreler propidium iyodid ile boyanmıştır. PI floresan boyası yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyayabilmekte, canlı hücreleri boyayamamaktadır. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girer ve çekirdeği kırmızıya boyar.

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmaları kapsamında siRNA tedavisinde kullanılmak üzere öncelikle kitosan nanopartiküller sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Kitosan polimeri daha önceki bölümlerde de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi sahip olduğu üstün fizikokimyasal (reaktif amin ve hidroksil grupları, polikasyonik özellik, metaller ile şelat oluşturabilme vb.) ve biyolojik özelliklerinden (düşük toksisiteye sahip, biyolojik uyumlu ve biyolojik olarak bozunabilen) dolayı tercih edilmiştir [11; 12; 13; 114]. Yapılan çalışmalar kapsamında öncelikle kitosan nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında boy-boy dağılımına etki eden temel parametrelerden hazırlama ortamı pH değeri ile poliyonik çapraz bağlanma işleminde kullanılan çapraz bağlayıcı derişimi değiştirilerek farklı boy-boy dağılımına sahip nanopartiküler yapıların hazırlanması ve siRNA uygulamaları için hedeflenen nanopartiküler yapıların elde edilmesi gerçekleştirilmiştir.

### 4.1 Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan kitosan partiküller boyut dağılımı, yüzey yükü ve topolojik özellikleri incelenerek karakterize edilmiştir.

#### 4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi

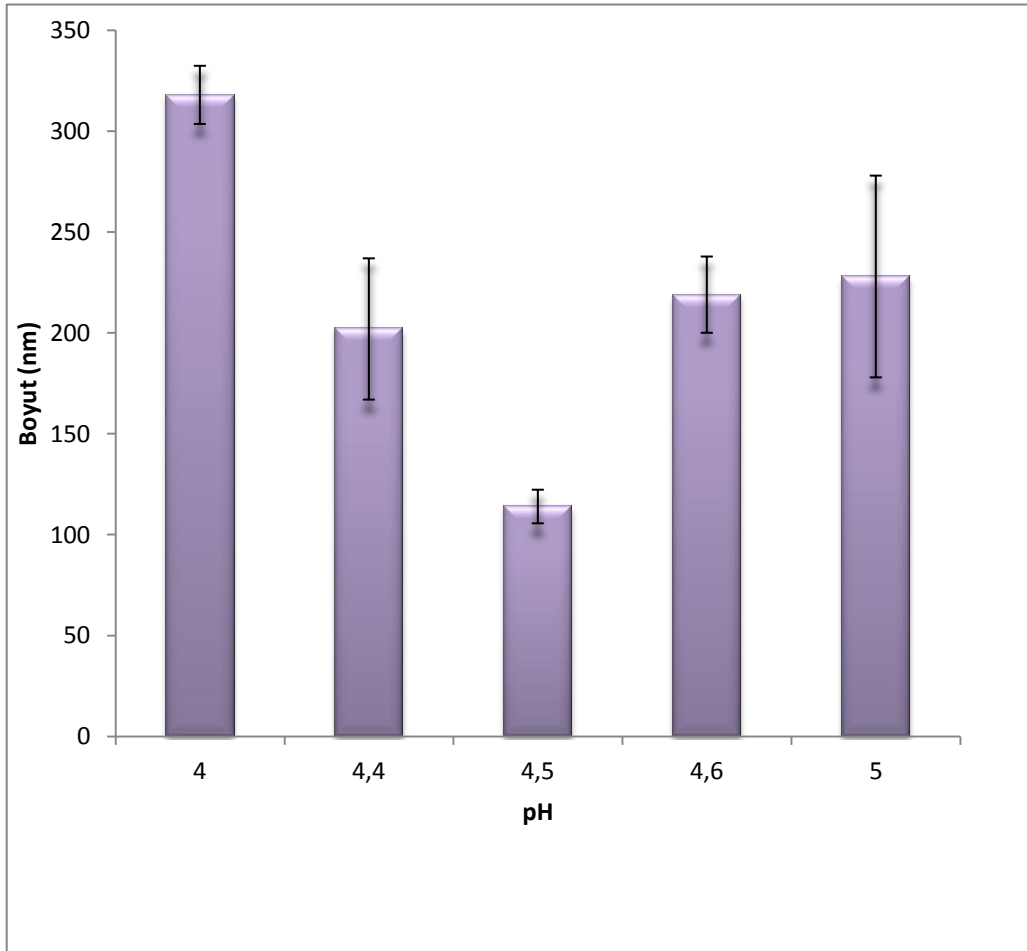
Bu bölümde kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında literatürde yer alan ve benzer çalışmalarda sıklıkla kullanılan iyonik jelasyon yöntemi [151; 154] kullanılmış ve yapılan çalışmalar kapsamında kullanılacak biyolojik moleküller ile uygun bir şekilde bir araya getirilmeleri sağlanmıştır. Ortam koşullarının nanopartikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla; pH değeri ve çapraz bağlayıcı (TPP) derişimi değiştirilerek bir seri deney yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 100-150 nm boy aralığında kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.

##### 4.1.1.1. Çözelti pH'ının Nanopartikül Boyutuna Etkisi

Kitosan, zayıf baz özelliği taşıyan bir polisakkarittir. Nötr durumda veya pH'ın 7,0'den büyük olduğu durumlarda çözünmemektedir. Asidik ortamda kitosanın amin grupları pozitif yüklenmekte ve daha küçük boyutta partiküller elde edilmektedir. Ortam pH'ı değiştirilerek farklı boyutlarda partiküller elde edilmiş ve Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Farklı pH'larda %0,25'lik (w/v) kitosan çözeltisine 0,30%'luk (w/v) TPP eklenmesiyle elde edilen boyut özellikleri (n=3)

pH	Boyut (nm)
4,0	318 ±14,4
4,4	202 ±35
4,5	114 ±8,33
4,6	219 ±18,9
5,0	228 ±50



**Şekil 4.1.** Kitosan çözeltisin pH'ının, nanopartikül boyutuna etkisi

Kitosan nanopartiküller, Alpar ve arkadaşlarının siRNA hedeflemek amaçlı yaptıkları kitosan nanopartiküllerin karakterizasyonu çalışmasındaki yöntem benzer bir şekilde hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen en küçük kitosan nanopartiküller makalede de belirtildiği gibi pH 4,5'de elde edilmiştir ve boyutları da makaledeki boyutlarla karşılaştırıldığında daha küçüktür [114].

#### 4.1.1.2. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Nanopartikül Boyutuna Etkisi

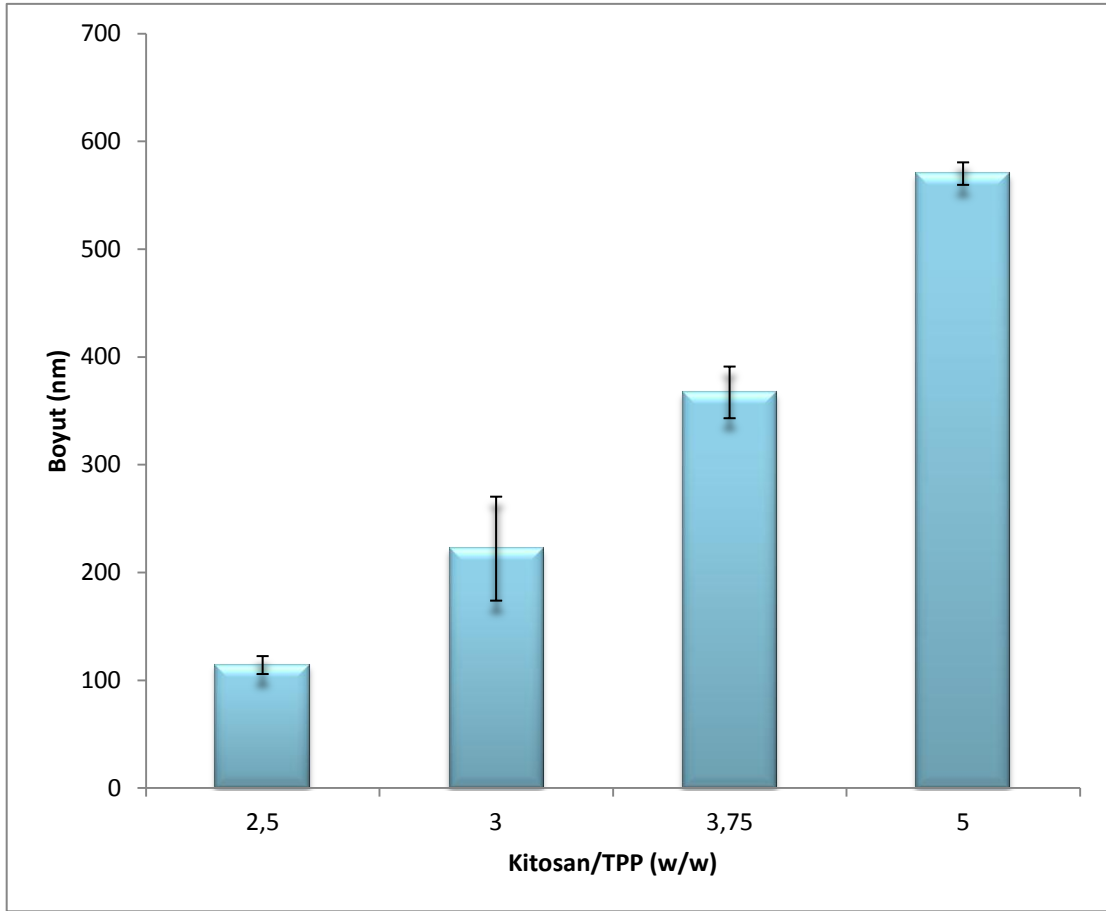
Yapılan çalışmada zıt yüklü iyonların kompleksleşmesine bağlı olarak iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Pozitif yüklü olan kitosan, polianyonlarla çapraz bağlanırken hem hücre içi hem de hücreler arası bağlar yapmaktadır. Kitosanın amin grupları ve TPP'nin fosfat grupları arasında hücreler arası bağlar oluşmaktadır. Bunun sonucunda da, partikül boyutu önemli derecede kitosan çözeltisi ve TPP'nin karışımına bağlıdır. Çizelge 4.2. de kitosanın derişimi sabit tutulup, farklı derişimlerde çapraz bağlayıcı ajan olan TPP kullanılarak hazırlanarak nanopartiküller yapılmış ve boyutları kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.2.** pH 4,5'de %0,25'lik (w/v) kitosan çözeltisinin çeşitli derişimlerde TPP eklenmesiyle elde edilen boyut özellikleri (n=3)

<b>Çapraz Bağlayıcı Ajan Konsantrasyonu</b>	<b>Boyut (nm)</b>
%0,15	570 ±10,44
%0,20	367 ±4,9
%0,25	222 ±6,94
%0,30	114 ±2,89

Şekil 4.2 ye göre Kitosan/TPP (w/w) oranı arttıkça partikül boyutunda da artma görülmektedir. Gan ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada, kitosan-TPP nanopartiküllerin yüzey yükü, partikül boyutu ve morfolojik özellikleri üzerinde çalışmalar yapılmış ve artan kitosan/TPP oranıyla, kitosan nanopartiküllerin boyutunda da artış olduğu ve bu artışın da doğrusal olduğu bulunmuştur [150].

2011 yılında yapılmış olan başka bir çalışmada ise kitosan nanopartiküllerin boyutları üzerinde kitosan/TPP ağırlıkça oranı arttıkça, kitosan nanopartiküllerin boyutlarının arttığı tekrar vurgulanmış ve bunun sebebinin çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan TPP'nin, kitosan moleküllerinin amin gruplarıyla 5 farklı noktadan çapraz bağ yaparak, düşük ağırlık oranının amin grupları üzerinde daha etkili çapraz bağa sebep olduğu ve bunun sonucunda da daha küçük partikül boyutunun elde edildiği gözlemlenmiştir [153]. Bu bilgilere göre, sunulan çalışmada ki elde edilen veriler de literatürü doğrular niteliktedir.



**Şekil 4.2.** Çapraz bağlayıcı derişiminin kitosan nanopartikül boyutuna etkisi

#### 4.1.2. Nanopartikül Yük Analizi

Yapılan çalışmalar kapsamında çözeltinin pH'ı ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu kitosan nanopartiküllerin yüküne etki eden parametreler olarak belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar detaylarıyla alt başlıklar halinde verilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 25-30 mV zeta potansiyeline sahip kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.

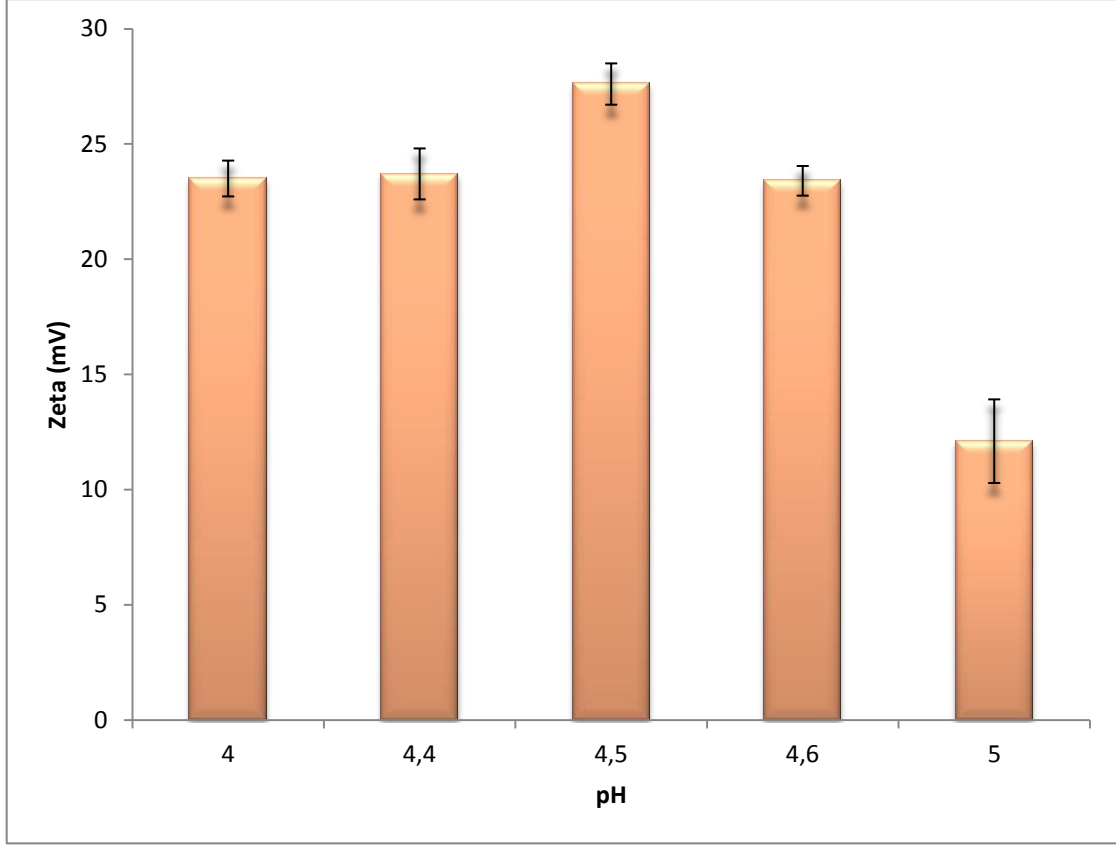
#### 4.1.2.1. Çözelti pH'ının Nanopartikül Yüküne Etkisi

Sunulan bu çalışmada, pH değiştirilerek farklı boyutlarda nanopartiküller üretilmiştir. Çizelge 4.3. de görüldüğü gibi farklı pH larda çapraz bağlanma sadece nanopartikül boyutunu değil aynı zamanda partiküllerin yüzey yükünü de etkilemektedir.

**Çizelge 4.3.** Farklı pH'larda %0,25'lik kitosan çözeltisine 0,25'lik TPP eklenmesiyle elde edilen yük özellikleri (n=3)

pH	Zeta Potansiyel (mV)
4,0	23,5 ±0,78
4,4	23,7 ±1,11
4,5	27,6 ±0,90
4,6	23,4 ±0,64
5,0	12,1 ±1,81

Kitosan nanopartiküllerin pozitif yükle yüklü olması partiküllerin topaklanmasını engellemektedir. Yüzey yükü kitosanın amin gruplarının protonlanmasına bağlı olarak artış göstermektedir. Şekil 4.3'e göre 4,0-4,6 pH aralığında daha yüksek yüzey yüküne sahip nanopartiküller görülmektedir. pH 5,0 de ise yüzey yükünde düşüş gözükmemektedir. Düşüşün sebebi ise, kitosan molekülündeki  $-NH_3^+$  gruplarının proton yükünün azalmış olması ve bunun sonucunda da kitosan üzerideki artan amino gruplarının etkisiyle daha geniş çapraz bağlar yapmasıdır [153]. Literatürdeki çalışmalarda, sunulan tez kapsamındaki çalışmayı desteklemektedir. Kitosan nanopartiküllerle yapılan bir çalışmada farklı pH aralıklarında çözeltiler hazırlanarak partiküller elde edilmiş ve yüzey yüklerinin farklı pH değerlerinde farklı karakteristikler gösterdiği görülmüş en pozitif yükle yüklenmiş partikülün ise pH 4,5' da olduğu gözlemlenmiştir [150]. Alpar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da pH 4,5 değerinin en uygun pH olarak seçilmiş olması sunulan çalışmayı desteklemektedir [114].



**Şekil 4.3.** Kitosan çözeltisi pH'ının, nanopartikül yüküne etkisi

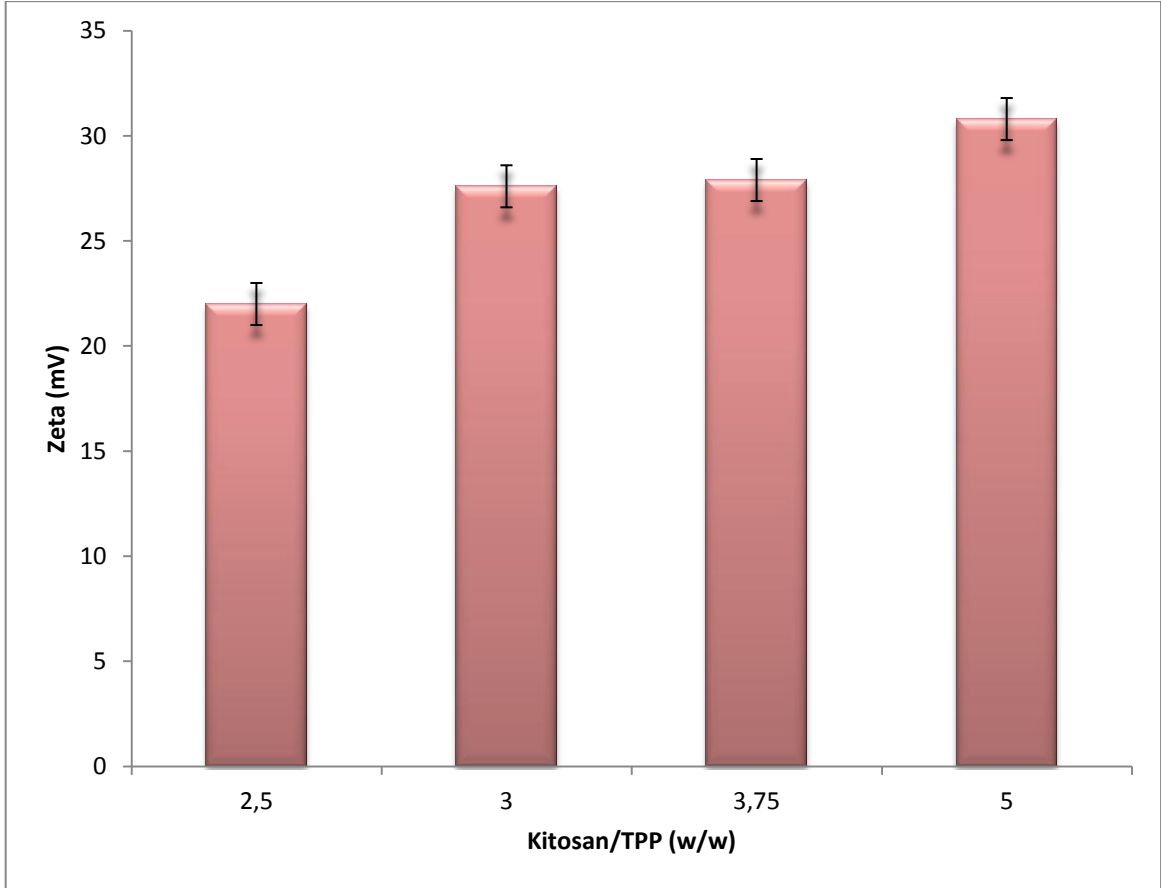
#### 4.1.2.2. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Nanopartikül Yüküne Etkisi

Kitosanın jelimsi yapısı molekül içi ve moleküller arası yaptığı Hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Sulu çözeltileri daha esnek bir zincir yapısına sahiptir. Bu da zincirler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanmaktadır. Kitosan, asetik asitte çözülüp, TPP ile çapraz bağlandığında pozitif yüklü nanopartiküller oluşmaktadır. Kitosan ve TPP'nin karışma oranı partikül boyutunu etkilemektedir. Farklı kitosan/TPP (w/w) oranlarının partikül boyutuna etkisi Çizelge 4.4. de verilmiştir.

Şekil 4.4.'e göre kitosan/TPP oranındaki artış yüzey yükünde de artışa sebep olmaktadır. Ama tüm kitosan/TPP oranlarında nanopartikül pozitif yükle yüklenmiştir. Bulmer ve arkadaşlarının kontrollü salımda kullanmak üzere yaptığı kitosan nanopartiküller de farklı oranlarda hazırlanmış ve kitosanın pozitif yüküne bağlı olarak, kitosan/TPP oranının artışı ile yüzey yükündeki artışında doğrusallık gösterdiği kaydedilmiştir [153].

**Çizelge 4.4.** pH 4,5'de %0,25'lik (w/v) kitosan çözeltisinin çeşitli derişimlerde TPP eklenmesiyle elde edilen yük özellikleri (n=3)

<b>Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu</b>	<b>Zeta Potansiyel (mV)</b>
%0,15	30,8 ±1,92
%0,20	27,9 ±2,30
%0,25	27,6 ±0,95
%0,30	22,0 ±0,77



**Şekil 4.4.** Çapraz bağlayıcı derişiminin kitosan nanopartikül yüküne etkisi

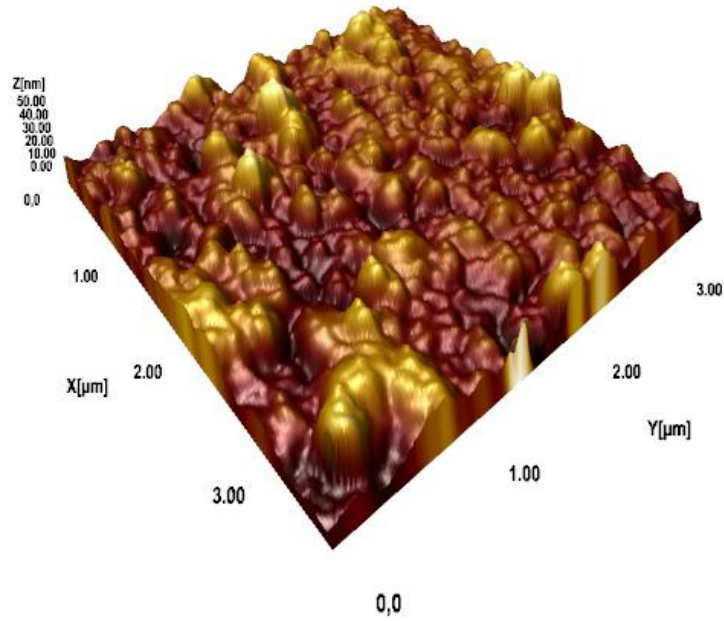
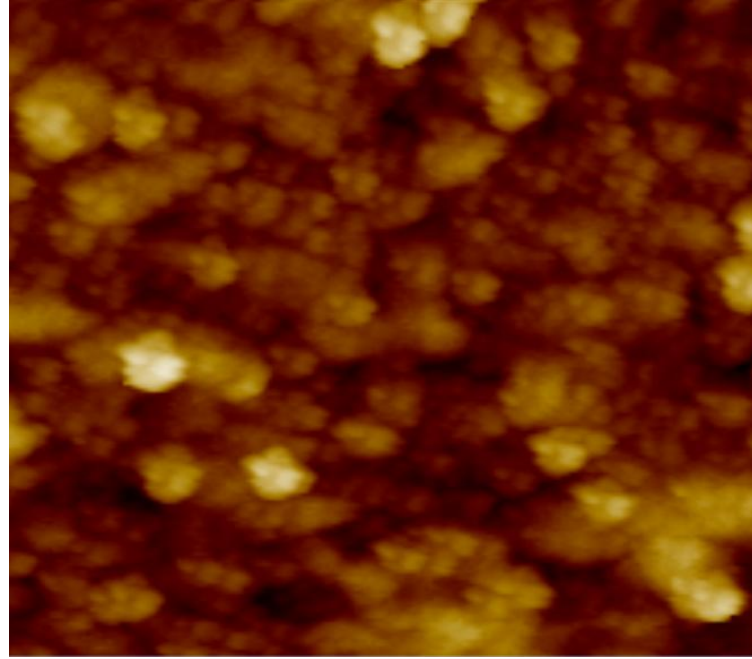
#### 4.1.3. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak kitosan nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen SEM ve AFM görüntüleri Şekil 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir. Elde edilen SEM

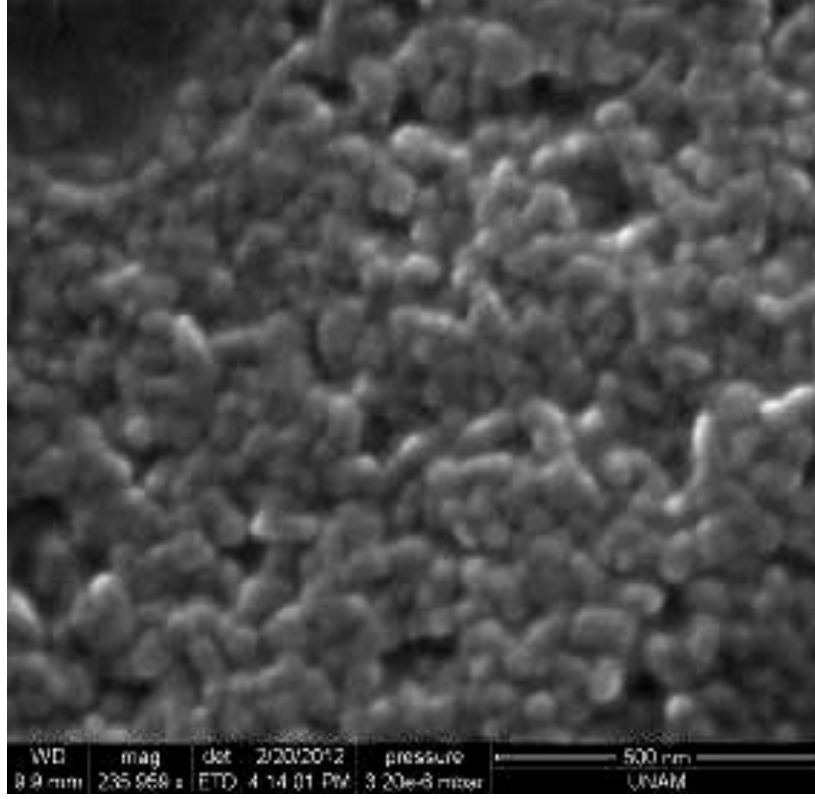


ve AFM görüntülerinden anlaşılacağı gibi kitosan nanopartiküllerin ortalama büyüklüklerinin yaklaşık olarak 40-80 nm aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Topografik açıdan değerlendirildiğinde oldukça düzgün, küresel formda ve monodisperse oldukları anlaşılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen kitosan nanopartiküllerin boyutları literatürdeki diğer çalışmalardaki partiküllerin boyutlarıyla kıyaslandığında [151; 154] oldukça küçüktür.



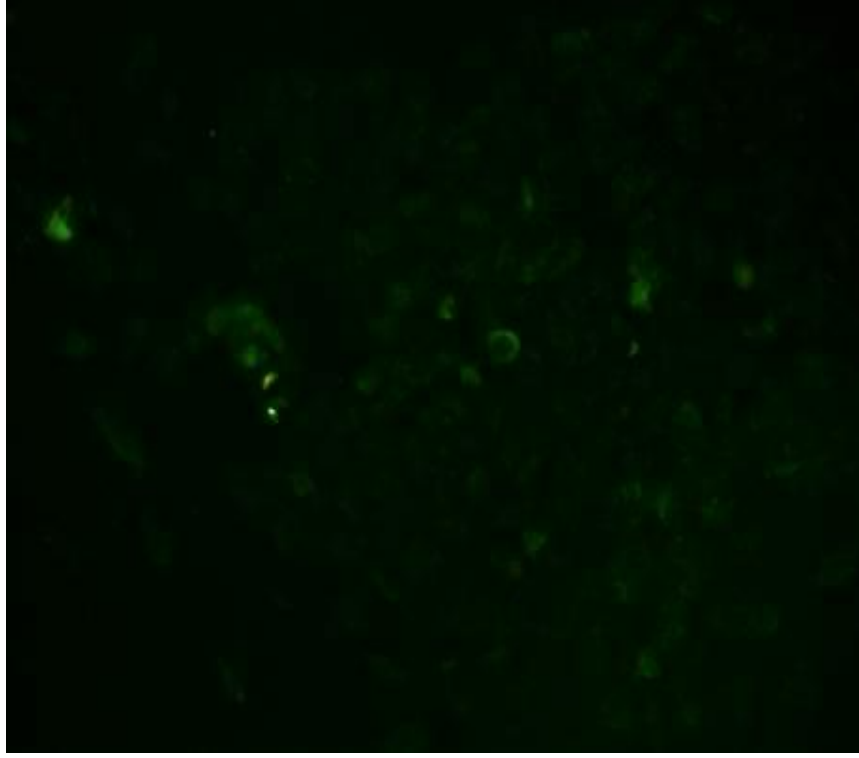
**Şekil 4.5.** Nanopartiküllerden alınan AFM görüntüleri



**Şekil 4.6.** Nanopartiküllerden alınan SEM görüntüleri

#### **4.2. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi Sonuçları**

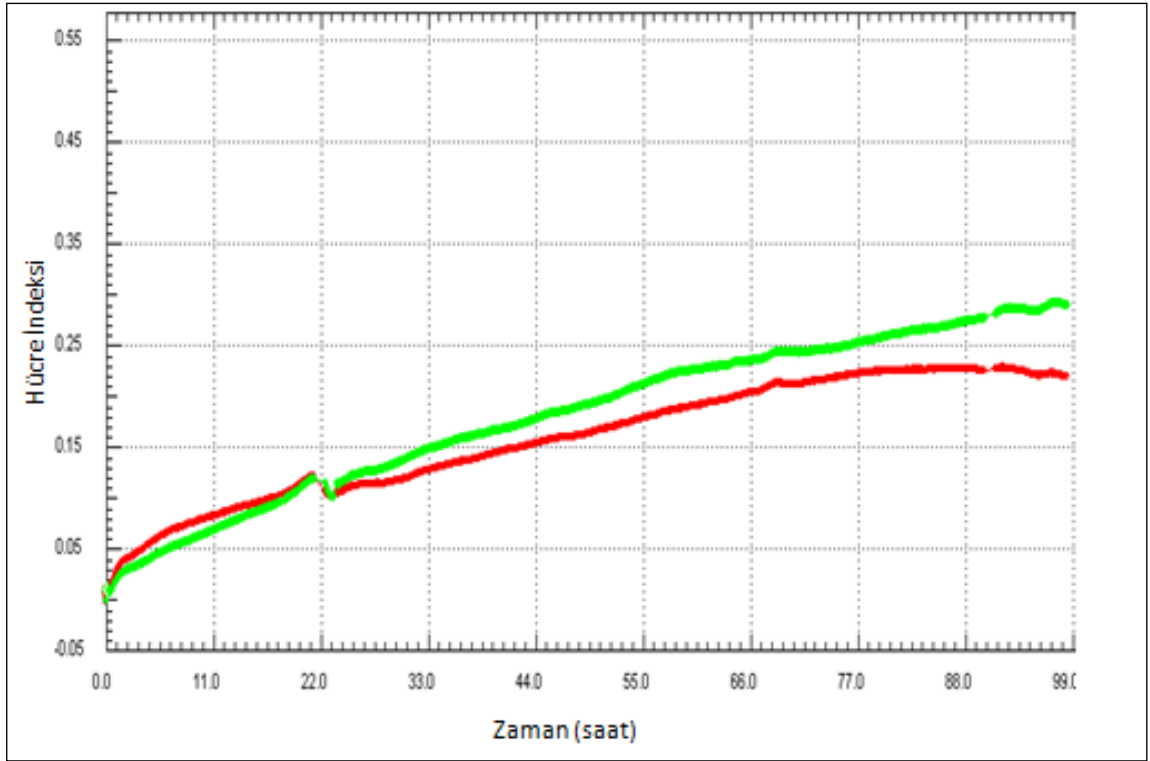
Kitosan nanopartiküller karakterize edildikten ve boyutları belirlendikten sonra Hela hücre hattıyla etkileştirilmiş ve davranışı incelenmiştir. Hela hücre hattıyla etkileştirilen floresan yüklü nanopartiküllerin, hücrelerle etkileştiği hücrelerin içine girdiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.5. de görüldüğü gibi partiküllerin bir çoğu hücrelerin içine girmiş ve floresan mikroskobu altında ışımaya vermiştir. Ayrıca nanopartiküllerin hücre çekirdeğinin içine girmediği ve çoğunlukla sitoplazmada biriktiği görülmüştür.



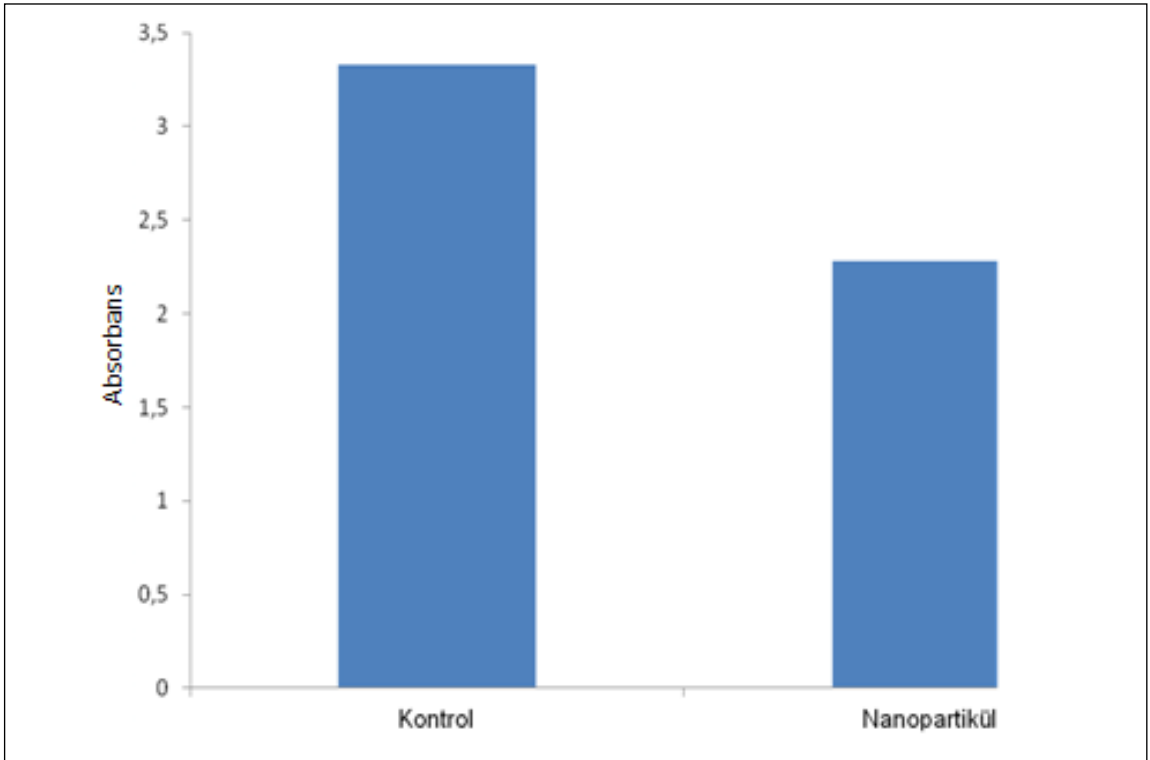
**Şekil 4.7.** Nanopartiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücre hattının 20 kat büyütülmüş floresan mikroskobu görüntüsü

#### **4.3. Hücre Canlılık Testi Sonuçları**

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur. Çalışmadaki RCTA sonuçları ve WST sonuçları genellikle benzer veriler vermiştir. Şekil 4.8. ve şekil 4.9.'a göre iki düzenekte de kontrol grubu ve nanopartikül grubu arasında büyük bir fark gözlemlenmemektedir. Ancak RCTA'nın WST-1 sonuçlarına göre daha kesin sonuçlar verdiği bilinmektedir. Ayrıca, WST-1 sonuçları 72 saat RCTA sonuçları ise 96 saatlik sonuçlardır.

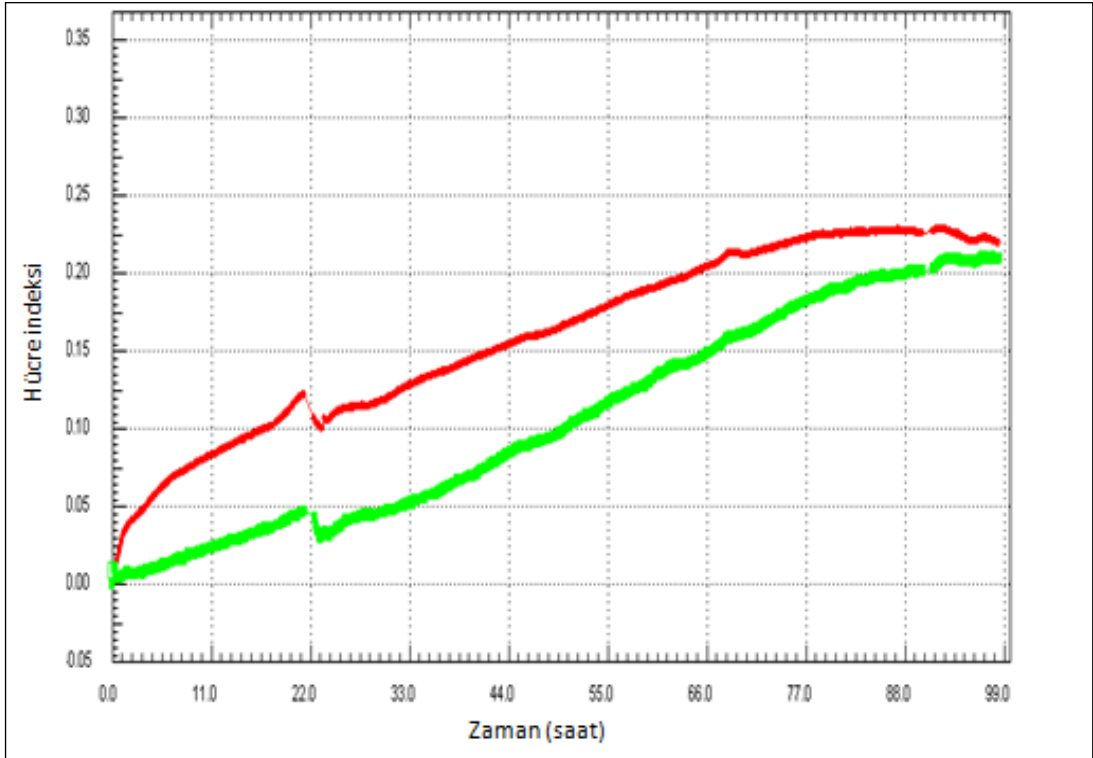


**Şekil 4.8.** Kontrol grubu ve nanopartikül grubu RCTA karşılaştırmalı hücre indeksi grafiği

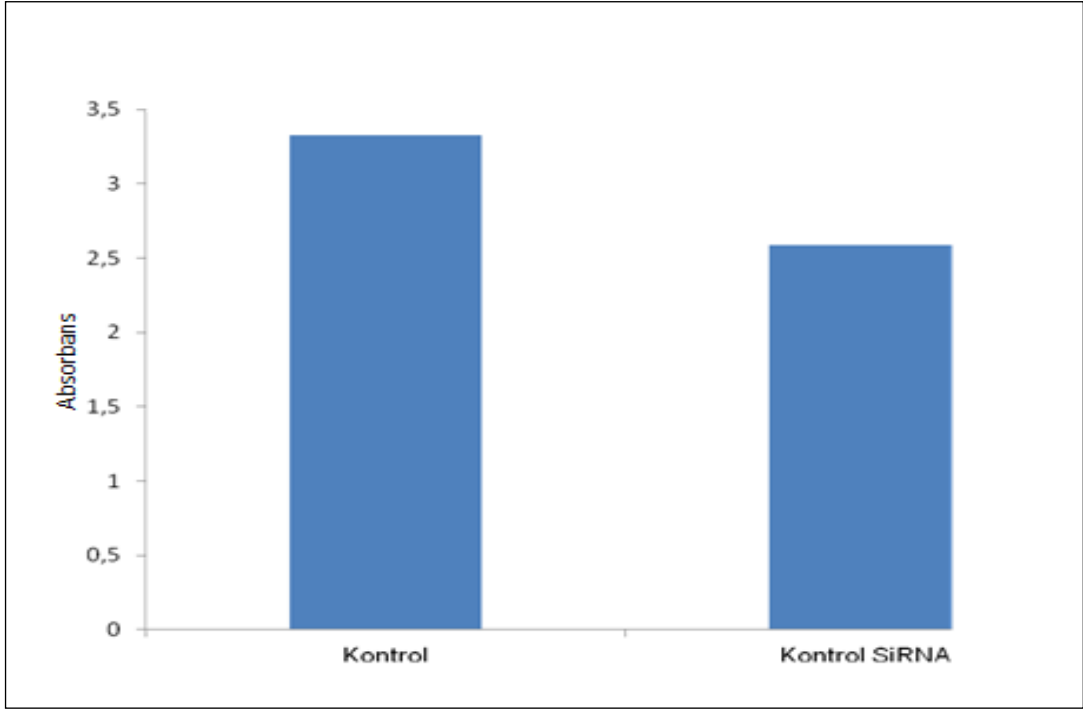


**Şekil 4.9.** Kontrol grubu ve nanopartikül grubu WST-1 sonuçları

Yapılan çalışmada kontrol siRNA uygulanan grup ve kontrol grubunda da benzer şekilde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.'e göre hem WST-1 testi hem de RCTA testleri birbirlerine uyumlu şekilde görünmektedir. Kontrol grubu, kontrol siRNA grubu ve nanopartikül grubunun birbiriyle paralel halde özellikler göstermesi testlerin de birbirini doğruladığını göstermektedir. Ayrıca 2009 yılında 95-D ve NCI-H446 kanser hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, sitotoksikite çalışmaları için MTT testi uygulanmış, kontrol siRNA uygulanan hücreler ve uygulanmayan hücreler kıyaslanmış ve kontrol siRNA uygulanan hücrelerde, hücre büyümesi çok az engellenmiş fakat siRNA uygulanmayan hücrelerle arasında pek fark olmadığı da gözlemlenmiştir [132].



**Şekil 4.10.** Kontrol grubu ve kontrol siRNA grubu RCTA karşılaştırmalı hücre indeksi



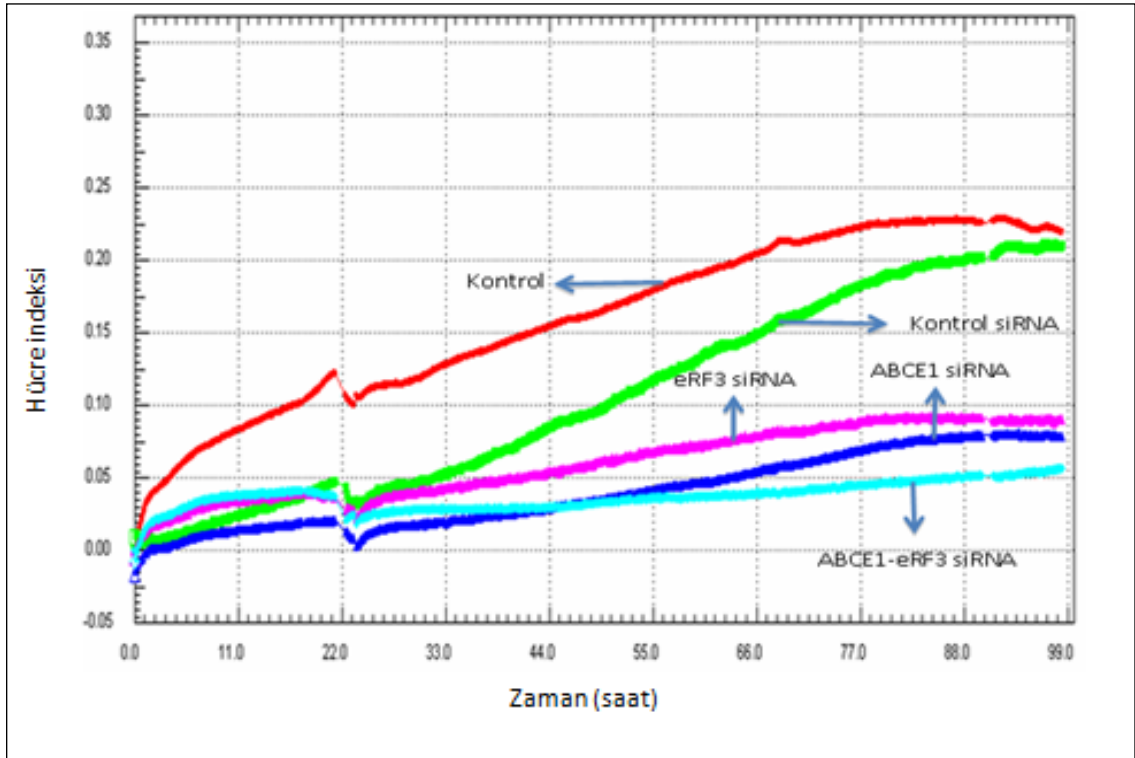
**Şekil 4.11.** Kontrol grubu ve kontrol siRNA grubu WST-1 karşılaştırmalı sonuçları

Hücre çoğalmasına etki göstermesi beklenen ABCE1 ve eRF3'e ait siRNA'ların hücrelere tek tek ve birlikte uygulanmalarının sonuçları ise kanser çalışması açısından ümit vericidir. Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi kontrol grubu ve kontrol siRNA grubuna göre ABCE1 ve eRF3 siRNA'larının tek tek ve birlikte uygulandığı gruplarda hücre çoğalması ciddi bir oranda azalmıştır. Uygulanan 5 pmol miktarındaki siRNA'ların dozajı artırılarak bu çalışmanın tekrarının yapılması, siRNAların etkisi hakkında daha çok bilgi verecektir. Yine de veriler normalize edildiğinde, hücre çoğalması % 85'e kadar azalmaktadır.

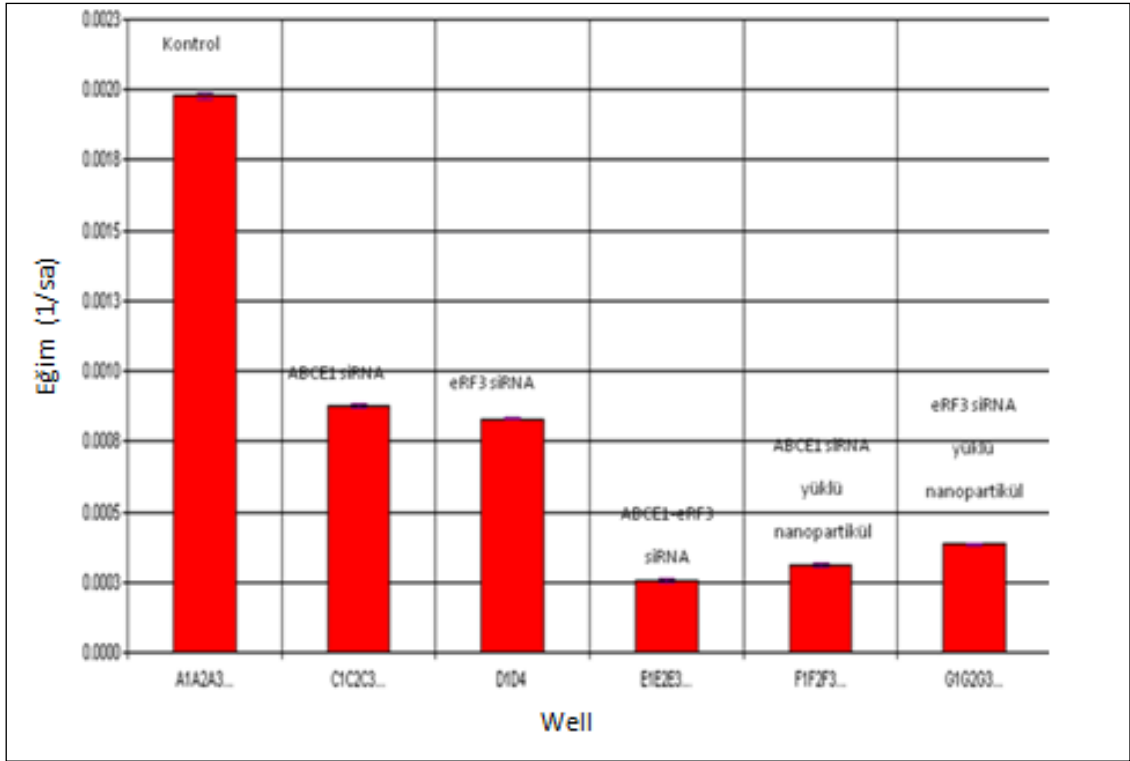
Katas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerle çalışılmış, partiküller karakterize edilmiş, hücredeki aktivitelerine bakılarak sitotoksosite testi yapılmıştır. Yapılan sitotoksosite testi, kitosan nanopartikül uygulanan hücrelerde ciddi bir azalma olmadığını fakat siRNA yüklü nanopartikül uygulanan hücrelerde %18-%40 oranında canlılıkta azalma olduğunu göstermiştir [114]. Başka bir çalışmada ise ABCE1-siRNA'nın, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli ölçüde hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir [132]. 2010 yılında yapılmış bir çalışmada RNA'yı hedefleyen ABCE1-siRNA'nın akciğer kanser hücresi olan NCL-H446 hücre hattı üzerindeki proliferasyonu incelenmiş ve 72 saatlik sitotoksosite testi sonucunda ABCE1-siRNA'nın kanser hücrelerini %60-%70 oranında inhibe ettiği görülmüştür [155]. Kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında ise ABCE1 proteinini ciddi oranda baskıladığı da çalışmanın sonuçlarında yer almaktadır [155]. ABCE1 proteini, ribozomal alt birim ve ribozomal üst birimin bağlanması ve ayrılmasında dolayısıyla da protein sentezinin sonlandırılmasında rol oynamaktadır bunun sonucunda da ABCE1 'in baskılanması ile protein sentezinde yavaşlama veya durma gerçekleşecek böylece de tümörlü hücrelerin de çoğalması engellenmiş olacaktır.

Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 kullanılarak CXCR4 gen ekspresyonunun azaltılmasını hedefleyen bir çalışmada, iki farklı siRNA kullanılmıştır ve bu siRNA'lerin hem tek tek hem de ikisi aynı anda hücreye verilerek kanser hücreleri üzerindeki etkilerine hem in vivo hem de in vitro ortamda bakılmıştır [156]. İki farklı siRNA aynı anda hücreye uygulandığında, tek tek uygulanan siRNA'lara göre mRNA ve protein seviyesinde kanser hücrelerinde CXCR4 ekspresyonunun baskılanmasında çok daha etkili olmuştur [156]. Bu da kanser hücreleri için hedeflenmiş geni susturacak farklı siRNA'ların birlikte uygulandığında tez kapsamında sunulan çalışmada olduğu gibi daha etkili olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.12.** Kontrol, Kontrol siRNA, eRF3 siRNA, ABCE1 siRNA ve ABCE1-eRF3 siRNA gruplarının karşılaştırmalı RCTA hücre indeksi sonuçları



**Şekil 4.13.** Hücre çoğalma eğrilerinin zamana göre grafiklerinden elde edilen eğimler

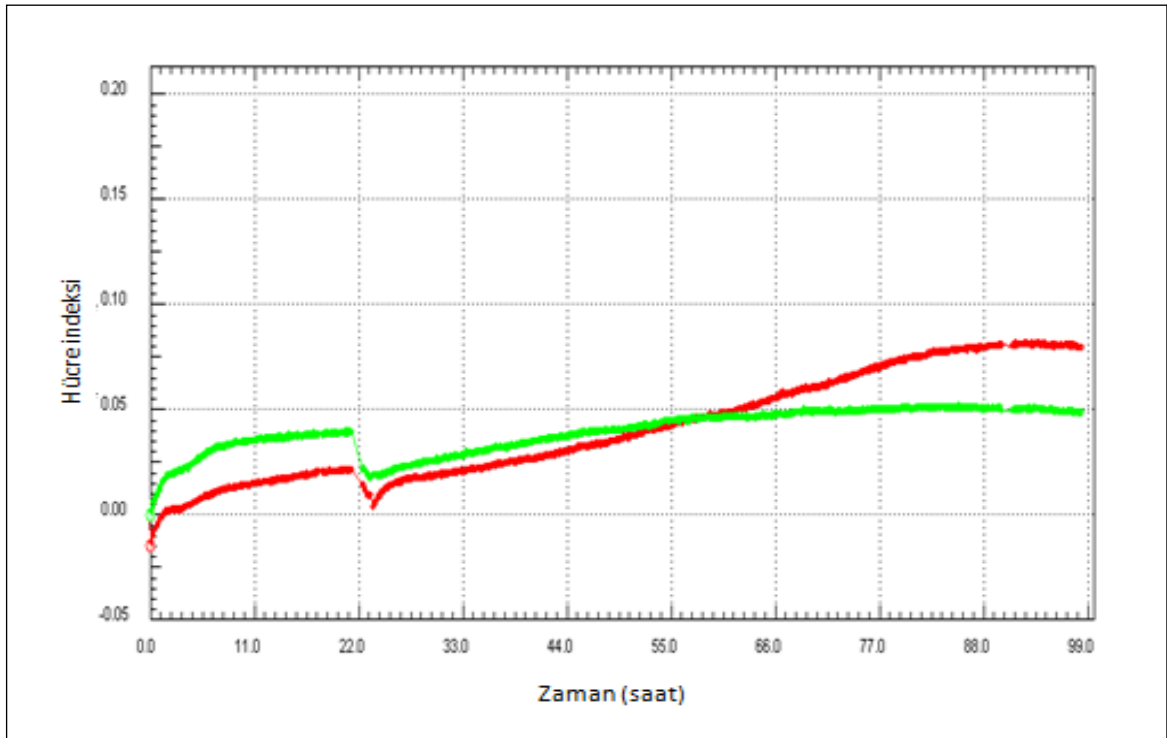
Çalışma sonucunda Şekil 4.13.'e göre elde edilen hücre çoğalma eğrilerinin eğimleri alındığında hücre çoğalma miktarları hakkında bir bilgi vermektedir. Kontrol grubuna göre, siRNA verilen tüm gruplar daha az çoğalmıştır. Hatta bu oran ABCE1 ve eRF3'ün birlikte uygulandığı noktada %85'e kadar çıkmıştır. Bunun ötesinde siRNA uygulamak için tasarlanan nanopartiküllerle transfeksiyonun çok daha arttığı görülmektedir. Benzer şekilde RTCA sonuçlarına bakıldığında Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi serbest siRNAlar uygulandığında hemen etki göstermiş ancak dördüncü güne doğru etkilerini kaybetmişlerdir. Öte yandan, nanopartikülle birlikte verilen siRNA'ların etkileri kontrollü salım özelliklerine uygun şekilde ilerlemiştir.

PC-3 tümör hücrelerinde VEGF'yi hedefleyerek yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, partiküle yüklenmiş VEGF-siRNA misellerinin, partiküle yüklenmemiş VEGF-siRNA misellerine göre tümör hücrelerini çok daha fazla inhibe ettiği gözlemlenmiştir [157]. Tez kapsamında yapılan çalışmada da nanopartiküle yüklenmiş siRNA ile yapılan hücre canlılık testinin kanser hücrelerini daha fazla inhibe ettiğini göstermektedir. Çalışmanın sonucu literatürü doğrular niteliktedir.

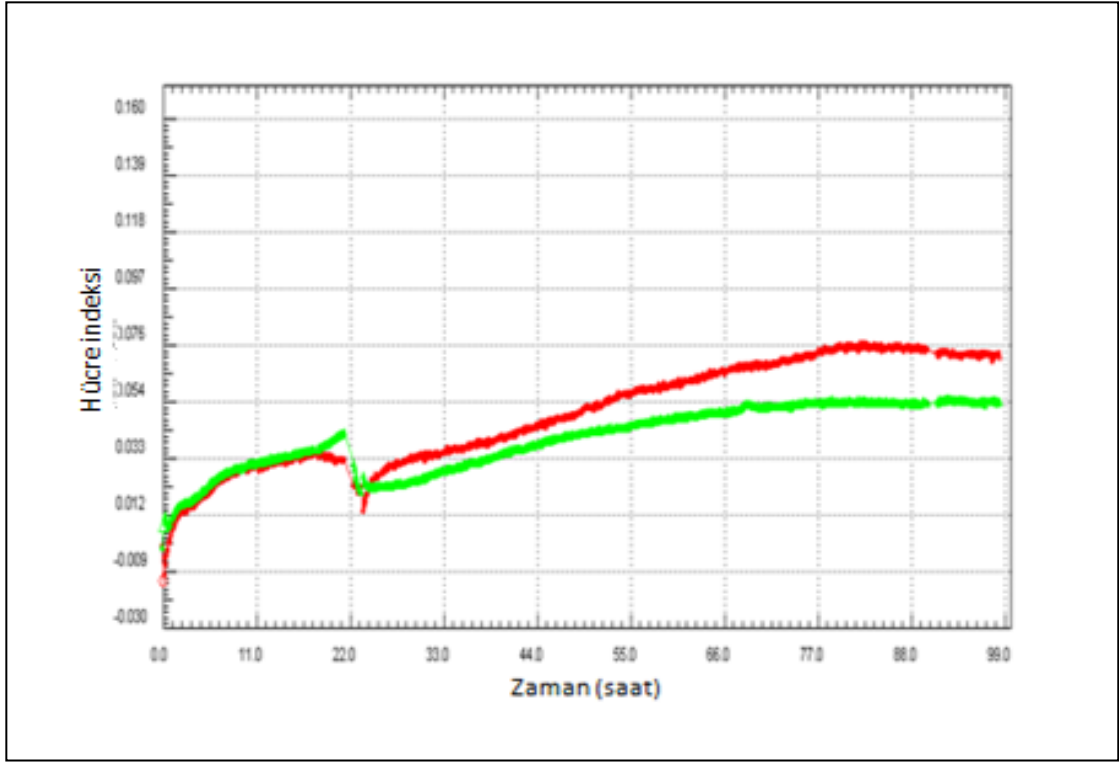


ABCE1 ve eRF3 siRNA'nın birlikte uygulanması sonucu ise çok daha fazla kanser hücresi inhibe olmaktadır. eRF3 ve ABCE1 proteinleri, protein sentezinin translasyon basamağında önemli bir yere sahiptir ve protein sentezinin sonlandırılmasında görev almaktadır. Tümör hücreleri sağlıklı hücelere göre çok daha fazla kapasitede protein translasyonuna sahiptir o yüzden eRF3 ve ABCE1 proteinleri kanserli hücrelerde çok daha fazla üretilmektedir bu yüzden ABCE1-eRF3 siRNA'nın hücreye verilmesi sonucu kanser hücrelerinin çoğalması çok daha fazla engellenmiş olmaktadır.

Ribozomal A bölgesine bağlanan eRF3 proteinin görevi, protein sentezinin translasyonun etkinliğini artırmak ve durdurucu kodonları tanımak ve peptidil transferaz bölgesine transfer etmektir. Chauvin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, eRF3 proteininin siRNA ile susturulması sonucu durdurucu kodonlarda artış görülmüş bununla translasyon uzama basamağının etkinliğini azalttığı gözlemlenmiştir [158].

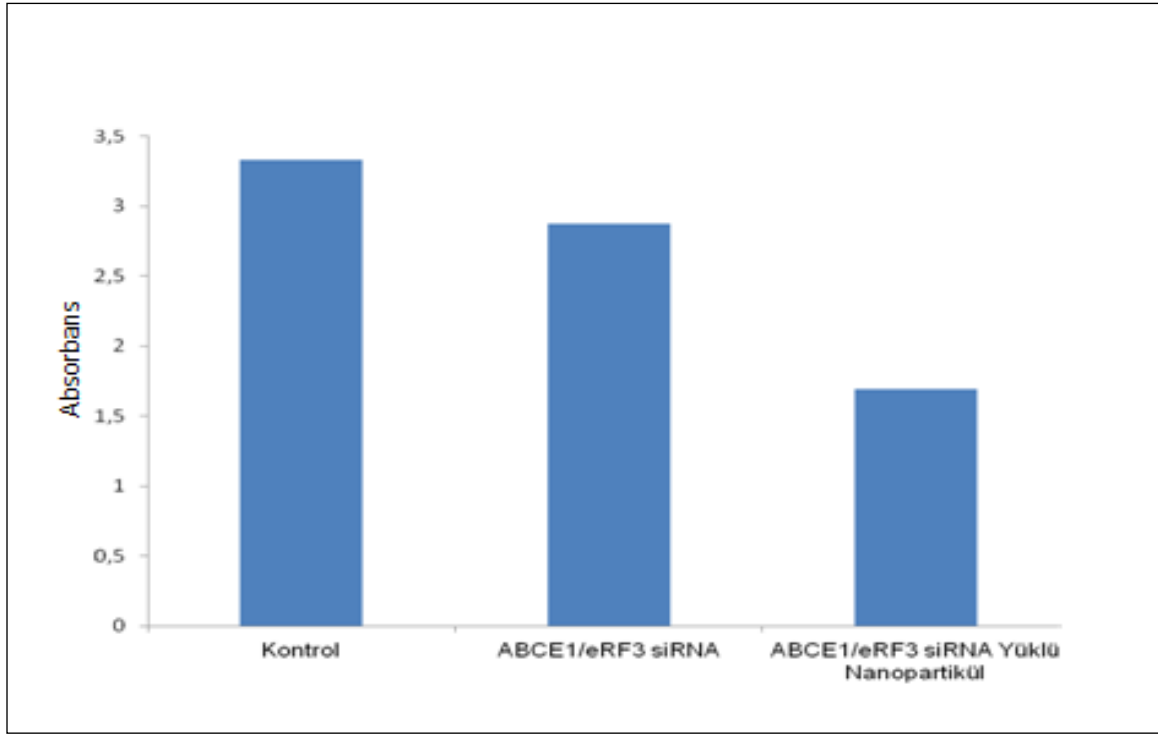


**Şekil 4.14.** ABCE1 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş ABCE1 siRNA'nın hücre çoğalması üzerine etkileri



**Şekil 4.15.** eRF3 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş eRF3 siRNA'nın hücre çoğalması üzerine etkileri

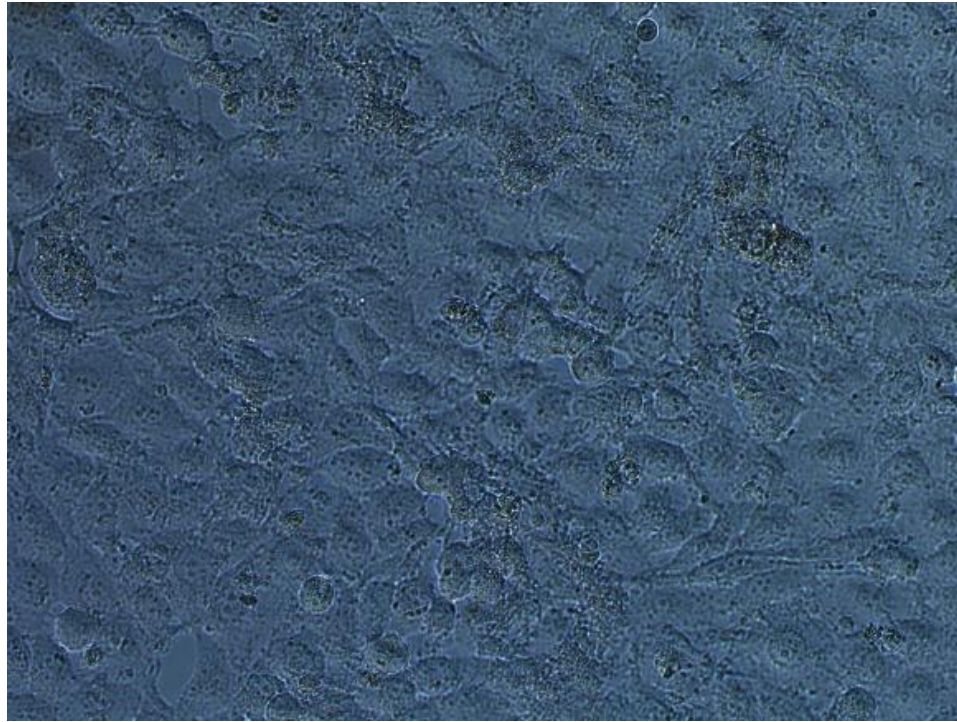
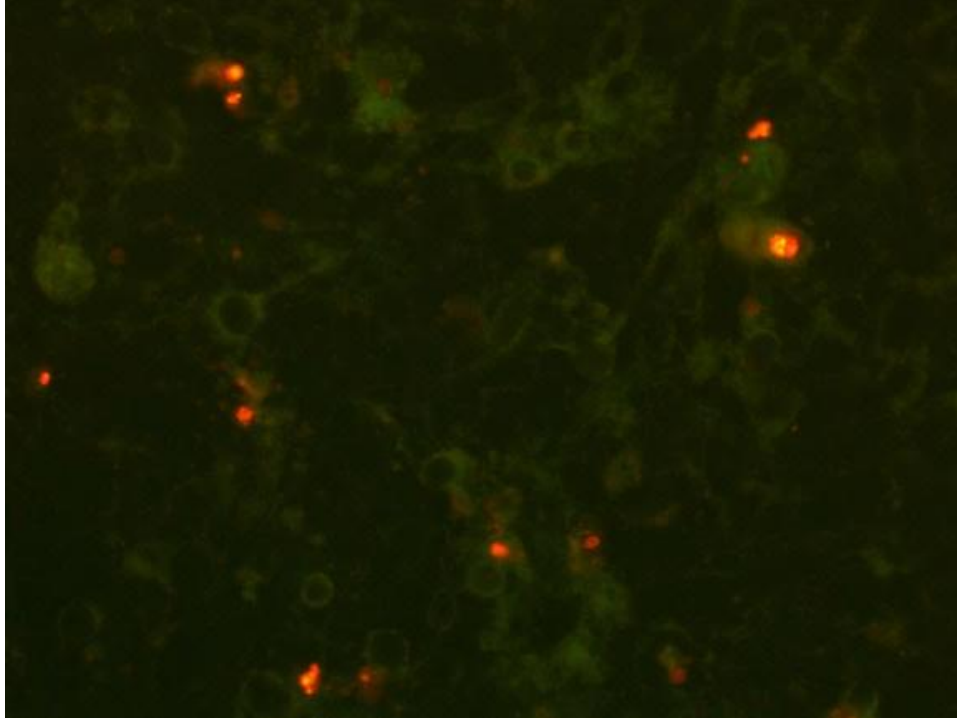
Nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-eRF3 siRNA'nın, nanopartiküle yüklenmemiş ABCE1-eRF3 siRNA'ya göre hücre çoğalmasında ki artışı daha fazla inhibe ettiği Şekil 4.16.'da görülmektedir. ABCE1-siRNA'nın ve eRF3-siRNA'nın daha önceki yapılmış olan çalışmalarda kanser hücreleri sayısındaki artışı düşürdüğü, nanopartiküle yüklenmiş siRNA'nın da hücreyle etkileştiğinde nanopartikül yüklenmemiş siRNA'ya oranla hücreleri daha fazla inhibe ettiği gözlemlenmiştir [157-158]. Bu çalışmalardan yola çıkarak hem ABCE1-siRNA hem de eRF3-siRNA yüklenmiş kitosan nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkinliğinin yani hücre çoğalmasındaki artışı inhibe etmesinin daha çok olması beklenmiştir ve sonuçlar da bunu doğrulamıştır.



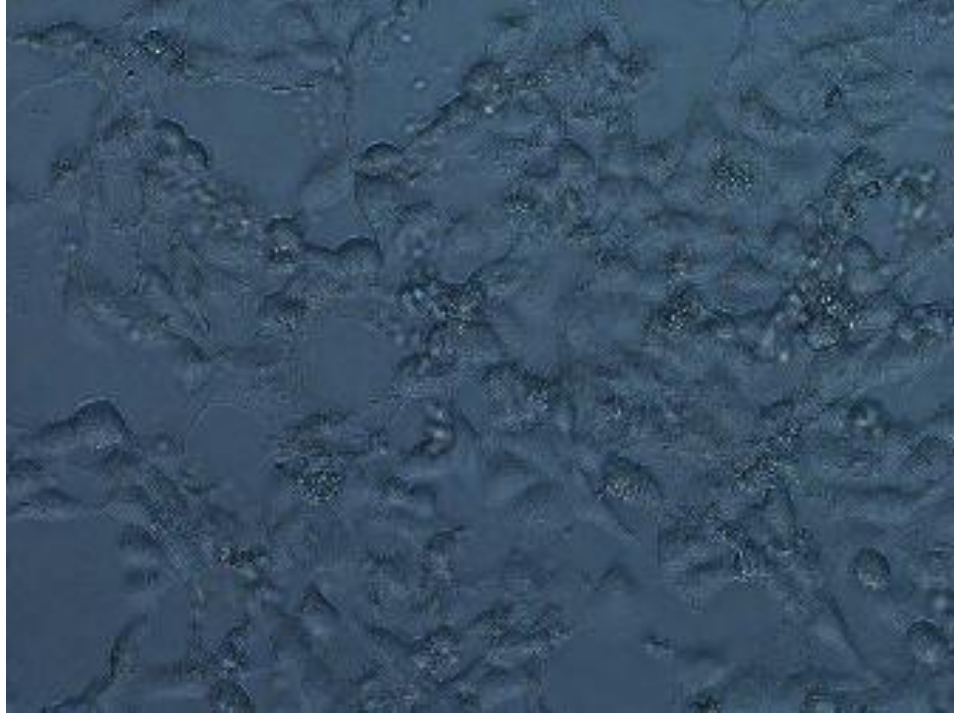
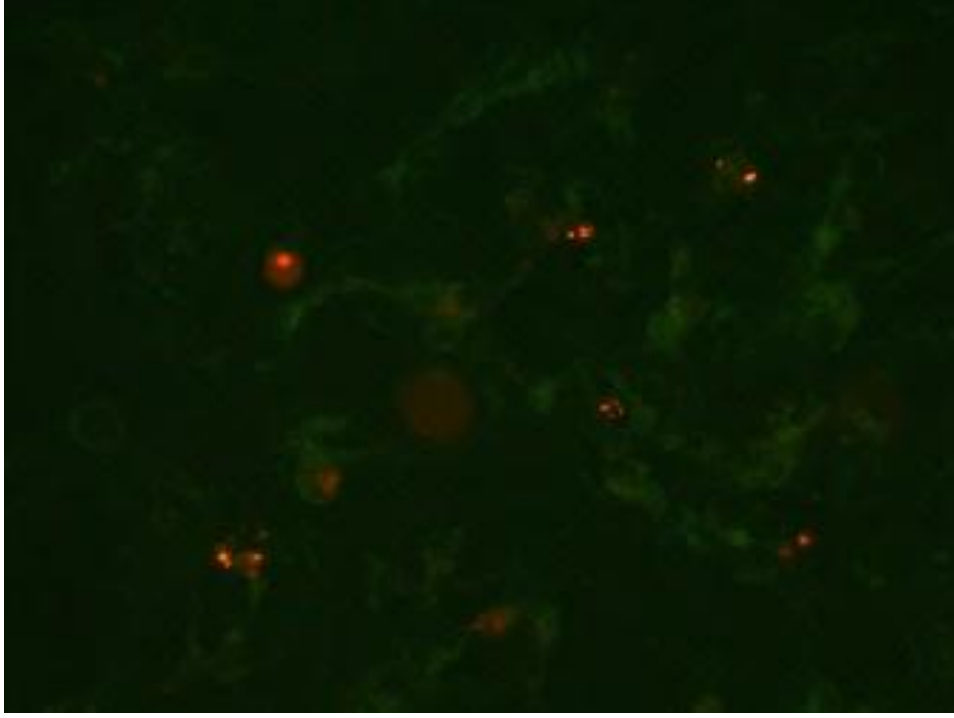
**Şekil 4.16.** Kontrol grubu, ABCE1-eRF3 siRNA ve nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-eRF3 siRNA WST-1 karşılaştırmalı sonuçları

#### 4.4. Apoptoz/Nekroz Sonuçları

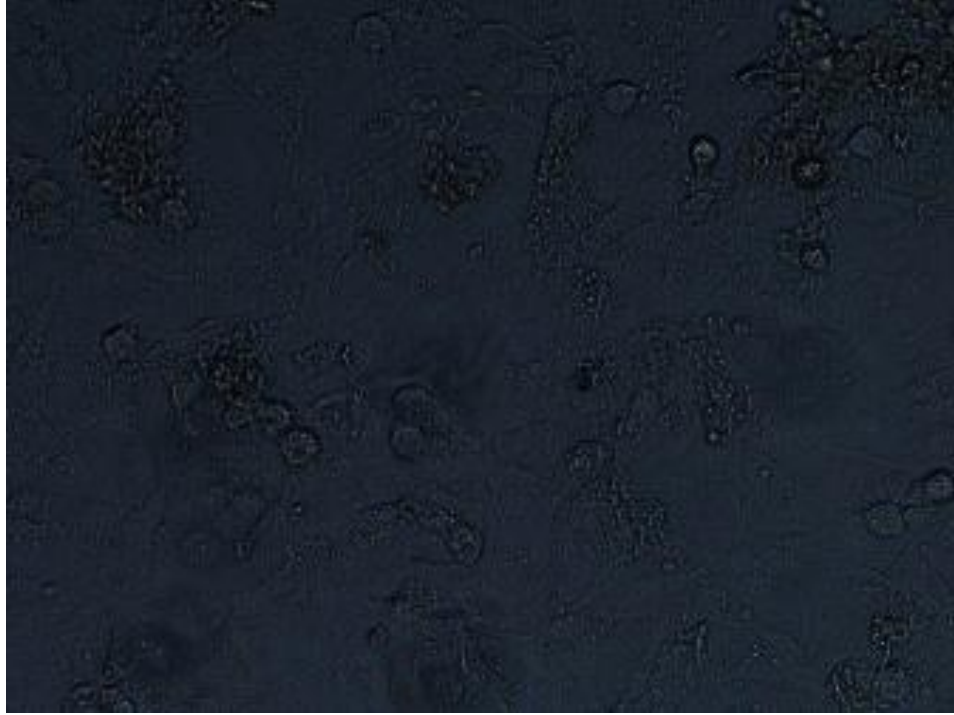
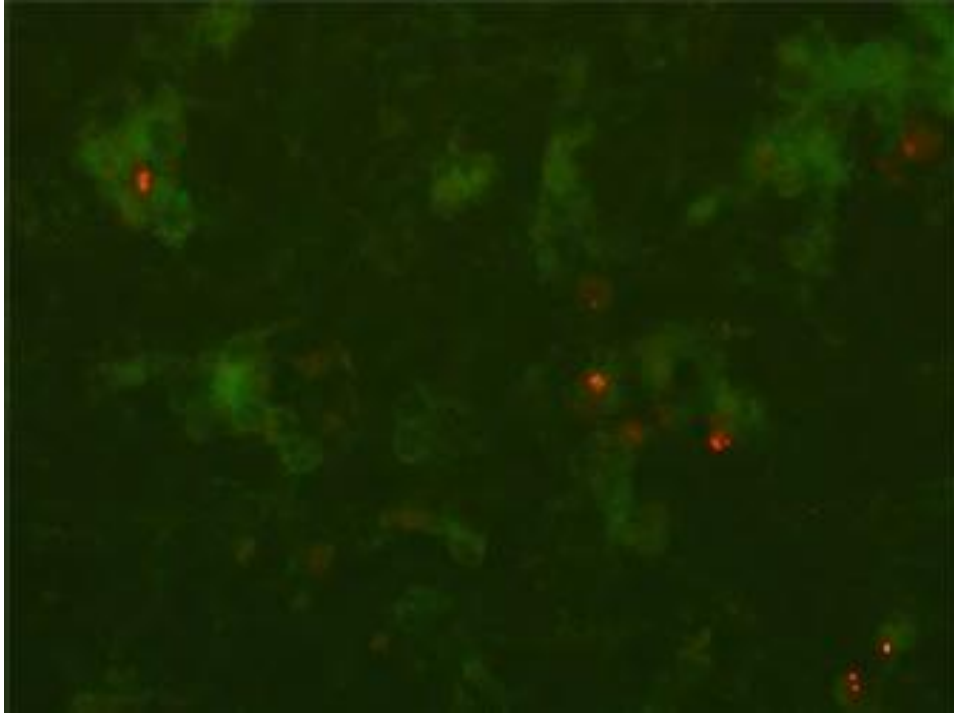
Sunulan tez çalışmaları kapsamında, ABCE1 ve eRF3 proteinlerinin siRNA'ları ile (ve bunların nanopartiküllere yüklenmiş formları) MCF7 hücreleri ile etkileştirilip ikili boyama yöntemi ile boyanmış ve hücre etkileşimleri apoptotik-nekrotik mekanizmaların değerlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Bu amaçla sırasıyla serbest eRF3 ve ABCE1 siRNA (ve bunların bir arada verildiği uygulama), kitosan nanopartiküllere yüklenmiş erf3 ve ABCE1 siRNA (ve bunların birlikte yüklenmiş formu) ile herhangi bir molekül yüklenmemiş kitosan nanopartiküllerin boyama sonrası elde edilen mikroskop fotoğrafları Şekil 4.17.- Şekil 4.24.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.17.** MCF-7 hücrelerine eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri

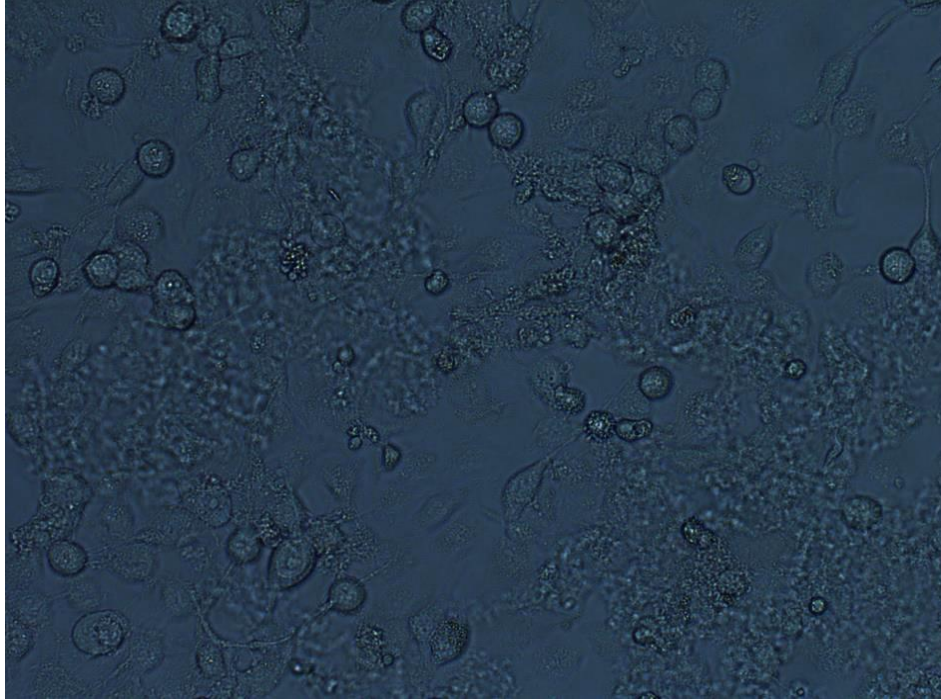
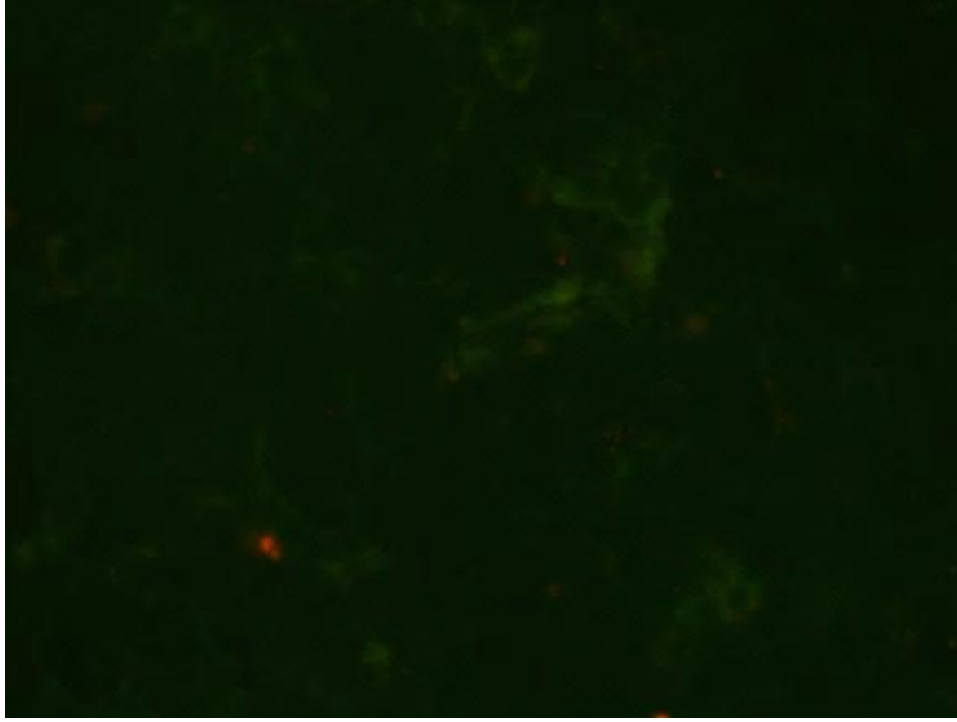


**Şekil 4.18.** MCF-7 hücrelerine ABCE1-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri

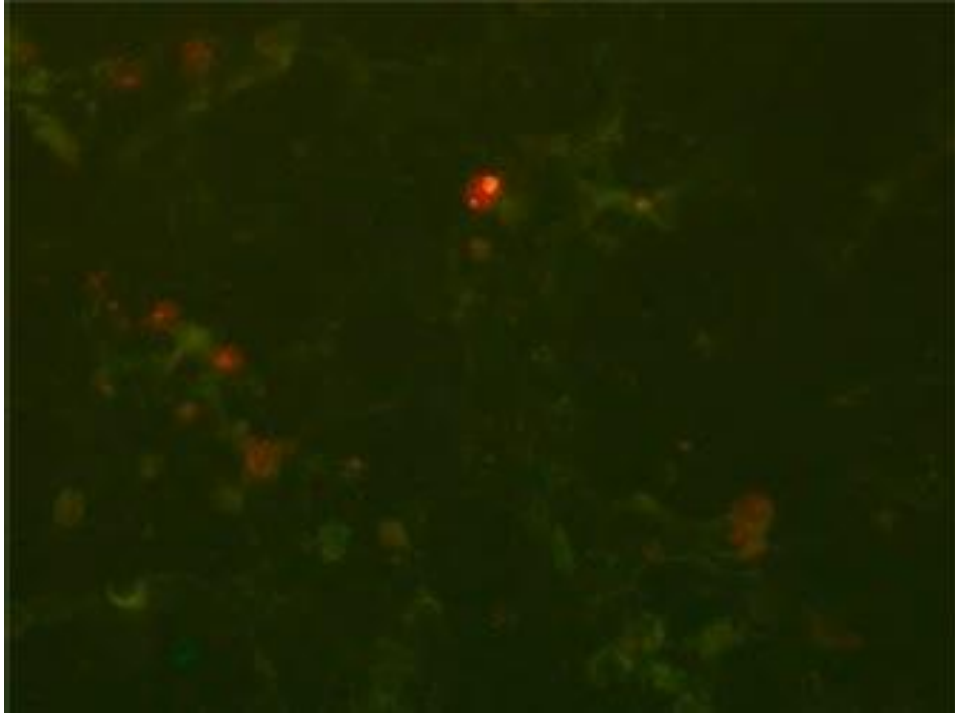


**Şekil 4.19.** MCF-7 hücrelerine eRF3-ABCE1 siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri



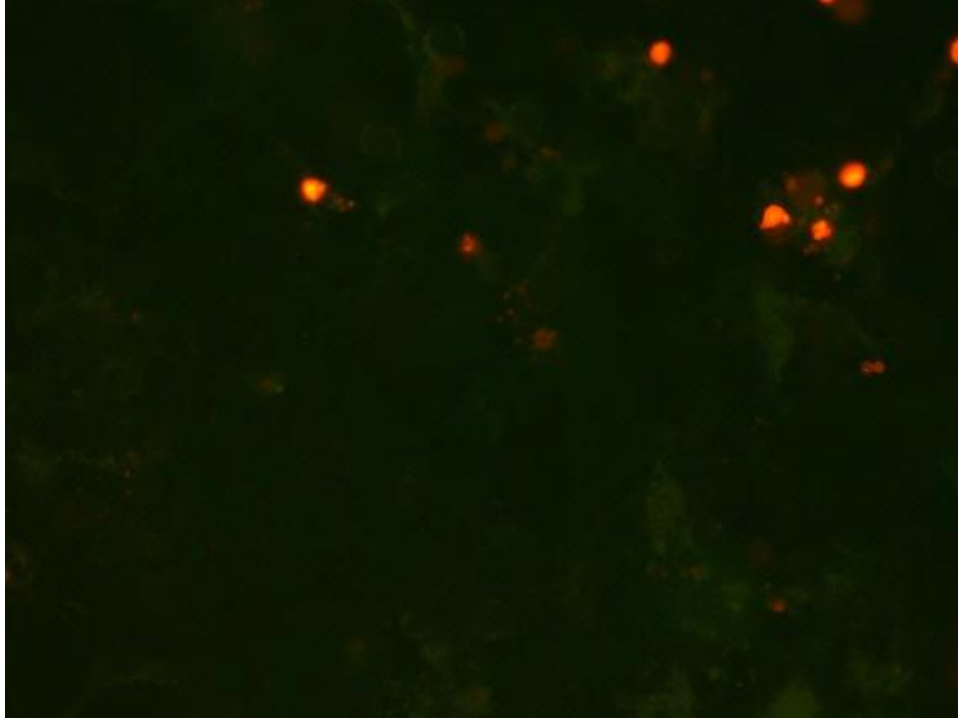


**Şekil 4.20.** MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri

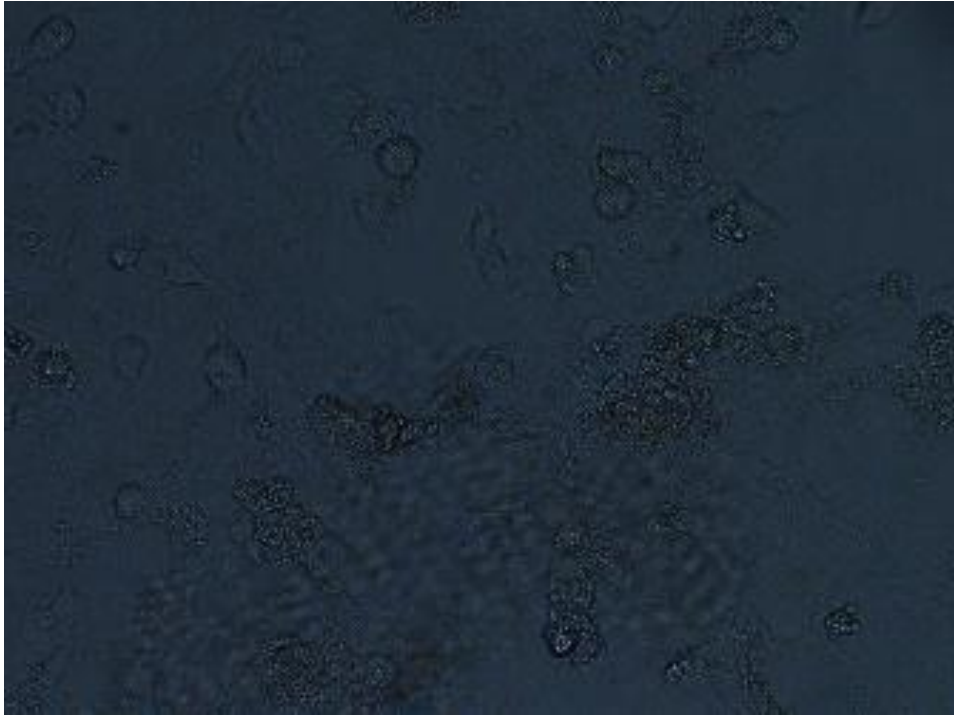


**Şekil 4.21.** MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri

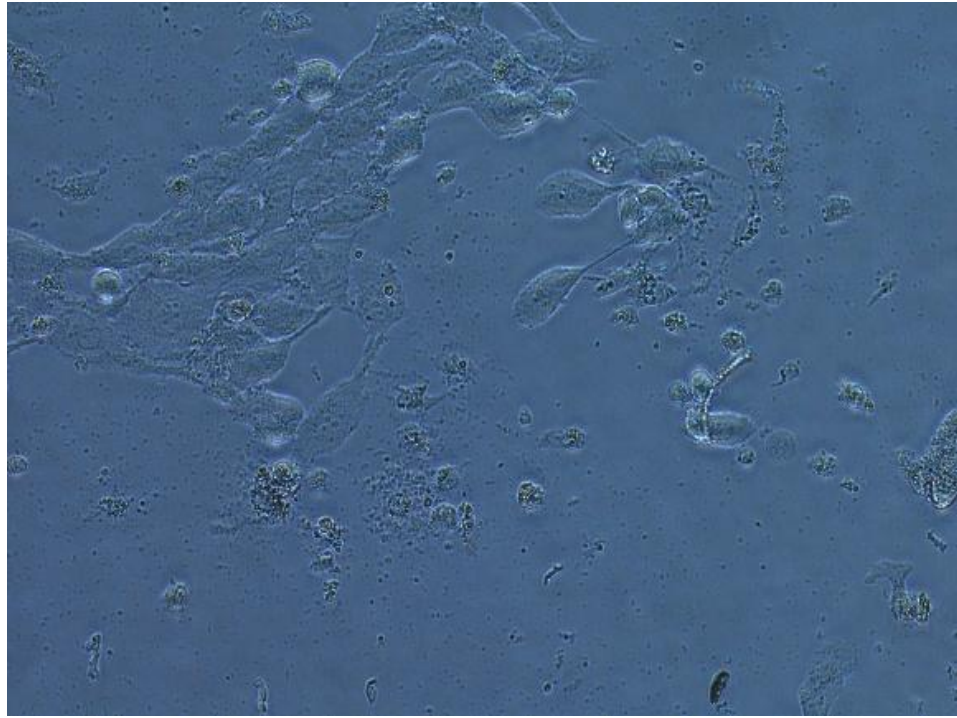
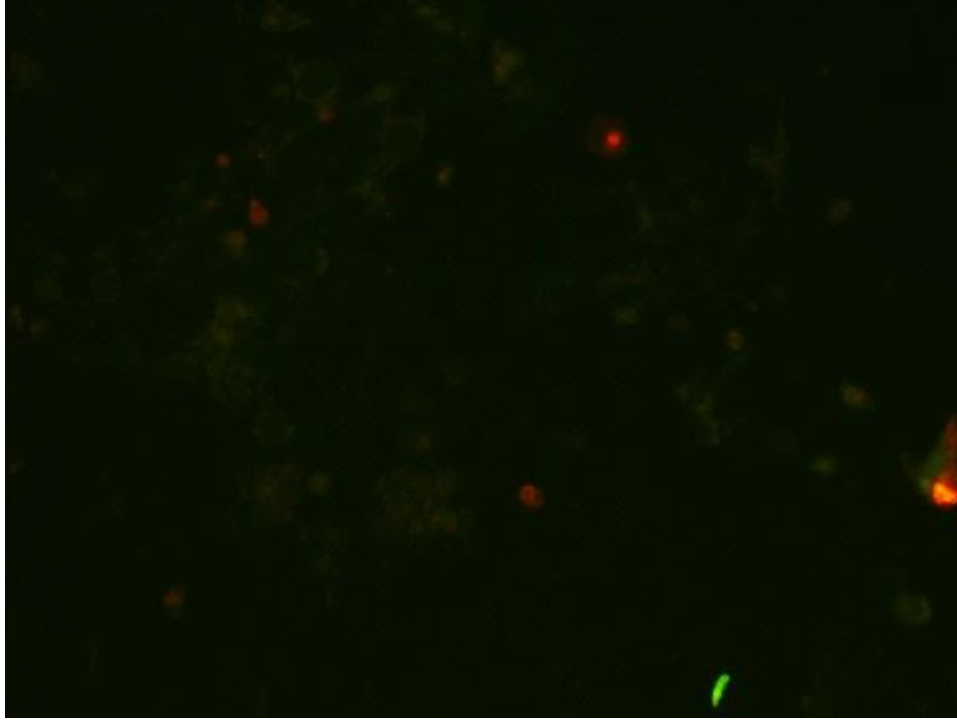




**Şekil 4.22.** MCF-7 hücrelerine nanopartiküle yüklenmiş ABCE1-eRF3-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri



**Şekil 4.23.** MCF-7 hücrelerine kitosan nanopartikül uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri



**Şekil 4.24.** MCF-7 hücrelerine kontrol-siRNA uygulandıktan sonra ikili boyama ile elde edilen apoptoz-nekroz görüntüleri

Yapılan çalışmalarının tamamında hücre etkileşimlerinin 48. saatinde elde edilen bulgulara yer verilmiştir. Bu bağlamda daha önceki bölümlerde özetlendiği gibi (RCTA ve WST1 bulguları ile ilgili açıklamalar) serbest siRNA uygulamalarının nanopartikülle birlikte yapılan uygulamalardan daha az etkin olması beklenmektedir. Oysa apoptoz ve nekroz değerlendirmelerinin yapıldığı zamanlamanın süreç itibarıyla serbest siRNA'nın daha etkin olduğu zamana karşılık geldiği anlaşılmaktadır. Söz konusu değerlendirmenin daha sonraki zamanlarda yapılması durumunda doğal etkenler nedeniyle sağlıklı değerlendirmeler yapılamayacağı düşünüldüğünden çalışmalar bu şekilde gerçekleştirilmiştir. Öte yandan elde edilen mikroskop görüntüleri genel olarak değerlendirildiğinde serbest siRNA çalışmalarında bağıl olarak daha fazla nekrotik etkinin meydana geldiği (özellikle karışım durumunda), nanopartikül ile birlikte siRNA uygulamalarında bu etkinin nispeten daha az olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.17.- Şekil 4.22.). Ayrıca serbest siRNA ve nanopartikül ile birlikte yapılan karışım uygulamalarında da benzer sonuçlar dikkat çekmekte (Şekil 4.19., Şekil 4.22.) ve bu uygulamaların tamamında apoptotik etkinin baskınlığı net olarak görünmektedir. Bunun yanı sıra kontrol siRNA grubu ve nanopartikeller ile yapılan çalışmalardan elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında nanopartiküllerin çok daha düşük bir nekrotik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.23., Şekil 4.24.).

## 5. SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında ki tüm çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ve bulguların ışığı altında ortaya konulan sonuç özetleri aşağıda sunulmuştur.

- İlk olarak kitosan nanopartiküller iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmış ve boy-boy ve yük dağılımına etki eden hazırlama ortam pH'ı ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu değiştirilerek siRNA uygulaması için hedeflenen en uygun kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.
- Kitosan nanopartiküllerin boyut analizi için zeta boyut analiz cihazı kullanılmış, optimizasyon çalışmaları sonucunda en küçük partikül boyutu 114 nm bulunmuştur.
- Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artmasıyla partikül boyutunun küçüldüğü ve daha az pozitif yükle yüklendiği tespit edilmiştir. siRNA çalışmasında kullanacağımız partiküllerin boyutunun küçük ve daha pozitif yükle yüklenmesini istediğimiz için en uygun çapraz bağlayıcı konsantrasyonu %0,25 (w/v) olarak seçilmiştir.
- Ortam pH'ının, partikül boyutunda ve yükünde değişiklikler yaptığı gözlemlenmiş ve kitosan nanopartikül için en uygun pH 4,5 seçilmiştir.
- Kitosan nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonları ise AFM ve SEM kullanılarak yapılmıştır. Morfolojik incelemeler sonucunda partiküllerin küresel yapıya sahip oldukları belirlenmiştir.
- Elde edilen AFM ve SEM görüntülerine göre de kitosan nanopartiküllerin boyutları değerlendirilmiştir. AFM ve SEM' de alınan görüntüler partiküllerin boyutunun 40-80 nm arasında olduğunu göstermektedir.
- Kitosan nanopartiküller hücre ile etkileştirilmiş ve hücre içine girdiği ve daha çok sitoplazmada biriktiği floresan mikroskobu ile elde edilen görüntülerde görülmüştür.
- Hücre canlılık testi için meme kanser hücre hattı olan MCF-7 seçilmiştir. Sitotoksikite testi için WST-1 metodu seçilmiş ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) kullanılarak birbirlerini doğrulayan grafikler elde edilmiştir.

- Hücre canlılık testi için kontrol grubu olarak medium kullanılmış. Karşılaştırma yapabilmek ve etkilerini görebilmek için MCF-7 hücrelerine boş nanopartikül, kontrol siRNA ve siRNA yüklenmiş nanopartikül ayrı ayrı eklenmiştir. Well'de ki diğer hücelere de farklı miktarlarda ABCE1 siRNA, eRF3 siRNA, ABCE1-eRF3 siRNA ile bunların nanopartiküle yüklenmiş halleri eklenmiştir. Kontrol ve nanopartikül grubu arasında çok fazla bir fark gözlemlenmemiş, kitosan nanopartiküllerin hücrelerde toksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.
- ABCE1 ve eRF3 proteinlerinin protein sentezinin translasyon basamağında önemli bir yer tuttuğu ve bunların inhibe edilerek hücre çoğalmasını azalttığı tespit edilmiştir.
- ABCE1 siRNA yüklenmiş nanopartiküller kanser hücrelerine uygulandıklarında, kontrol siRNA ve ABCE1-siRNA uygulanan hücelere göre hücre çoğalmasını daha fazla azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde eRF3 siRNA yüklenmiş nanopartiküller kanser hücelere uygulandıklarında, kontrol siRNA ve eRF3-siRNA uygulanan hücelere göre hücre çoğalmasını daha fazla azalttığı gözlemlenmiştir. ABCE1-siRNA ve eRF3-siRNA'nın etkinliğinde ciddi oranda bir fark gözükmemektedir.
- ABCE1 siRNA, eRF3 siRNA karıştırılarak hücreye verilmiş ve tek tek hücreye verilmelerine göre daha fazla sitotoksik etki yarattığı gözlemlenmiştir. İkisinin karıştırılıp nanopartiküle yüklenmesiyle hücre canlılığında ki artış daha da azalmıştır.
- Hücre ölümlerinin morfolojik olarak değerlendirilmesi için ABCE1 ve eRF3 proteinlerinin siRNA'ları ile (ve bunların nanopartiküllere yüklenmiş formları) MCF7 hüceleri ile etkileştirilip, Annexin V ve Propidium İyodid kullanılarak ikili boyama yöntemi ile boyanmış ve hücre etkileşimleri apoptotik-nekrotik mekanizmaların değerlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir.
- Apoptoz/nekroz sonuçları değerlendirildiğinde eRF3-siRNA ve ABCE1-siRNA'nın hüceler üzerinde nekrotik etkinin, nanopartiküle yüklenmiş formlarında ise apoptotik etkinin daha baskın olduğu gözlemlenmiştir.

- Apoptoz/nekroz sonuçları nanaopartiküllerin çok düşük oranda nekrotik etkilerinin olduğunu göstermektedir.
- Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında, siRNA yüklenmiş kitosan nanopartiküller ile ABCE1 ve eRF3 proteinleri inhibe edilerek meme kanseri tedavisi çalışmalarına katkıda bulunacak sonuçlar elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Ruddon R.W., *Cancer Biology*, 4<sup>th</sup> ed., Oxford University Press, New York, 3-5, **2007**.
- [2] Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D., Global cancer statistics, *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 61, 2, 69-90, **2011**.  
12-Rao S.B., Sharma C.P., Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential, *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 1, 21-28, **1997**.
- [3] Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., Estimating The World Cancer Burden: Globocan 2000, *International Journal of Cancer*, 94, 153-156, **2001**.
- [4] Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C., Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21, *Science*, 250, 4988, 1684-9, **1990**.
- [5] Akyol H., *Kemoterapinin Temel İlkeleri*, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, 59-163, **2004**.
- [6] Chu E., DeVita V.T., *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual*, Jones and Bartlett Publishers, Canada, 1-7, **2010**.
- [7] Brannon-Peppas L., Blanchette J.O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 11, 1649-59, **2004**.
- [8] Varma C., Molecular targeted therapy: cancer therapy of the future, *International Journal of Medicine and Molecular Medicine*, 3, 6, **2012**.
- [9] Hannon G.J., RNA interference, *Nature*, 418, 244-251, **2002**.
- [10] Huang C., Li M., Chen C., Yao Q., Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12, 5, 637-645, **2008**.
- [11] Hoppe-Seiler F., Chitin and chitosan, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27, 3329-3331, **1994**.
- [12] Horsman M.R., Overgaard J., Hyperthermia: A potent enhancer of radiotherapy, *Clinical Oncology*, 19, 6, 418-426, **2007**.
- [13] Illum L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharmaceutical Research*, 15, 9, 1326-1331, **1998**.
- [14] Kumar M.N.V.R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1, 1-27, **2000**.
- [15] Adjei A.A., Rowinsky E.K., Novel anticancer agents in clinical developments *Cancer Biology & Therapy*, 2, 0-10, **2003**.
- [16] James N., *Cancer: A very short introduction*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press, New York, 23-25, **2011**.
- [17] Tan M.L., Choong P.F., Dass CR., Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1, 3-12, **2009**.



- [18] Yarbro C. H., Frogge M. H., Goodman M., *Cancer nursing : Principles And Practice*, 7<sup>th</sup> ed., Jones and Bartlett Publishers, Boston, 6-9, **2005**.
- [19] Grdl F., Ademoğlu E., *Biyokimya*, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 541-863, **2006**.
- [20] Ko A.H., Dolinger M., Rosenbaum E.H., *Everyone's Guide To Cancer Therapy*, 5<sup>th</sup> ed., Andrews McMeel Universal Company, Missouri, 17-31, **2008**.
- [21] Sherman C.D., *Klinik Onkoloji*, 5. Baskı Cerrahi, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı ile Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, Ankara, 106-111, **1992**.
- [22] Balch C.M., The surgeon's expanded role in cancer care, *Cancer*, 65, 3, 9-604, **1990**.
- [23] Sim I.W., Tse L.F., Ek E.T., Powell G.J., Choong P.F., Salvaging the limb salvage: management of complications following endoprosthetic reconstruction for tumours around the knee, *European Journal of Surgical Oncology*, 33, 6, 796-802, **2007**.
- [24] Davis A.M., Devlin M., Griffin A.M., Wunder J.S., Bell R.S., Functional outcome in amputation versus limb sparing of patients with lower extremity sarcoma: A matched case-control study, *Archives Of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80, 6, 615-618, **1999**.
- [25] Delaney G., Jacob S., Featherstone C., Barton M., The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer*, 104, 6, 1129-1137, **2005**.
- [26] Begg A.C., Stewart F.A., Vens C., 2011, Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs, *Nature Reviews Cancer*, 11, 4, 239-253, **2011**.
- [27] Stone H.B., Coleman C.N., Anscher M.S., and McBride W.H., Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms, *The Lancet Oncology*, 4, 9, p:529-536, **2003**.
- [28] Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K., Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, *International Journal Medical Sciences*, 9, 3, 193-199, **2012**.
- [29] Jackson S. P., Bartek J., The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, 461, 1071-1078, **2009**.
- [30] Kastan M. B., DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture, *Molecular Cancer Research*, 6, 517-524, **2008**.
- [31] Terasawa T., Dvorak T., Ip S., Raman G., Lau J., Trikalinos T.A., Systematic review: charged-particle radiation therapy for cancer, *Annals of International Medicine*, 151, 8, 556-565, **2009**.
- [32] Skeel R.T., Khleif S.N., *Handbook Of Cancer Chemotherapy*, 8<sup>th</sup> ed., Wolters Kluwer, China, 1-18, **2011**.

- [33] Devita V.T., Chu E., A history of cancer chemotherapy, *Cancer Research*, 68, 8643-8653, **2008**.
- [34] Cukier D., Gingerelli F., Judson G.M., Mccullough V., *Coping With Chemotherapy And Radiation*, The Mc-Graw-Hill Companies Inc., US, 3-8, **2005**.
- [35] Stockwin L.H., Holmes S., The role of therapeutic antibodies in drug discovery, *Biochemical Society Transactions*, 31, 2, 433-436, **2003**.
- [36] Blattman J.N., Greenberg P.D., Cancer immunotherapy: A treatment for the masses, *Science* 9, 305, 5681, 200-205, **2004**.
- [37] Boer R.J. de., Hogeweg P., Dullens H.J, De Wager R. A., and Otter W. D., Macrophage T lymphocyte interactions in the anti tumor immune response: a mathematical model, *The Journal of Immunology*, 134, 4, 2748-2758, **1985**.
- [38] Tekewe A., Vaccines and antibodies for cancer immuntherapht a review, *Pharmacophore*, 3, 1, 1-17, **2012**.
- [39] Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D., IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature*, 26, 410, 1107–1111, **2001**.
- [40] Weiner L.M., Cancer immunotherapy: the end game begins, *The New England Journal of Medicine*, 358, 25, 2664-2665, **2008**.
- [41] Rosenbaum E.H., Rosenbaum I.R., *Supportive Cancer Care Sourcebooks, Immunotherapy cancer treatment*, Sourcebooks, Naperville, **2001**.
- [42] Tagliaferri P., Caraglia M., Budillon A., Marra M., Vitale G., Viscomi C., Masciari S., Tassone P., Abbruzzese A., Venuta S., *Cancer Immunology Immunotherapy*, 54, 1, 1-10, **2005**.
- [43] Brown S.B., Brown E.A., Walker I., The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *The Lancet Oncology*, 5, 8, 497-508, **2004**.
- [44] Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., Hpericin in cancer treatment : more light on the way, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 3, 221-241, **2002**.
- [45] Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K., Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy, *Current Medical Chemistry*, 13, 18, 2189-2040, **2006**.
- [46] Boulnois, J.L., Photophysical processes in recent medical laser developments: A review, *Lasers in Medical Science*, 1, 1, 47- 66, **1986**.
- [47] Chen W. R., Adams R. L., Carubelli R., Nordquist R. E., Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: A novel modality for cancer treatment, *Cancer Letters*, 115, 1, 25-30, **1997**.
- [48] Uysal Y., Ural A.U., Avcu F., Sobacı G., Hürmeriç V., Erdem Ü., Durukan A.H., Bayer A., Bayraktar M.Z., Meme kanseri (MCF-7) ve Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizileri üzerine in vitro ortamda hiperisin ile fotodinamik tedavi araştırma sonuçları, *Gülhane Tıp Dergisi*, 49, 147-152, **2007**.

- [49] Nauts H.C., Fowler GA, Bogatko F.H., A review of the influence of bacterial infection and bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumours in man, *Acta Medica Scandinavica*, 276, 1-103, **1953**.
- [50] Wust P., Hildebrandt B., Sreenivasa G., Rau B., Gellermann J., Riess H., Felix R., Schlag P.M., Hyperthermia in combined treatment of cancer, *The Lancet Oncology*, 3, 8, 487-497, **2002**.
- [51] Kampinga H.H., Dikomey E., Hyperthermic radiosensitization: Mode of action and clinical relevance, *International Journal of Radiation Biology*, 77, 4, 399-408, **2001**.
- [52] Roti Roti J.L., Introduction: radiosensitization by hyperthermia, *International Journal of Hyperthermia*, 20, 2, 109-114, **2004**.
- [53] Dewey W.C., Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic, *International Journal of Hyperthermia*, 10, 4, 457-483, **1994**.
- [54] Oh Y.K. , Park T.G., siRNA delivery systems for cancer treatment, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 10, 850-862, **2009**.
- [55] Moulder S., Hortobagyi G. N., Advances in the treatment of breast cancer, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83, 1, 26-36, **2008**.
- [56] Key T.J., Verkasalo P.K., Banks E., Epidemiology of breast cancer, *The Lancet Oncology*, 2, 3, 133-140, **2001**.
- [57] Yalav O., *Erken Evre Meme Kanserli Hastalarda Sentinel Lenf Nodu Biyopsisinin Yeri*, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Adana, **2009**.
- [58] Alican F., *Meme Kanseri*, Avrupa Tıp Kitapçılık , İstanbul, 95-214, **1981**.
- [59] Brown Z.K., Boatman K.K., *100 Questions And Answers Of About Breast Cancer*, 3<sup>th</sup> ed., Jones and Bartlett Publishers, Canada, p: 6-13, **2009**.
- [60] Patchefsky A.S., Schwartz G.F., Finkelstein S.D., Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast, *Cancer*, 63, 731-741, **1989**.
- [61] Calay Z., *Meme Hastalıkları, Intraduktal Ve Lobüler Neoplazi*, Nobel Tıp Kitapevi, 363-368, İstanbul, **2001**.
- [62] Jansen S.A., Ductal carcinoma in situ:detection, diagnosis, and characterization with magnetic resonance imaging, *Seminars in Ultrasound, CT and MR*, 32, 4, 306-318, **2011**.
- [63] Barnes N.L.P., Ooi J.L., Yarnold J.R., Bundred N.J., Ductal carcinoma in situ of the breast, Clinical Review, *BMJ*, 344, 1-3, **2012**.
- [64] Tuzlalı S., Meme Kanseri, Memenin malign tümörlerinin patolojik özellikleri, *İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*, İstanbul, 3, 199-217, **1997**.
- [65] Peacock J., *Breast Cancer*, Capstone Press, Minnesota, 12-20., **2002**.
- [66] Erdamar S., *Meme Hastalıkları, Meme Karsinomlarında Histolojik Tipler ve Prognoz*, Nobel Tıp Kitapevi, 301-305, İstanbul, **2001**.
- [67] İlhan R., *Meme Kanseri, Memenin Selim ve Proliferatif Lezyonları*, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, İstanbul, 180-188, **1997**.

- [68] Yavuz E., *Meme Kanseri, Meme Lezyonlarının Sitolojik Tanısı*, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları, İstanbul, 189-198, **1997**.
- [69] Millis R.R., Hanby A.M., Girling A.C., *The Breast: Diagnostic surgical pathology*, 2<sup>nd</sup> ed., Raven Press, New York, 1, 323-407, **1994**.
- [70] Balch P.A., *Prescription For Nutritional Healing*, 4<sup>th</sup> ed., Penguin Books Ltd., Canada, 250-258, **2006**.
- [71] Hossfeld D.K., Sherman C.D., *Klinik Onkoloji, Meme Kanseri*, 5. Baskı, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı ile Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, Ankara, s: 236-253, **1992**.
- [72] Haydaroğlu A., *Meme Hastalıkları, Erken Evre Meme Kanserinde Radyoterapi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 453-469, **2001**.
- [73] Topuz E., Aydın A., Meme kanseri, Meme kanserinde primer kemoterapi, *İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*, İstanbul, 3, 384-397, **1997**.
- [74] Serdengeçti S., *Meme Hastalıkları, Metastatik Meme Kanserinde Hormonoterapi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 531-537, **2001**.
- [75] Aran M., *Meme Hastalıkları, Yaygın Meme Kanserinde Hormon Tedavisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 524-530, **2001**.
- [76] Ferrari M., Barker A.D., Downing G.J., A cancer nanotechnology strategy, *Nanobiotechnology*, 1, 2, 129-131, **2005**.
- [77] Deura V., *Nanotechnological Applications In Cancer Treatment*, 1<sup>st</sup> ed., Global Vision Publishing House, India, 1-9, **2008**.
- [78] Ehdaie B., Application of Nanotechnology in Cancer Research: Review of Progress in the National Cancer Institute's Alliance for Nanotechnology, *International Journal of Biological Sciences*, 3, 2, 108-110, **2007**.
- [79] Campbell P., Cancer nanotechnology: Small, but heading for the big time, *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 174-175, **2007**.
- [80] Sathe TR, Agrawal A, Nie S., Mesoporous Silica Beads Embedded with Semiconductor Quantum Dots and Iron Oxide Nanocrystals: Dual-Function Microcarriers for Optical Encoding and Magnetic Separation, *Analytical Chemistry*, 78, 5627-5632, **2006**.
- [81] Torchilin V.P., Lukyanov A.N., Gao, Z., Papahadjopoulos- Sternberg B., Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 6039-44, **2003**.
- [82] Wang X., Wang Y., Chen Z.G., Shin D.M., Advances of cancer therapy by nanotechnology, *Cancer Research and Treatment*, 41, 1, 1-11, **2009**.
- [83] Burikhanov R., Zhao Y., Goswami A., Qiu S., Schwarze S.R., Rangnekar V.M., The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis, *Cell*, 138, 2, 377-88, **2009**.
- [84] Kolancı Ç., *Temel ve Klinik Biyokimya*, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 215-222, **2009**.
- [85] Başaran A., Güneş H.V., Solak M., Başaran N., *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 72-76, **2006**.

- [86] Walsh D., Mohr I., Viral subversion of the host protein synthesis machinery, *Nature Reviews Microbiology*, 9, 12, 860-75, **2011**.
- [87] Gözükara E.M., *Biyokimya*, Ofset Reprint Ltd. Şti, Ankara, 531-549, **1989**.
- [88] Akın K.O., Tunç E., *Biyokimya Ders Notları*, Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 406-409, **2004**.
- [89] Hershey J.W.B., Regulation of protein synthesis and role of eIF3 in cancer, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43,10, 920-930, **2010**.
- [90] White-Gilbertson S., Kurtz D.T., Voelkel-Johnson C., The role of protein synthesis in cell cycling and cancer, *Molecular Oncology*, 3, 5-6, 402-408, **2009**.
- [91] Altieri D.C., New wirings in the survivin networks, *Oncogene*, 27, 6276–6284, **2008**.
- [92] Mita A.C., Mita M.M., Nawrocki S.T., Giles F.J., Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics, *Clinical Cancer Research*, 14, 16, 5000–5005, **2008**
- [93] White S.J., Kasman L.M., Kelly M.M., Lu P., Spruill L., McDermott P.J., Voelkel-Johnson C., Doxorubicin generates a proapoptotic phenotype by phosphorylation of elongation factor 2, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 9, 1313–1321, **2007**.
- [94] Maeshima Y., Sudhakar A., Lively J.C., Ueki, K., Kharbanda S., Kahn R., Sonenberg N., Hynes R.O., Kalluri R., Tumstain, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis, *Science*, 295, 5552, 140-143, **2002**.
- [95] Yerlikaya A., Dokudur H., Şeker S., Proteozom inhibitörü MG132'nin 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19, 15-22, **2009**.
- [96] Hilt W., Wolf DH., Proteasomes: Destruction as a programme , *Trends in Biochemical Sciences* , 21, 3, 96-102, **1996**.
- [97] Jentsch S. , The ubiquitin-conjugation system, *Annual Review of Genetics*, 26, 179-207, **1992**.
- [98] Hershko A., Ubiquitin-mediated protein degradation, *The Journal of Biology Chemistry*, 263, 30, 15237-40, **1988**.
- [99] Dutaud D., Aubry L., Henry L., Levieux D., Hendil K.B., Kuehn L., Bureau J.P., Ouali A., Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *Journal of Immunological Methods*, 260, 1-2, 183-93, **2002**.
- [100] Kansu E., Hedeflenmiş tedavilerde 'hedef' moleküller, *Ankem*, 19, 2, 112-116, **2005**.
- [101] Wu H., Chang D., Huang C., Targeted therapy for cancer, *Journal of Cancer Molecules*, 2, 2, 57-66, **2006**.
- [102] Gerber D.E., Targeted therapies: A new generation of cancer treatments, *American Family Physician*, 77, 3, 311-9, **2008**.

- [103] Malinowsky K., Wolff C., Gündisch S., Berg D., Becker K.F., Targeted therapies in cancer- challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues, *Journal of Cancer*,19, 2, 26-35, **2010**.
- [104] Demirelli F.H., Hedefe yönelik kanser tedavisi ve monoklonal antikorlar, *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği (ANKEM) Dergisi*, 19, 123-125., **2005**.
- [105] Weidner N., Semple J. P., Welch W. R., Folkman J., Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 324, 1, 1-8, **1991**.
- [106] Folkman J., Angiogenesis, *Annual Review of Medicine*, 57, 1-18, **2006**.
- [107] Fuchs U., Borkhardt A., The application of siRNA technology to cancer biology discovery, *Advances in Cancer Research*, 96, 75-102, **2007**.
- [108] Özvaran M.K., Malign mezotelyomada gen tedavisi, *Türk Toraks Dergisi*, 5, 2, 110-115, **2004**.
- [109] Doi N., Zenno S., Ueda R., Ohki-Hamazaki H., Ui-Tei K., Saigo K., Short-interfering RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors, *Current Biology*, 13, 1, 41-46, **2003**.
- [110] Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., Wang, X., Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation, *Cell*, 123, 621- 629, **2005**.
- [111] Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411, 494-498, **2001**.
- [112] Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., Sah D.W., RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs, *Nature Chemical Biology*, 2, 711-719, **2006**.
- [113] Kim D.H., Rossi J.J., 2007, Strategies for silencing human disease using RNA interference, *Nature Reviews Genetics*, 8, 173-184, **2007**.
- [114] Katas H., Alpar H.O., Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery, *Journal of Controlled Release*, 115, 2, 216-225, **2006**.
- [115] Jayakumar R., Menon D., Manzoor K., Nair S.V., Tamura H., Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials, *Carbohydrate Polymers*, 82, 2, 227-232, **2010**.
- [116] Dutta P.K., Viswanathan P., Mimrot L., Kumar M.N.V.R., Use of chitosan amine oxide gel as drug carrier, *Journal of Polymer Materials*, 14, 350-352, **1997**.
- [117] Dutta P.K., Kumar M.N.V.R., Chitosan–amine oxide: thermal behavior of new gelling system, *Indian Journal of Chemical Technology*, 6, 54-56, **1999**.
- [118] Kumar M.N.V.R., Singh P., Dutta P.K., Effect of swelling on chitosan–amine oxide gel in extended drug delivery, *Indian Drugs*, 36, 392-394, **1999**.

- [119] Richardson S.C.W., Kolbe H.V.J., Duncan R., Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA, *International journal of Pharmaceutics*, 178, 2, 231-243, **1999**.
- [120] Janes K.A., Calvo P., Alonso M.J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47,1, 83-97, **2001**.
- [121] Rudzinskia W.E., Aminabhavi T.M., Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA, *International Journal of Pharmaceutics*, 399, 1-2, 1-11, **2010**.
- [122] Kwon I.C., Chitosan-based nanoparticles for cancer therapy; tumor specificity and enhanced therapeutic efficacy in tumor-bearing mice, *Journal of Controlled Release*, 132, 3, p: e69-e70, **2008**.
- [123] Kim K., Kim J.H., Park H., Kim Y., Park K., Nam H., Lee S., Park J.H., Park R., Kim I., Choi K., Kim S.Y., Park K., Kwon I.C., Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring, *Journal of Controlled Release*, 146, 2, 219–222, **2010**.
- [124] Kato Y., Onishi H., Machida Y., Contribution of chitosan and its derivatives to cancer chemotherapy, *In Vivo*, 19, 1, 301-310, **2005**.
- [125] Patel N.P., Patel R.R., Patel J.K., Chitosan mediated targeted drug delivery system: A review, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13, 3, 536-557, **2010**.
- [126] Naruphontjirakul P., Viravaidya-Pasuwat K., Development of doxorubicin - core shell chitosan nanoparticles to treat cancer, *2011 International Conference on Biomedical Engineering and Technology IPCBEE*, 90-91, **2011**.
- [127] Qi L., Xu Z., Chen M., In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles, *European Journal Of Cancer*, 43, 1, 184–193, **2007**.
- [128] Yandı Y.E., *Metabolik sendromda ABCC8 (SUR1) Polimorfizminin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, **2006**.
- [129] Chen Z., Dong J., Ishimura A., Daar I., Hinnebusch A.G., Dean M., The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors, *Journal Of Biological Chemistry*, 281, 11, 7452-7457, **2006**.
- [130] Shichijo S., Ishihara Y., Azuma K., ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncology Reports*, 13, 5, 907-913, **2005**.
- [131] Pisarev A., The role of ABCE1 in eukaryotic post-termination ribosomal recycling, *Molecular Cell*, 37, 2, 196-210, **2010**.

- [132] Mao-Gen Z., Ying G., Bo H., Da-Li T., Chun-Lu Y., Suppression of ABCE1 leads to decreased cell proliferation and increased apoptosis in 95-D/NCI-H446 Lung Carcinoma Cells, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 36, 11, 1475-1482, **2009**.
- [133] Liu D.Z., Tian D.L., Expression and clinical significance of ABCE1 in human lung adenocarcinoma, *Journal of China Medical University*, 30, 4, 296-297, **2008**.
- [134] Clemens M.J., Bommer U.A., Translational control: the cancer connection, *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 1, 1-31, **1999**.
- [135] Ruggero D., Pandolfi P.P., Does the ribosome translate cancer?, *Nature Reviews Cancer*, 3, 179-192, **2003**.
- [136] Rajasekhar V.K., Holland E.C., Postgenomic global analysis of translational control induced by oncogenic signaling, *Oncogene*, 23, 18, 3248-3264, **2004**.
- [137] Malta-Vacas J., Chauvin C., Gonçalves L., Nazaré A., Carvalho C., Monteiro C., Bagrel D., Jean-Jean O., Brito M., eRF3a/GSPT1 12-GGC allele increases the susceptibility for breast cancer development, *Oncology Reports*, 21, 6, 8-1551, **2009**.
- [138] Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M., Eukaryotic release factors (eRFs) history, *Biology of The Cell*, 95, 195-209, **2003**.
- [139] Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3, *The Embo Journal*, 14, 16, 4065-4072, **1995**.
- [140] Chauvin C., Salhi S., Jean O., Human Eukaryotic Release Factor 3a Depletion Causes Cell Cycle Arrest at G1 Phase through Inhibition of the mTOR Pathway, *Molecular Cell Biology*, 27, 16, 5619–5629, **2007**.
- [141] Ozawa K., Murakami Y., Eki T., Yokoyama K., Soeda E., Hoshino S., Ui M., Hanaoka F., Mapping of the human GSPT1 gene, a human homolog of the yeast GST1 gene, to chromosomal band 16p13.1., *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 18, 2, 189-194, **1992**.
- [142] Bining G., Quate C.F., Gerber C.H., Atomic force microscope, *Physical Review Letters*, 56, 9, 930-933, **1986**.
- [143] Kasas S., Thomson N.H., Smith B.L., Hansma P.K., Miklossy J., Hansma H.G., Biological Applications of the AFM: From Single, Molecules to Organs, *John Wiley & Sons Ltd.*, 8, 151-161, **1997**.
- [144] Jalili N., Laxminarayana K., A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, *Chemical Engineering Research and Design*, 14, 8, 907-945, **2004**.
- [145] Serter N., *Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*, 8. Baskı, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi, 8. Baskı, Eskişehir, 101-104, **2006**.
- [146] Harrison R., Greenman M.J., Mall F.P., Jackson C.M., Observations on the living developing nerve fiber, *The Anatomical Record*, 1, 5, 116-128, **1907**.



- [147] Alp E., *Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisi İçin Biyopolimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 26-28, **2010**.
- [148] Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K., Watanabe M., *In Vitro Toxicology*, 8, 2, 187-190, **1995**.
- [149] Liu S., Xing J., Zheng Z., Song F., Liu Z., Liu S., Ultrahigh performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry inhibitors fishing assay: A novel method for simultaneously screening of xanthine oxidase inhibitor and superoxide anion scavenger in a single analysis, *Analytica Chimica Acta*, 715, 64-70, **2012**.
- [150] Martin L.J., Al-Abdulla N., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera-Cailliau C., Neurodegeneration in Excitotoxicity, Global Cerebral Ischemia, and Target Deprivation: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis, *Brain Research Bulletin*, 46, 4, 281-309, **1998**.
- [151] Gan Q., Wang T., Cochrane C., McCarron P., Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65-73, **2005**.
- [152] Ali S.W., Joshi M., Rajendran S., Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles with enhanced antimicrobial activity, *International Journal of Nanoscience*, 10, 979-984, **2011**.
- [153] Bulmer C., Margaritis A., Xenocostas A., Production and characterization of novel nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, *Biochemical Engineering Journal*, 68, 61-69, **2012**.
- [154] Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H., Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27, **2012**.
- [155] Huang B., Gao Y., Tian D., Zheng M., A small interfering ABCE1 targeting RNA inhibits the proliferation and invasiveness of small cell lung cancer, *International Journal of Molecular Medicine*, 25, 687-693, **2010**.
- [156] Liang Z., Yoon Y., Votaw J., Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis, *Cancer Research*, 65, 967-971, **2005**.
- [157] Kim S.H., Jeong J.H., Lee S.H., Kim S.W., Park T.G., Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrode complex micelles of effective treatment of cancer, *Journal of Controlled Release*, 129, 107-116, **2008**.
- [158] Chauvin C., Salhi S., Goff C.L., Viranaicken W., Diop D., Jean-Jean O., Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation, *Molecular and Cellular Biology*, 25,14, 5801-11, **2005**.

## ÖZGEÇMİŞ

### **Kimlik Bilgileri**

Adı Soyadı : Bağdat Burcu CENGİZ  
Doğum Yeri : ANKARA  
Doğum Yılı : 1986  
Medeni Hali : Bekar  
E-Posta : bagdatburcucengiz@gmail.com  
Adres : Duralialıç mah. 963. Sok. 2/5 C Blok Mamak/ANKARA

### **Eğitim**

Lise : 2000-2004 Tınaztepe Lisesi, Ankara  
Lisans : 2005-2010 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi,  
Kimya Bölümü, Ankara  
Yüksek Lisans : 2011-2013 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara

**Yabancı Dil** : İngilizce

### **Tezden Üretilmiş Projeler**

- 011A601003 No'lu "Meme Kanseri Hücrelerinde, ABCE1 ve eRF3 Proteinlerinin siRNA Taşıyan Nanoparçacıklarla İnhibe Edilmesinin Hücre Çoğalması ve Hücre Ölüm Yollarına Etkisi" adlı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi