KOLON KANSERİNDE K-RAS siRNA YÜKLÜ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN TERANOSTİK KULLANIMI

FEYSEL ÇAKMAK

MART 2023

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSERİNDE K-RAS siRNA YÜKLÜ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN TERANOSTİK KULLANIMI

FEYSEL ÇAKMAK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

MART 2023

DİYARBAKIR

KOLON KANSERİNDE K-RAS siRNA YÜKLÜ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN TERANOSTİK KULLANIMI

Feysel ÇAKMAK tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Biyoloji Ana Bilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ _____
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Veysel TOLAN _____
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Özlem DEMİRCİ _____
İkinci Danışman, **Biyoloji Bölümü**
Dicle Üniversitesi

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Göksel KIZIL**(*)** _____
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Veysel TOLAN**(**)** _____
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Sema FİNCAN _____
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Nurullah AKCAN _____
Beslenme ve Diyabetik Bölümü, Siirt Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer ACER _____
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Siirt Üniversitesi

ONAY

SavunmaTarihi:17 / 03 / 2023

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.
(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.

Sevgili Aileme…

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılayıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ad, Soyad: Feysel ÇAKMAK

İmza: …….…….

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü imkanı sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışmanlarım Prof. Dr. Veysel Tolan ve Doç. Dr. Özlem Demirci'ye;

Çalışmamın yürütülmesinde sağladığı laboratuvar imkanıyla bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Sevgi İrtegun'a;

Doktora sürecinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ersin Kılınç, Prof. Dr. Lokman Varışlı, Doç. Dr. Ufuk Özer, Doç. Dr. Sema Fincan, Prof. Dr. Aysel Bekleyen, Doç. Dr. Birgül Otludil, Prof. Dr. Hülya Karadede Akın, Prof. Dr. Göksel Kızıl, Doç. Dr. Bircan Çeken Toptancı, Doç. Dr. Duygu Sayın İpek, Dr. Öğr. Üyesi Pelin Uğurlu, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Güngören, Dr. Öğr. Üyesi Veysi Kızmaz ve Doç. Dr Mehmet Boğa'ya;

Tezimin her aşamasında yardım ve desteklerinni esirgemeyen Arş.Gör Deniz Evrim Kavak ve Dr. Öğr. Üyesi İsrat Jahana;

Yardım ve desteklerinden dolayı Dr. Veysi Ortakaya, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Başdemir, Mahmut Özer, Abdullah Alpkan, Asena Dündar, Hilal Kaya, Ruken Duru, Osman Akaman, Feryal Akay, Nesrin İnceören, Sinan Aslan ve Dr. Ekrem Kum'a;

Göteborg Üniversitesi, Deniz Biyolojisi laboratuvarlarında deneyim edinmemi sağlayan, hayata veda etmesine derinden üzüldüğüm Prof. Dr. Anna Godhe ve desteklerinden dolayı Dr. Olga Kourtchenko'ya;

Uppsala Üniversitesi, İmmünoloji, Genettik ve Patoloji laboratuvarlarında bana çalışma imkanı sağlayan, Prof. Dr. Ulf Landegren, Prof. Dr. Masood Kamali Moghdam'a; destekleri için Dr. Radiosa Galini, Dr. Alireza Azimi ve Ehsan Manouchehri Doulabi'ye; saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

YÖK 100/2000 öncelikli alanlar, Mikro ve Nanoteknoji alt ana dalında doktora süresince bana sağladıkları burs için YÖK'e , çalışmama verdikleri destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) birimine teşşekkür ederim.

Doktora sürecinde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz sevgi, saygı ve minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
ŞEKİLLER LİSTESİ x
TABLOLAR LİSTESİ xii
EKLER LİSTESİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ xiv
ÖZET xvi
ABSTRACT xvii
1. GİRİŞ 1
1.1 Dünyada Kolon Kanseri 2
1.2 Türkiyede Kolon Kanseri 3
2. KAYNAK ÖZETLERİ 5
2.1 RAS Gen Ailesi 7
2.1.1 KRAS geni 7
2.1.2 KRAS geninin doğrudan hedeflenmesi 9
2.1.3 KRAS geninin dolaylı yoldan hedeflenmesi 11
2.1.4 RAS/MAPK yolu 13
2.2 RNA İnterferans(RNAİ) 13
2.2.1 ShRNA 13
2.2.2 siRNA 14
2.2.3 miRNA 15
2.3 RISC Mekanizması 16
2.4 Nanoteknoloji 18
2.5 Vektörler 18
2.6 Viral Vektörler 18

2.6.1 Adenovirüsler 19
2.6.2 Lentivirüsler 19
2.6.3 Retrovirüsler 19
2.7 Viral Olmayan Vektörler 20
2.7.1 Lipozomlar 20
2.7.2 Manyetik nanopartiküller 21
3. MATERYAL VE METOT 23
3.1 Materyal 23
3.1.1 Kullanılan cihazlar 23
3.1.2 Kullanılan malzemeler ve markaları 24
3.2 Metot 25
3.2.1 Demir oksit nanopartiküllerin sentezi 25
3.2.2 Sentezlenen demiroksit nanopartiküllerinin sitrik asit kaplanması 25
3.2.3 Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon 26
3.2.4 Transmisyon elektron mikroskopu (TEM) 26
3.2.5 Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) 27
3.2.6 X-Işını kırınım yöntemi (XRD) 27
3.2.7 Titreşimli numune manyetometrisi (VSM) 28
3.2.8 Zeta potansiyel 28
3.2.9 Katyonik lipozom sentezi 29
3.2.10 siRNA stoklarının hazırlanması 29
3.2.11 MNP ve siRNA'nın lipozomla kapsüllenmesi 30
3.2.12 Hücrelerin stoklardan çoğaltılması 30
3.2.13 Hücrelerin pasajlanması 31
3.2.14 Hücre stoklarının hazırlanması 31
3.2.15 Hücre sayımı 32
3.2.16 Caco-2 hücrelerinin KRAS gen seviyelerinin belirlenmesi 33

3.2.17 HT29 hücrelerinin KRAS gen seviyelerinin belirlenmesi 33
3.2.18 Total RNA izolasyonu..... 34
3.2.19 İzole edilen total RNA'nın agaroz- formaldehit jelde yürütülmesi 35
3.2.20 cDNA sentezi 35
3.2.21 RT-PCR ve KRAS gen ekspresyonu..... 36
3.2.22 BCL-2 ve BAX gen seviyelerinin belirlenmesi 38
3.2.23 Sitotoksisite deneyi (MTT) 39
3.2.24 Yara iyileşme deneyi..... 40
3.2.25 Annexin V apoptoz testi..... 40
3.3 İstatistiksel Analiz..... 41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 42
4.1 Nanopartikül Karakterizasyon Bulguları 42
4.1.1 Transmisyon elektron mikroskopu (TEM) 42
4.1.2 Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) 43
4.1.3 X-Işını kırınım yöntemi (XRD) 44
4.1.4 Titreşimli numune manyetometrisi (VSM)..... 46
4.1.5 Zeta potansiyeli 47
4.2 Caco-2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Nanodrop Ölçüm Değerleri . 47
4.3 HT29 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Nanodrop Ölçüm Değerleri.... 48
4.4 Caco-2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Jel Görüntüsü..... 49
4.5 HT29 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Jel Görüntüsü 49
4.6 Caco-2 Hücrelerinin KRAS Gen Susturma Seviyeleri 50
4.7 HT29 Hücrelerinin KRAS Gen Susturma Seviyeleri 51
4.8 Erime Eğrisi 53
4.9 Caco-2 Hücrelerinin BCL-2 ve BAX Gen Seviyeleri..... 55
4.10 HT29 Hücrelerinin BCL-2 ve BAX Gen Seviyeleri..... 55
4.11 Hücrelerin Sitotoksisite Çalışmaları 56

4.11.1 Caco-2 hücre sitotoksisite deney (MTT) sonuçları 57
4.11.2 HT29 hücre sitotoksisite deney (MTT) sonuçları 60
4.12 Yara iyileşme Deneyi Bulguları 62
4.12.1 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deney sonuçları 63
4.12.2 HT29 hücreleri yara iyileşme deney sonuçları 64
4.13 Annexin V Apoptoz Testi 67
4.13.1 Caco-2 hücreleri apoptoz değerleri 67
4.13.2 HT29 hücreleri apoptoz değerleri 68
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 71
KAYNAKLAR 75
EKLER 86
ÖZGEÇMİŞ 91

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Kolon kanserinin dünya insidası 3
Şekil 1.2 Türkiyede kolorektum kanseri oranı 4
Şekil 2.1 Kolon kanseri evreleri……5
Şekil 2.2 KRAS efektör yolları……..9
Şekil 2.3 KRAS'ın en çok görüldüğü insan kanserlerinde mutasyon tipleri ve oranı 10
Şekil 2.4 KRAS sinyal kaskadı yukarı akış ve aşağı akış inhibitörleri 12
Şekil 2.5 Kanser tedavisi için siRNA terapötiklerinin geliştirme süreci 14
Şekil 2.6 miRNA oluşum mekanizması 15
Şekil 2.7 Risc mekanizmanın çalışma 17
Şekil 3.1 Manyetik nanopartikül sentez düzeneği 25
Şekil 3.2 Demir oksit nanopartiküllerin sitrik asit ile kaplanması 26
Şekil 3.3 Neubauer chamber lamı 32
Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan RT-PCR cihazı 39
Şekil 4.1 siRNA ve SPİON kaplı lipozom TEM görüntüleri 42
Şekil 4.2 Sentezlenen nanopartiküllerin FTIR değerleri 43
Şekil 4.3 Magneto lipozom+siRNA FTIR değerleri 43
Şekil 4.4 Demiroksit nanopartiküllerin XRD cihazında ölçülen dalga yogunlukları 45
Şekil 4.5 Demiroksit nanopartiküllerin XRD faz analizi 45
Şekil 4.6 Maghemit (γ-Fe_2O_3) manyetik özelliği grafiği 46
Şekil 4.7 Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA'nın bant görüntüleri 49
Şekil 4.8 HT29 hücrelerinden izole edilen RNA'nın bant görüntüleri 50
Şekil 4.9 Caco-2 hücrelerine uygulanan farklı dozların kras gen susturma değerleri 51
Şekil 4.10 HT29 hücrelerine uygulanan farklı dozların kras gen susturma değerleri 52
Şekil 4.11 Caco-2 hücreleri gen ifadesi ölçümü RT-PCR erime eğrisi grafiği 53
Şekil 4.12 HT29 hücrelerinin gen ifadesi ölçümü RT-PCR erime eğrisi grafiği 54
Şekil 4.13 Caco-2 hücreleri BAX/BCL-2 gen seviyeleri oranı 55
Şekil 4.14 HT29 hücreleri BAX/BCL-2 gen seviyeleri oranı 56
Şekil 4.15 Caco-2 24.saat MTT sonuçları 57

Şekil 4.16 Caco-2 48.saat MTT sonuçları 58
Şekil 4.17 Caco-2 72. saat MTT sonuçları 59
Şekil 4.18 HT29 24. saat MTT sonuçları 60
Şekil 4.19 HT29 48. saat MTT sonuçları 61
Şekil 4.20 HT29 72. saat MTT sonuçları 62
Şekil 4.21 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deneyi sonuçları 63
Şekil 4.22 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deneyi istatiksel sonucu 64
Şekil 4.23 HT29 hücreleri yara iyileşme deneyi sonuçları 65
Şekil 4.24 HT29 hücreleri yara iyileşme deneyi istatiksel sonucu 66
Şekil 4.25 Caco-2 hücreleri apoptoz florasan mikroskop görüntüleri 67
Şekil 4.26 Caco-2 hücreleri apoptoz istatiksel grafiği 68
Şekil 4.27 HT29 hücreleri apoptoz florasan mikroskop görüntüleri 68
Şekil 4.28 HT29 hücreleri apoptoz istatiksel grafiği 69

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Kolon kanseri evreleri…….....6
Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar..... 23
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan malzemeler ve markaları..... 24
Tablo 3.3 siRNA konsantrasyon hazırlama cetveli..... 30
Tablo 3. 4 abm cDNA kit bileşenleri 36
Tablo 3.5 Primer gen dizilişleri..... 37
Tablo 3.6 Syber Green I kit bileşenleri 37
Tablo 3.7 RT-PCR program ve döngüler..... 37
Tablo 3.8 BCL-2 ve BAX genlerinin primer gen dizilişleri 39
Tablo 4.1 Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA miktarları ve kaliteleri nanodrop ölçümleri 48
Tablo 4.2 HT29 hücrelerinden izole edilen RNA miktarları ve kaliteleri nanodrop ölçümleri 48

EKLER LİSTESİ

Ek 4.1: Sentezlenen nanopartikül zeta potansiyeli ve boyutun sayıya göre dağılım grafiği……..87

Ek 4.2: Sentezlenen nanopartikül boyutunun yoğunluk ve hacime göre dağılım grafiği 88

Ek 4.3: Sentezlenen lipozom zeta potansiyeli ve boyutun sayıya göre dağılım grafiği……..89

Ek 4.4: Sentezlenen lipozom boyutunun yoğunluk ve hacime göre dağılım grafiği……..90

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
nmol	Nanomol
µmol	Mikromol
pmol	Pikomol
nM	Nanomolar
ºC	Santigrat derece
mg	Miligram
µg	Mikrogram

Kısaltma	Açıklama
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
RPMI-1640	Roswell Park Memorial İnstitute Medium
FBS	Fetal sığır serumu
CA	Sitrik asit
cDNA	Komplementer DNA
siRNA	Kısa engelleyici RNA lar
SPION	Süper paramanyetik demiroksit nanopartikül
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
PBS	Fosfat Tamponu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
NP	Nanopartikül
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RNA	Ribonükleik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
PEG	Polietilenglikol

DSPC	Distearoylphosphatidylcholine
LP	Lipozom
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
RISC	RNA Induced Silencing Complex

ÖZET

KOLON KANSERİNDE K-RAS siRNA YÜKLÜ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN TERANOSTİK KULLANIMI

Çakmak, Feysel
Doktora, Biyoloji Bölümü
Danışman: Prof. Dr. Veysel Tolan
İkinci Danışman: Doç. Dr. Özlem Demirci
Mart 2023, 110 sayfa

Kanser günümüzde sıkça görülen ve insan yaşam kalitesini düşüren bir hastalıktır. GTPaz proteini olarak bilinen KRAS, c-Raf ve PI3K gibi EGFR sinyal yollarındaki birçok proteinin aktivasyonunu sağlar. KRAS'ın aktif olarak mutasyona uğraması kansere neden olmakla birlikte KRAS mutasyonları kolon kanserinde sıkça görülmektedir. Nanobiyoteknoloji veya Nanotıp, günümüzde sağlık alanında ilaçların taşınmasını, hedef bölgeye gönderilmesini, sadece gönderilen hedef bölgede etkin olmasını sağlayan ve hızla gelişen bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Mutasyona uğramış genlerin susturulması stratejisi ve tedavi amaçlı kullanımı umut vadetmektedir. Bu çalışmada yeni sentezlenen süper manyetik demiroksit nanopartikülerinin (SPION) siRNA taşınmasında sistemin bir parçası olarak lipozom nanopartiküllerine entegre edilmesiyle, KRAS genini susturmak için bir araç olarak kullanılması amaçlanmıştır. Öncelikle, süper manyetik demiroksit nanopartikületi birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenerek KRAS siRNA ile birlikte, DSPC:DC-Cholesterol: PEG olarak hazırlanan katyonik bir lipozomla kapsüllenmesi yapılmıştır. Sentezlenen nanopartikül TEM, FTIR, XRD, VSM ve Zeta Potansiyeli ile karakterizasyonu yapılmıştır. Magneto-lipozomun farklı dozlarıyla, Caco-2 ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarında KRAS genin susturulması, BCL-2 ve BAX gen ifadeleri, sitotoksisite, yara iyilişme ve apoptoz testleri yapılmıştır. Mission siRNA transfeksiyon ajanı hem Caco-2 hem de HT29 hücre hatları için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri için KRAS genin sustuğu en yüksek % 65 orana sahip Mission siRNA transfeksiyon ajanından sonra 4 nolu örnekte kontrol ile kıyaslandığında %58 oranında gen susturması görülmüştür. En düşük susturma oranı, %39 oranla 3 nolu örnekte gözlemlenmiştir. HT29 hücreleri için KRAS geninin baskılandığı en yüksek oran %72 Mission siRNA TA görülmektedir. 1 nolu örnekte %64 ve diğer örneklerde 1 nolu örneğe yakın gen baskılandığı gözlemlenmiştir. BCL-2/BAX gen oranları incelendiğinde, Caco-2 hücrelerini apoptoza götürdüğü, HT29 hücreleri ise kanser spesifik olarak apoptozdan kaçtığı gözlemlenmiştir. Caco-2 hücreleri MTT sitotoksik etkisi, 48. Saatte bütün dozlarda bir hücre ölümü olduğu ve bu azalmayı 72. Saat değerleri takip etmektedir. HT29 hücreleri MTT sitotoksik etkisi, bütün dozlarda 72. Saatte sitotoksisite etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Caco-2 yara iyileşme değerleri bütün dozlarda az etkisiyle birlikte diğer örneklerle kıyaslandığında 1ve 4 numaralı örneklerde en çok etki olduğu, HT29 hücrelerinde ise yara iyileşmesi 3 ve 4 nolu örneklerde en geç kapandığı gözlemlenmiştir. Annexin v ile florasan mikroskopla belirlenen apoptoz değerlerinde, Caco-2 hücreleri için pozitif kontrol ve 4 nolu örnekte daha çok nekroz olduğu, HT29 hücreleri için 4 nolu örnekte geç apoptozun fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lipozom, İlaç taşınımı, Gen susturma, Nanoteknoloji, siRNA*

ABSTRACT

THERANOSTIC USE OF K-RAS siRNA-LOADED MAGNETIC NANOPARTICLES IN COLON CANCER

Çakmak, Feysel
Doctor of Philosophy in Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Veysel Tolan
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem Demirci
March 2023, 110 pages

Cancer is a disease that is frequently seen today and reduces the quality of human life. KRAS is knowing GTPase protein that can activate many proteins such as c-Raf and PI3K in the EGFR signaling pathways. Active mutation of KRAS causes cancer and KRAS mutations are frequently seen in colon cancer. Nanobiotechnology or Nanomedicine is the most developed technology in the field of health today due to the transport of drugs and sending them to the target region. Strategies for silencing mutated genes hold some therapeutic hopes. In this study, it was aimed to integrate new synthesis super magnetic iron oxide nanoparticles (SPION) into liposome nanoparticles as part of the gene transport system for KRAS gene silencing. Firstly, supermagnetic iron oxide nanoparticles were synthesized by co-precipitation method and KRAS siRNA was encapsulated together with supermagnetic iron oxide nanoparticles by a cationic liposome prepared as DSPC:DC-Cholesterol:PEG. The synthesized nanoparticle was characterized by TEM, FTIR, XRD,VSM and Zeta Potential. Silencing of KRAS gene, BCL-2 and BAX gene expression, cytotoxicity, wound healing and apoptosis tests were performed in Caco-2 and HT29 colon cancer cell lines with different dose rates of siRNA loaded magnetoliposomes. The Mission siRNA transfection agent used as positive control for both Caco-2 and HT29, for Caco-2 cells Mission siRNA TA was the highest rate of silencing of the KRAS gene was 65%. Following the Mission siRNA TA gene silencing was observed as %58 in sample No:4 compared to the control. The lowest silencing rate of 39% was observed in sample No:3. For HT29 cells, the highest rate of suppression of the KRAS gene is 72% by Mission siRNA TA. It was observed that the gene suppression was 64% by No:1 sample and other samples closed to the No:1 sample. Considering the BCL-2 and BAX gene expresion, it was found that Caco-2 cells lead to apoptosis while HT29 cells which was observed that cancer specifically escaped apoptosis. Considering the cytotoxic effect of MTT on Caco-2 cells that cells death is observed at all doses at the 48th hour and this decrease is followed by the 72nd hour values. Cytotoxic effect of MTT for HT29 cells observed that all doses showed cytotoxicity at 72 hours. Caco-2 wound healing values that all doses showed a small effect while most affect in samples No:1 and No:4 to compare with other samples. Wound healing for HT29 cells was observed to close at the latest in samples No: 3 and No: 4. In the apoptosis values determined by fluorescent microscope with Annexin v, it was observed that there was more necrosis in the positive control and sample No: 4 for Caco-2 cells and the rate of late apoptosis was higher in sample No:4 for HT29 cells.

Keywords: *Liposome, Drug delivery, Gene silencing, Nanotechnology, siRNA*

1. GİRİŞ

Kansere neden olan faktörler tam bilinmemesine rağmen genel olarak, sigara, alkol, hareketsiz yaşam, kötü beslenme biçimi, radyasyon, hava, çevre kirliliği ve kimyasallara maruz kalma gibi faktörlerden bahsedilebilir. Kanserin ana sebebi hücrelerin DNA'sında meydana gelen mutasyonlardır ve bu mutasyonlardan bazıları kalıtsaldır. Bazı virüsler ve bakteriler de kansere sebebiyet verdiği anlaşılmıştır. Virüsler, bakteriler ve parazitlerin neden olduğu mikrobiyal enfeksiyonun, insan vücudunun çeşitli organ sistemlerindeki kanserlerin önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (IARC) göre, tüm kanserlerin %15,4' ü enfektif bir etiyolojiye sahiptir (Plummer vd., 2016; Talukdar vd., 2022).

İsviçreli doctor kimyager Paracelsus (1493-1541), kandaki kükürt ve arsenik tuzu birikintilerinin özellikle madencilerde, duvarcılarda, kimyagerlerde ve metalürjistlerde kansere neden olduğunu öne sürmüştür. Kanserden korunma genellikle nispeten genç bir tıp alanı olarak kabul edilir. Bununla birlikte, 1727'de Le Clerc, kansere dönüşmeden önce şişliklerin, poliplerin ve şişkinliklerin kesilmesini önermiştir. 1775'te İngiliz doktor Percivall Pott, baca temizleyicilerinde skrotum kanseri (daha sonra skuamöz hücreli karsinom olduğu keşfedilmiştir) arasında nedensel bir bağlantı olduğunu bildirmiştir. Daha sonra, tek kıyafetlerini kirletmemek için genellikle çıplak çalışan baca temizleyicilerine, ikinci bir kıyafet seti almalarını, çıplak halde baca süpürmelerine izin verilmemesini ve her işten sonra yıkamalarını tavsiye etmiştir (Hajdu, 2006; Lippman ve Hawk, 2009).

Geçen yüzyıllarda, kanser hastalığının yaygın olmaması ve son zamanlarda görülmesi, değişen yaşam tarzları, beslenme biçimleri ve alışkanlıklar nedeniyle kanser oranı günümüzde endişe verici bir şekilde artmaktadır (Roy ve Saikia, 2016).

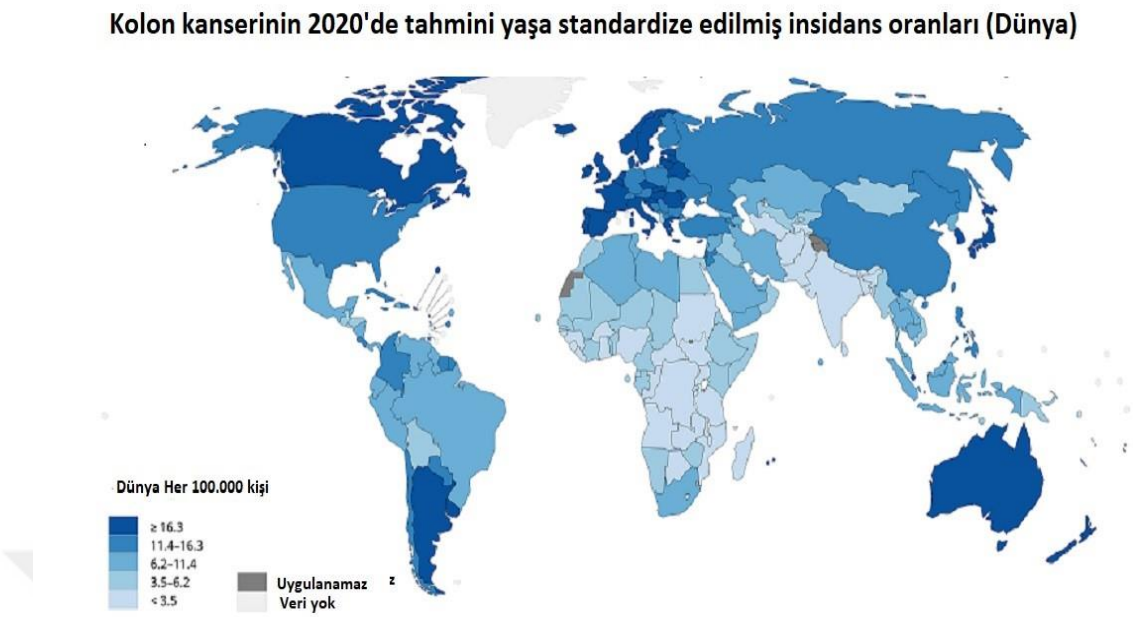
Kanser, hücre ölümüne direnç geliştirmesi, hücresel sinyalleşmedeki değişiklikler, doku invazyonu, metastaz, anjiyogenez, fiziksel, kimyasal ve biyolojik dahil olmak üzere farklı mutajen türleri tarafından genetik mutasyonların birikmesini içeren hücrelerin kontrolsüz çoğalması olarak gelişen hastalık olarak tanımlanabilir. Kanser genellikle lokalize bir tümör olarak başlar ve vücudun uzak bölgelerine metastaz yaparak yayılır (Dessale vd., 2022).

Kanser, dünya çapında insan ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. Her yıl 7,6 milyon insan ölmektedir, bu da toplam ölümlerin %13'ünü temsil etmektedir. Kanser prevalansının mevcut durumu yakın gelecekte daha kötü olacağı ve kansere bağlı ölümlerin 2030 yılına kadar 13,1 milyon artması beklenmektedir. Dünya sağlık Örgütü 2030'dan sonra her yıl 30 milyon insanın kanserden öleceğini tahmin etmektedir (Yadav vd., 2022).

1.1 Dünyada Kolon Kanseri

Kolorektal kanser en sık görülen üçüncü kanserdir. Yılda 1,1 milyon yeni vaka ile dünya çapında ve kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. 2020'de küresel kanser vakalarının %10'unu ve kansere bağlı tüm ölümlerin %9,4'ünü temsil etmektedir. Yaşlanma, nüfus artışı ve insani gelişme tahminlerine dayalı olarak, küresel yeni kolorektal vakası sayısının 2040 yılında 3,2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir.Yaşlı insanlar arasında en yaygın olmasına rağmen, 50 yaşın üzerindeki insidansı, muhtemelen daha iyi taramanın bir sonucu olarak, son yıllarda küresel olarak azalmaktadır. Paradoksal olarak, 50 yaşın altındaki hastalarda insidansı, henüz tam olarak anlaşılamayan nedenlerle artmaktadır. (Cervantes vd., 2023; Saraiva vd., 2023; Sung vd., 2021; Xi ve Xu, 2021).

Kolon kanserinin her yaş ve her cinsiyeti gösteren dünya insidası Şekil 1.1'de verilmiştir. Koyu renkli alanlar vakaların en sık bulunduğu, açık alanlar en az olduğunu göstermektedir (Globancan, 2020).

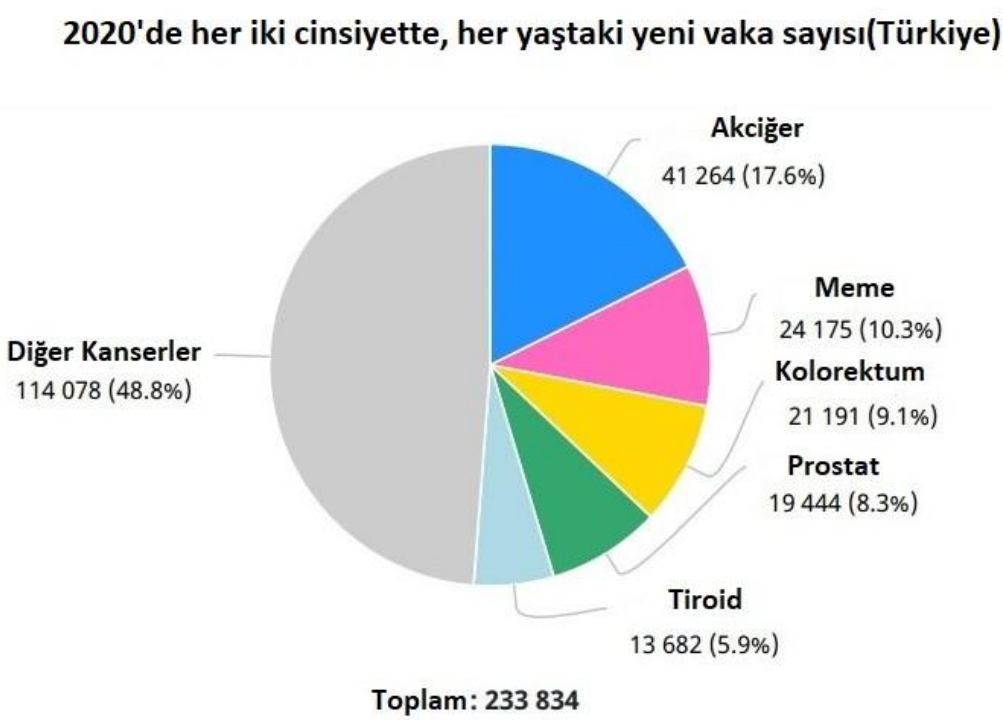


Şekil 1.1 Kolon kanserinin dünya insidası (Globancan, 2020)

1.2 Türkiyede Kolon Kanseri

Türkiyede kolon kanseri, 12 217 yeni vaka ve %5,2 ile diğer kanser türlerinden 7. sırada yer almaktadır. Ölüm oranı incelendiğinde 6545 ölüm ve %5,2 oranıyla 5.sırada yer almaktadır. 5 yıllık değerler 31660 ve 100 000'de 37.54 olarak tespit edilmiştir. Rektum 8 741 yeni vaka ve % 3,7 oranıyla diğer kanser türlerinden 8. Sırada yer almaktadır. Rektum kanseri ölüm oranı 4 178 ve %3,3 ile 10. Sırada yer almaktadır. 5 yıllık dağılım değerleri 24 796 ve 100 000'de 29.40 olarak tespit edilmiştir

Türkiyede her yaş ve her cinsiyette kolorektum kanser oranı Şekil 1.2'de verilmiştir (Globancan, 2020).

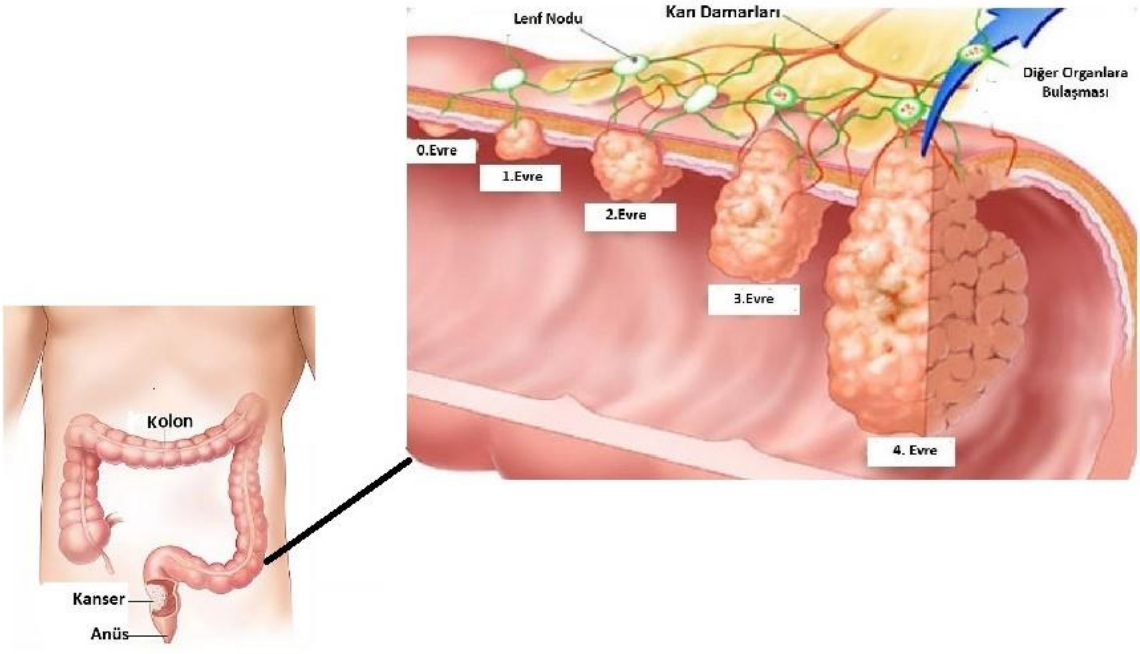


Şekil 1.2 Türkiyede kolorektum kanseri oranı (Globancan, 2020)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hem erkek ve hem de kadınlarda en sık görülen kanser akciğer kanseridir (toplam vakaların %11,6'sı), bunu kadınlarda %11,6 oranıyla meme kanseri ve erkeklerde %7,1 oranıyla prostat kanseri izlemektedir. Kolorektal kanser tanınma açısından %6,1 oranıyla üçüncü sırada, ölüm oranı açısından %9,2 oranıyla ikinci sırada yer almaktadır. 2035 yılına kadar rektum ve kolon kanserinden ölümlerin toplam sayısının sırasıyla %60 ve %71,5 olarak artacağı tahmin edilmektedir (Sawicki vd., 2021).

Kolon kanseri genellikle bağırsak ve kolonda başta polip şeklinde belirir. Kolon kanseri veya kolorektal kanser gelişmesi yıllar alır. Genel olarak, bir polipin kötü huylu bir tümör oluşturması için 10 ila 15 yıl gerekir. Bu nedenle, erken aşamada poliplerin düzenli olarak taranması, saptanması ve çıkarılması çok önemlidir; ancak bu şekilde kolon kanseri önlenebilmektedir. Mevcut tanı, kolon kanseri vakalarının yalnızca %40'ını erken evrelerde saptayabilir. Ameliyat sonrası tedaviyi takiben kolon kanseri yineden tekrarlayabilir (Hossain vd., 2022).
Kolon kanseri evreleri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 Kolon kanseri evreleri

Premalign lezyon olarak iyi tanımlanan adenomatöz polipin, erken hastalıkla alakalı hayatta kalma ile birlikte, kolorektal kanseri tarama için ideal bir araçtır. Şimdiye kadar iki tarama stratejisi mevcuttur: dışkıda gizli kan testi ve endoskopi taramanın temel amacı sporadik kolorektal kanser vakalarının %90'ını saptamaktır. Bunların çoğu 50 yaşın üzerindeki kişilerde görülür. En kapsamlı şekilde incelenen dışkıda gizli kan testi, bu testi en az bir kere yapmış olanların bir kaç rasgele çalışmada kolon kanserini %25 kadar azalttığı tespit edilmiştir. Endoskopi ile tarama tüm kolonu görüntüleme avantajına sahiptir, ancak prosedürün pahalı olması ve bağırsak perforasyonu gibi komplikasyon riski taşımasında uygulanması zordur (Labianca vd., 2010). Kolon kanseri evreleri Tablo 2.1 de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Kolon kanseri evreleri (Freeman, 2013)

AJCC Evre	**TNM Evre**	**Tümör/Düğümler/Metastaz kriterleri**
Evre 0	Tis N0 M0	Mukoza ile sınırlı tümör
Evre I	T1 N0 M0	Mukoza ile sınırlı tümör
Evre I	T2 N0 M0	Tümör muskularis propriayı sarar
Evre IIA	T3 N0 M0	Tümör subserozaya bulaşır
Evre IIB	T4 N0 M0	Tümör bitişik organları işgal eder
Evre IIIA	T1-2 N1 M0	Tümör 1-3 düğüme metastaz yapar
Evre IIIB	T3-4 N1 M0	Tümör 1-3 düğüme metastaz yapar
Evre IIIC	T, N2, M0	Tümör 4 veya daha fazla düğüme metastaz yapar
Evre IV	T or N, M1	Uzak bölgelere metastazlar yapar

AJCC : Amerikan Ortak Kanser Komitesi, TNM: Tümör, Düğüm, Metastaz

Evre I ve II kolorektal kanserli hastalarda en yaygın tedavi cerrahi yöntemdir. Evre III hastalığı olan hastalar, nüks riskini azaltmak için cerrahi ve adjuvan kemoterapi alabilirler. Evre IV metastatik kolorektal kanserin ana tedavisi kemoterapidir. Hedefe yönelik tedavilerin kullanımı, evre IV kolorektal kanseri tedavi etmek için başka bir seçenektir (Liu ve Guo, 2020).

Sitotoksik kemoterapi tipik olarak, nükleotid sentezi için gerekli olan timidilat sentazı inhibe eden 5-fluorourasil (5-FU) gibi pirimidin analogları kullanılır. Kolorektal kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan diğer sitotoksik ilaçlar arasında

topoizomeraz I inhibitörü irinotekan, oksaliplatin ve oral ön ilaç kapesitabin kullanılır (Knickelbein ve Zhang, 2015).

2.1 RAS Gen Ailesi

Ras protein ailesi, kirsten sıçan sarkomu viral onkogen (K-Ras), Harvey sıçan sarkomu viral onkogen (H-Ras) ve nöroblastoma sıçan sarkomu viral onkogen (N-Ras) içeren, yüksek homolog küçük GTPazlardan oluşan bir gruptur. Ras Protein ailesi, çoğalma ve farklılaşmadan göç ve yapışmaya kadar değişen önemli hücresel süreçleri düzenler. Ras geni, sıçan sarkom virüsünde dönüştürücü ajan olarak keşfedilmesinden sonra önemli bir onkogen olduğu anlaşılmıştır. insan kanserlerinin %30'u kadarında rol oynamaktadır. MAPK sinyal yolunun aşırı sinyal aldığı en yaygın yollardan biri RAS proteinindeki mutasyondur. RAS ailesi üyesi olan KRAS, kanserde en sık mutasyona uğrayan onkogenlerdir. KRAS proteinindeki mutasyonlar, tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %40'ında bulunurken, NRAS mutasyonları daha az yaygındır ve %5'lik bir sıklığa sahiptir (Serebriiskii vd., 2019; Sran ve Bedrosian, 2023; Zenonos ve Kyprianou, 2013).

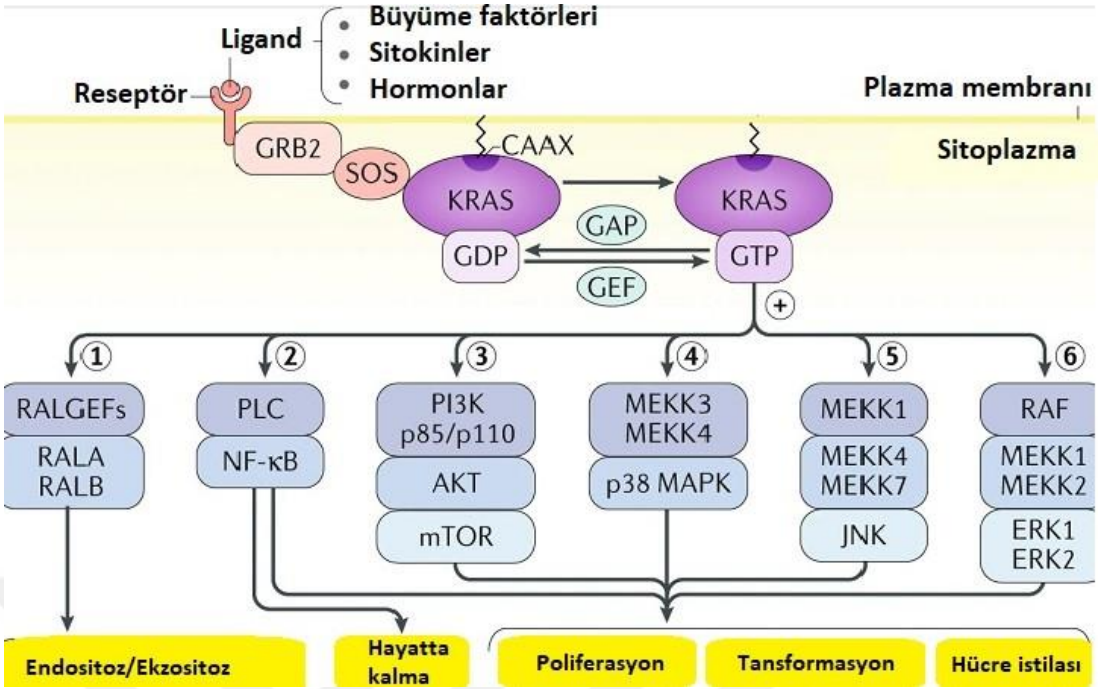
PCR testleri oldukça hassastır ve kolayca uygulanabilir. Bu nedenle PCR testleri , büyük ölçekli, yüksek verimli teşhis testleri için çok uygundur. PCR, KRAS mutasyon için geliştirelen testlerde dahil moleküler teşhis için önemli bir araç olmuştur. Ancak KRAS mutasyon testi için standart PCR testleri yeterli değildir. PCR testi ile kesin KRAS genotiplemesi için, farklı mutant alelleri ile normal aleller arasında ayrım yapması gerekmektedir (van Krieken vd., 2008).

2.1.1 KRAS geni

RAS geni ilk olarak 1964'te virüs kodlu bir gen olarak tanımlandı, daha sonra 1982'de insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan genom kodlu bir onkogen olduğu tespit edildi. KRAS geni, hücre zarı büyüme faktörü reseptörlerini hücre içi sinyal yollarına ve transkripsiyon faktörlerine bağlayarak çeşitli hücresel işlemler için moleküler bir anahtar görevi gören küçük bir GTPaz olan KRAS proteinini kodlar. KRAS'ta kanser türlerinde görülen en sık mutasyondur, pankreatik duktal

adenokarsinomların (PDAC'ler) %96'sına kadar, kolorektal karsinomların %52'sine, akciğer adenokarsinomlarının %32'sine ve endometrial karsinomlar gibi diğer tümör tiplerinde daha düşük oranda meydana gelir. Genellikle 12, 13 ve 61. kodonlarda meydana gelen bu mutasyonlar, GTP'nin GDP' ye dönüşmesini önleyerek, proteinleri aktif bir duruma getirir. Sonuç olarak, hücre çoğalması, apoptoz ve hücre göçü gibi süreçleri kontrol eden çok sayıda RAS efektör yolu aktive edilerek hücre sistemi bozulur (Buscail vd., 2020; Merz vd., 2021; Pollock vd., 2005; Ryan ve Corcoran, 2018; Tang vd., 2021).

KRAS gen mutasyonları ekson 2'de kodon 12 ve kodon 13'te yaklaşık %85-90 oranında, kodon 61'de %5 ve kodon 146'da %5 oranında bulunmuştur. KRAS gen mutasyonlarının, kolorektal kanser hastalarda tedavi seçiminde etkisi vardır. Birkaç çalışma, KRAS mutasyonlarının anti-EGFR monoklonal antikora karşı dirence neden olduğunu bildirmiştir. KRAS mutasyonları, terapide zayıf yanıtla ilişkilendirilmesiyle birlikte KRAS mutasyonları EGFR/HER reseptörünün yukarı akışı uyarılması olmadan, sinyal yolarından aşağı yönde aktivasyon sağlar. Bu nedenle EGFR ligandı olarak kullanılan monoklonal anti-EGF antikoru ile tedavi işe yaramayacaktır. Ayrıca, kolorektal kanserin çoğunluğu (%80) herhangi bir yanıt vememe durumuyla, immün kontrol noktaları blokaj tedavisine yanıt alınmamaktadır. Bu nedenle, yeni terapötiklerin tanımlanmasına acil ihtiyaç vardır (Lam vd., 2023; Mastutik vd., 2018; Prenen vd., 2010). KRAS efektör yolları Şekil 2.2 verilmiştir.

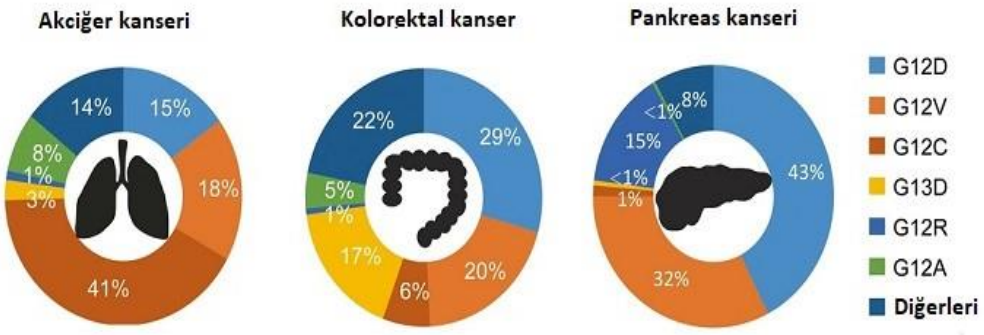


Şekil 2.2 KRAS efektör yolları (Buscail vd., 2020)

2.1.2 KRAS geninin doğrudan hedeflenmesi

KRAS'ın mutant alt tipleri temel olarak $KRAS^{G12D}$, $KRAS^{G12V}$, $KRAS^{G12C}$, $KRAS^{G13D}$, $KRAS^{G12R}$ ve $KRAS^{G12A}$ mutasyonları veya KRAS normal tip amplifikasyonu olarak sınıflandırılır. Çoğu KRAS mutasyonu, glisini kodon 12'deki diğer amino asitlerle değişimiyle gerçekleşmiştir. Örneğin, pankreas tümörlerinin %90'ının $KRAS^{G12D}$ (aspartik asittin glisine yer değiştirmesi) ve $KRAS^{G12V}$ (valin glisine ile yer değiştirmesi) mutasyonlarını taşıdığı bulunmuştur. Kolorektal kanserde en yaygın KRAS mutasyonu $KRAS^{G12D}$ 'dir (Cox vd., 2014; Rathod vd., 2023).

KRAS mutasyonun en çok görüldüğü kanser çeşitleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 KRAS'ın en çok görüldüğü insan kanserlerinde mutasyon tipleri ve oranı

Mutasyonların sıklığı kanser tipine ve yerine göre değişir. Örneğin, $KRAS^{G12C}$, akciğer kanserinde KRAS mutasyonlarının yaklaşık yarısını oluştururken, $KRAS^{G12D}$, pankreas kanseri ve kolorektal kanserde daha büyük oranda bulunarak, KRAS mutant popülasyonunun yaklaşık üçte ikisini oluşturmaktadır. Son olarak, kanser tedavisi için mutasyona uğramış KRAS'ı hedeflemedeki büyük başarıyı temsil eden ve KRAS'ın yenilmez olduğu mitini yıkan sotorasib (AMG510) ve adagrasib, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi için oral $KRAS^{G12C}$ inhibitörleri olarak FDA tarafından onaylanmıştır. $KRAS^{G12C}$'yi başarılı bir şekilde hedeflemek, diğer KRAS mutasyonlarını da doğrudan hedeflemek için inhibitörlerin geliştirilmesi inancı artmıştır (Rathod vd., 2023; H. Wang vd., 2023).

Alel seçici $KRAS^{G12C}$ inhibitörleri, KRAS efektör yolundaki hedeflere etki eder. Fazlalıklar ve karşılıklı bağımlılıklar, kinazlar hedeflemeyi daha az etkili hale getirir. Örneğin KRAS, BRAF-MEK1/2-ERK1/2 yoluyla veya belirli koşullar altında alternatif bir MEKK2/3-MEK5-ERK5 mekanizması aracılığıyla sinyal ileterek MAPK kademesini devreye alabilir (Sattler vd., 2023).

anti-KRAS siRNA ilaçları, klinik öncesi çalışmalarda önemli sonuçlar göstermiştir. Örneğin, KRAS G^{12D} mutantına özgü siRNA, pankreatik duktal adenokarsinomaya karşı bir antitümör etkisi göstermiştir. Bu sonuçlar, siRNA'nın KRAS hedeflemesi için umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmüştür (C. Wang vd., 2023; Zorde Khvalevsky vd., 2013).

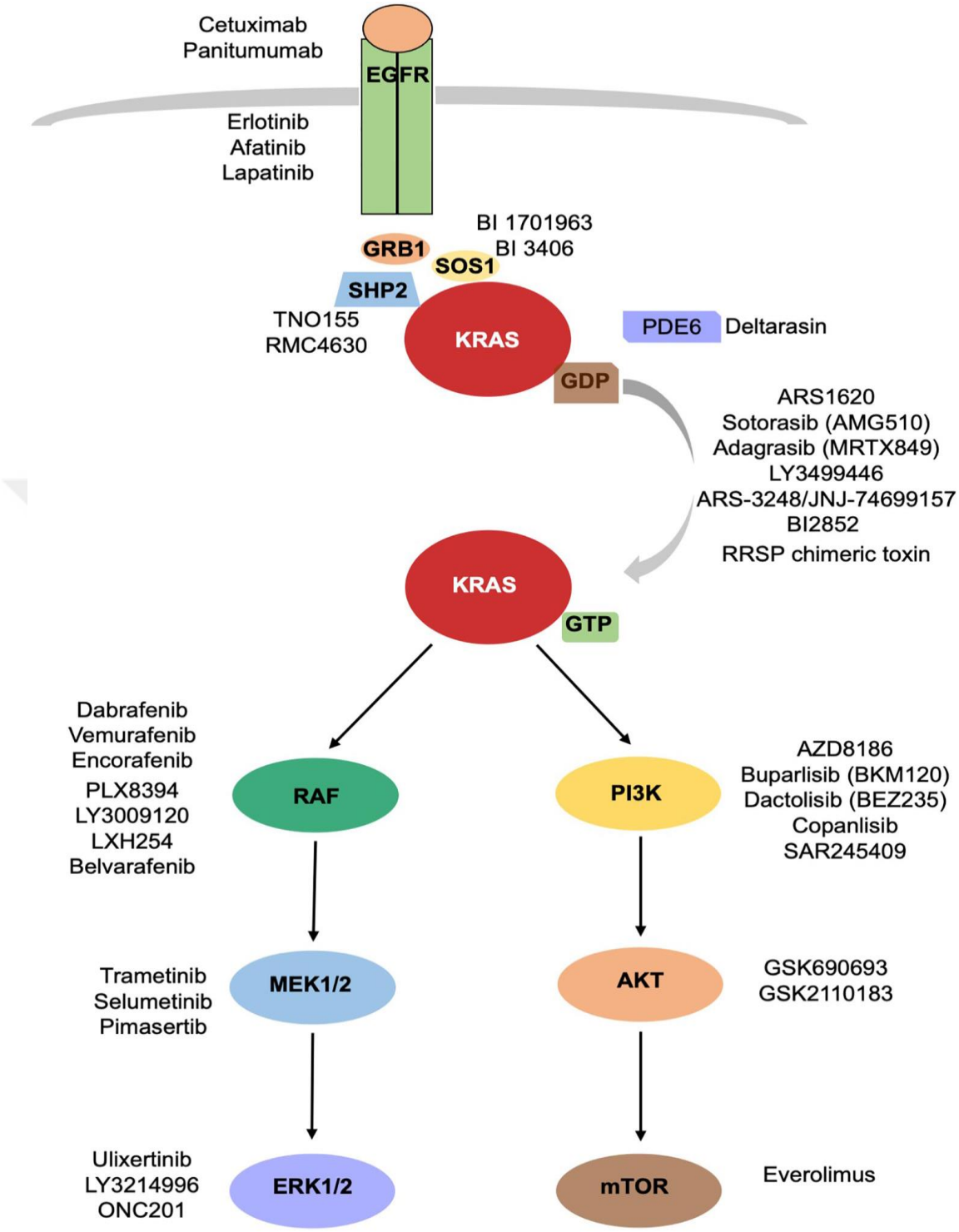
2.1.3 KRAS geninin dolaylı yoldan hedeflenmesi

KRAS sinyal girişiminde, KRAS yolunun yukarı akış aktivatörlerini veya aşağı akış efektörlerini hedeflemeyi amaçlayan farklı stratejiler geliştirilmiştir. KRAS mutant proteinlerinin doğrudan hedeflenmesi güçlü bir araçtır ancak KRAS mutant kanserlerin tedavisi için tek seçenek değildir. Diğer MAPK yolu bileşenlerinin inhibisyonu, dolaylı olarak KRAS mutasyonlu kanserleri hedefleyebilir. Böyle bir bileşen, MAPK yolundaki RAS'ın aşağısında bulunan MEK proteinidir. MEK'i hedef alan ilaçlar kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve bazıları halihazırda FDA tarafından melanom, nörofibrom, tiroid karsinomu ve küçük hücreli olmayan akciğer için onaylanmıştır (Tria vd., 2023).

Bir RTK olarak EGFR, hücre çoğalması ve göçünde hayati bir rol oynar. EGFR'nin sinyal iletiminin çoğunun, MAPK ve PI3K'nın aktivasyonunu ve sinyal iletimini uyaran plazma zarında meydana geldiği düşünülmektedir. Ligand aracılı EGFR aktivasyonu konformasyonel değişikliklerle, ligand bağlanmasını takiben reseptörün hücre dışında reseptör dimerizasyonuna ve asimetrik dimerleri oluşturan kinaz alanlarının oluşumuna yol açar. Translasyon sonrası KRAS ve membran bağlama işlemlerinin aşağı akışı dışında, diğer önemli hedefler KRAS protein mutasyonu ile aktive edilen sinyal yollarıdır. Bu yollardan biri RAF-MEK-ERK yoludur ve birkaç MEK inhibitörü geliştirilmiştir (Lito vd., 2013; Zhu vd., 2022)

KRAS kaskadı yukarı ve aşağı akış inhibitörleri Şekil 2.4'de verilmiştir (Merz vd., 2021)

Çeşitli düzensiz sinyal yolları arasında, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal zincirine ait olan PI3K-AKT-mTOR yoludur. EGFR, kolorektal kanserin ilerlemesi ve metastazına nedensel olarak bağlı olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. RAS-hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolunun anormal aktivasyonu, kolorektal kanserde önemli bir rol oynar. Bu yollardaki proteinler siRNA, miRNA ve diğer terapotik ilaçlarla hedeflenirse, dolaylı yoldan KRAS inhibisyonunu sağlayacaktır (Jeong vd., 2018; Xie ve Wang, 2022).



Şekil 2.4 KRAS sinyal kaskadı yukarı akış ve aşağı akış inhibitörleri (Merz vd., 2021)

2.1.4 RAS/MAPK yolu

Başlangıçta hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu olarak bilinen MAPK yolu, ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu sinyal yolu, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması ve göçü gibi hücresel süreçleri kontrol eder. MAPK yolunun aktive edilebildiği birçok mekanizmadan biri, bir ligandın reseptör tirozin kinaz (RTK) gibi bir membran reseptörünün hücre dışı alanına bağlanmasıdır. Bu, RAS proteini, RAF proteini, MEK1/2 kinazlar ve son olarak ERK proteininin müteakip fosforilasyonundan oluşan tipik MAPK sinyal zincirini başlatır (Hendrikse vd., 2023; Korzeniecki ve Priefer, 2021).

2.2 RNA İnterferans(RNAİ)

RNA etkileşimi (RNAi), ökaryotlarda anti-viral savunma ve gen ifadesinde merkezi bir düzenleyici süreçtir. 1998 ilk kez kodlamayan çift sarmallı RNA'nın *Caenorhabditis elegans*'ta (yuvarlak kurt) transkripsiyon sonrası gen susturma üzerinde güçlü ve spesifik etkilere sahip olduğu bildirildi. Kodlanmayan çift sarmallı RNA, küçük engelleme yapan RNA (siRNA) susturma RNAi olarak adlandırılmıştır (Fire vd., 1998; Hui vd., 2022).

RNA interferans, miRNA, kısa engelleyici olarak bilinen siRNA , shRNA'lar ve dsiRNA'lar gibi RNA'ların sunması yoluyla çalışır (Bobbin ve Rossi, 2016; Nandety vd., 2015).

RNAi, kısa (~22 nt), küçük engelleyici RNA'lar (siRNA'lar) olarak bilinen çift sarmallı RNA fragmanları RNA-İndüklenmiş susturma Kompleksine (RISC) yüklendiğinde , iplikçiklerin ayrıldığı ve bir iplikçik, dizi homolojisine bağlı bir şekilde hedef mRNA'ların Argonaute tarafından bölünmesine aracılık eder (Gavrilov ve Saltzman, 2012).

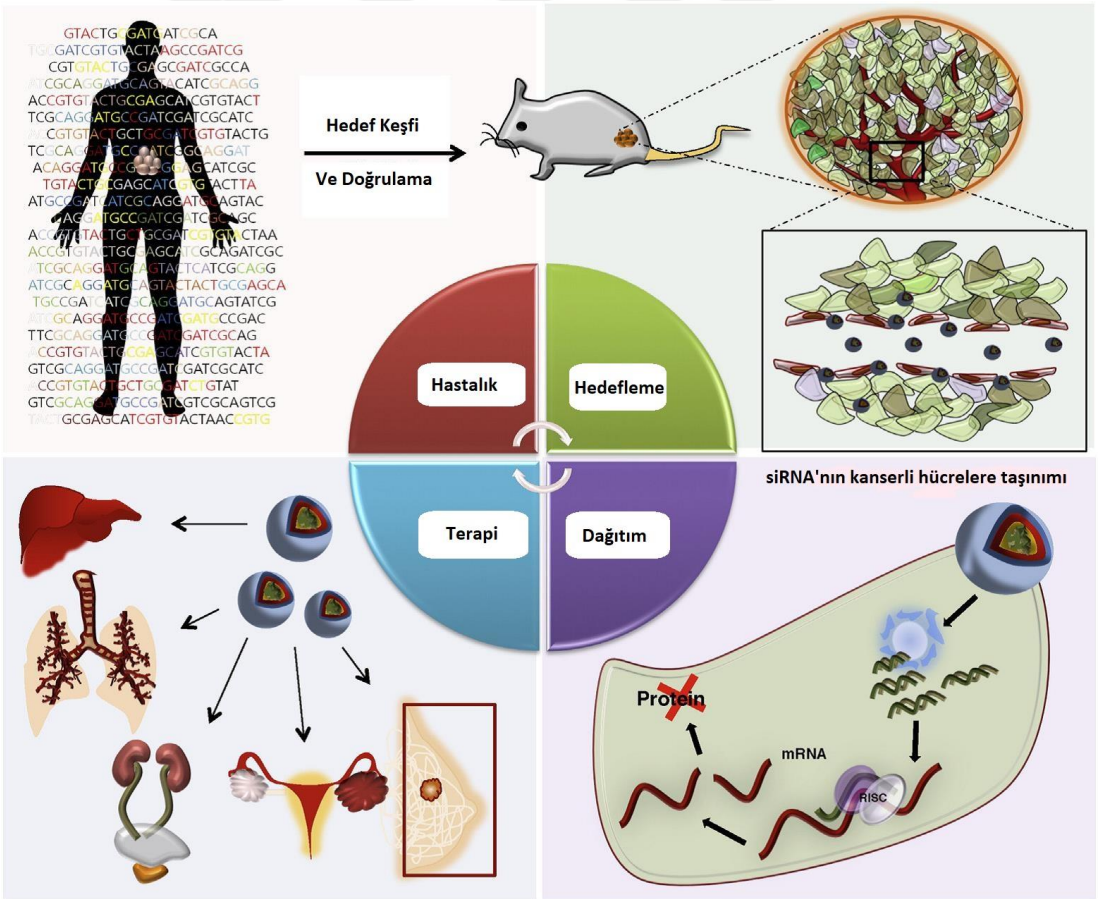
2.2.1 ShRNA

siRNA'ların aksine shRNA'lar, hücrelerin çekirdeğinde sentezlenir, daha fazla işlenir ve sitoplazmaya taşınır ve daha sonra aktivite için RISC'ye dahil edilir (Rao vd., 2009).

2.2.2 siRNA

siRNA terapötikleri birçok iniş ve çıkışlar yaşamıştır. 2001'de Tuschl vd., kimyasal olarak sentezlenmiş siRNA'yı memeli hücrelerine entegre ederek, belirli bir genin ifadesini başarılı bir şekilde susturarak, gelişimsel bir yükselişin ortaya çıkmasına yol açtılar.

siRNA tedavisi bir zamanlar stabilitesi, özgüllüğü ve iletimindeki engeller nedeniyle zarar görmüş olsa da, kimyasal modifikasyon ve teslimattaki ilerlemeler, alanı son yıllarda yeniden sağlam ve hızla gelişen bir araştırma alanı haline getirdi. 2018' de yetişkinlerde polinöropati ile kalıtsal amiloidojenik transtiretin (hATTR) amiloidoz tedavisi için ilk ticari RNAi bazlı terapötik olarak FDA tarafından onaylandı (Hu vd., 2020). Kanser tedavisi için siRNA terapötiklerinin geliştirme süreci Şekil 2.5'de verilmiştir (Lee vd., 2016).

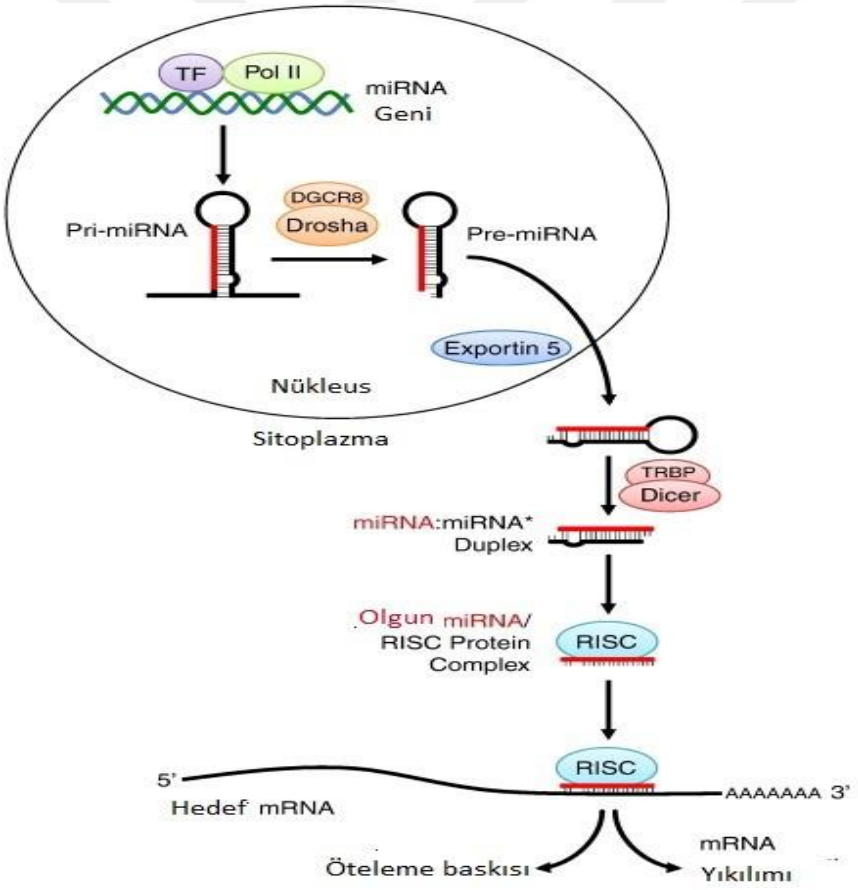


Şekil 2.5 Kanser tedavisi için siRNA terapötiklerinin geliştirme süreci (Lee vd., 2016).

2.2.3 miRNA

Kodlayıcı olmayan RNA'ların bir alt kümesi olan mikroRNA'lar veya miRNA'lar, hedef mRNA'ların bölünmesini transkripsiyon sonrası düzenlediği veya sadece çevirilerini baskıladığı düşünülen ~22 nt uzunluğunda endojen olarak başlatılan kısa RNA molekülleridir. MikroRNA'lar (miRNA'lar), çeşitli mekanizmalar yoluyla gen ifadesini düzenleyen kodlanmayan RNA molekülleridir. Kanıtlar, miRNA ifadesini ve aktivitesini geri yükleyen veya baskılayan miRNA tabanlı tedavilerin büyük umut vaat ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların hedef dokulara etkili bir şekilde iletilmesi, miRNA tedavisinin kliniğe geçişinde büyük bir zorluktur (Cai vd., 2009; Ganju vd., 2017).

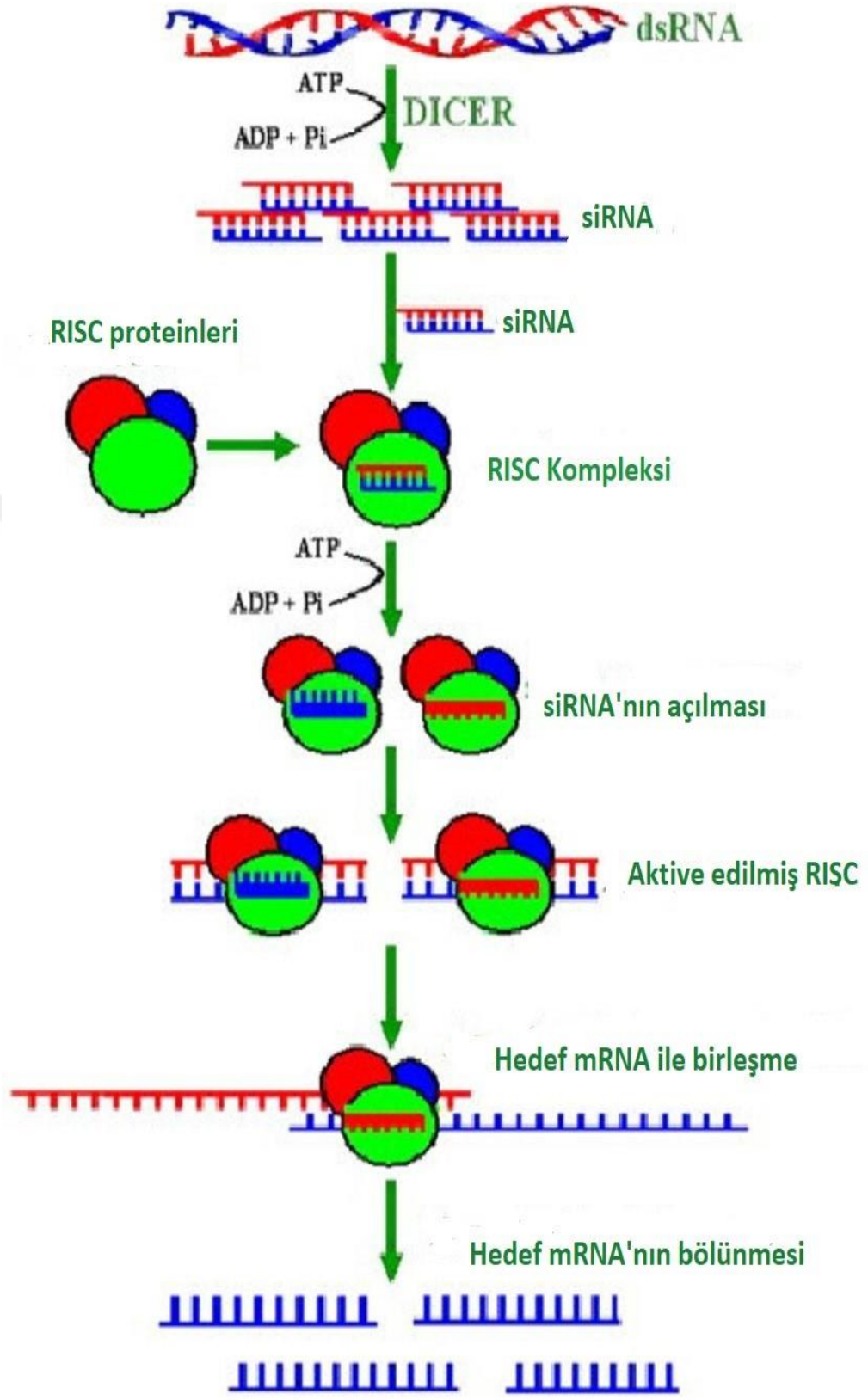
Genomdan miRNA oluşumu Şekil 2.6 'da verilmiştir(Gurtan ve Sharp, 2013)



Şekil 2.6 miRNA oluşum mekanizması(Gurtan ve Sharp, 2013)

2.3 RISC Mekanizması

RNA müdahalesi, ökaryotik biyolojinin birçok yerinde kullanılan, hücrenin savunma ve düzenlemede kullandığı bir gen susturma mekanizmasıdır. RNA interferansına moleküler düzeyde, hemen hemen her gen dizisini hedeflemek üzere programlanabilen, RISC olarak adlandırılan bir ribonükleoprotein kompleks ailesi görev alır (Pratt ve Macrae 2009). Dicer enzimi, RNAi mekanizması, dsRNA işlemeyi içerir, dicer'in süreçte önemli bir bileşen olarak hareket ettiği mRNA bozunmasını içerir. Dicer, RNase III familyası enziminde yer alan bir ribonükleazdır ve işlevleri dsRNA'nın küçük engelleyen RNA (siRNA) adı verilen kısa çift sarmallı RNA fragmanlarına işlenmesidir (Mahmood-ur-Rahman vd., 2008). RISC mekanizması Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7 RISC mekanizmanın çalışma (Husnain, ve Riazuddin 2008)

2.4 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji ve moleküler biyoloji kombinasyonu ile oluşan nanobiyoteknoloji yeni bir araştırma alanına dönüşmüştür. Nanopartiküller (NP), genel olarak 1-1000 nm aralığı uzunluğunda malzemeler olarak, ancak yaygın olarak boyutları 1-100 nm aralığında olarak tanımlanmaktadırlar (Jeevanandam vd., 2018). Manyetik nanopartiküller (MNP) ise manyetik alan varlığında kontrol edilebilme ve izlenebilme özelliğine sahip olmalarından dolayı ilaç, biyoteknoloji, detoksifikasyon ve biyomühendislik gibi birçok alanda büyük öneme sahiptir. Demir bazlı manyetik nanoparçacıklar stabilite, biyouyumluluk ve manyetik alana duyarlılık gibi benzersiz özelliklerinden dolayı detaylı olarak incelenmişlerdir (Kansara vd., 2018).

2.5 Vektörler

Gen tedavisi, bir hastaya spesifik hücre fonksiyonunu değiştiren genetik materyalin verilmesiyle genetik bir hastalığın tedavisidir. Gen terapisindeki anahtar adım, vektörler adı verilen gen transfer araçları tarafından gerçekleştirilen, hedef doku/hücrelere etkili gen aktarılmasıdır. İki tür vektör vardır: viral ve viral olmayan (Bulcha vd., 2021).

Gen terapi aracı olarak siRNA, yüksek gen susturma ve düşük toksisitesi nedeniyle araştırma ilgisi kazanmıştır. Bununla birlikte, siRNA'nın klinik uygulaması, siRNA'nın hücrelere düşük oranda aktarılması, bozulmaya yatkınlık ve tümör dokularını hedefleyememe gibi kritik zorluklar vardır. Bu bağlamda, siRNA'yı verimli bir şekilde iletebilen taşıyıcılara ihtiyaç vardır (Tong vd., 2023)

2.6 Viral Vektörler

Vektör olarak gen taransferinde yaygın kullanılan virüsler arasında adenovirüs, retrovirüs ve lentivirüs bulunmaktadır. İstenmeyen viral biyolojik dağılım, viral vektörlerin lokalize enjeksiyondan sonra distal organlara hareket ettiğini gösteren raporlar olduğundan, viral gen terapi sistemleriyle ilgili başka bir güvenlik endişesidir (Hakim vd., 2023).

Virüsler, kendi genetik bilgilerini kendi replikasyonları için konakçı hücrelere aktarmada çok etkilidir. İşe yaramayan viral genleri, terapötik açıdan ilgili yabancı

genlerle değiştirerek, enfekte edecekleri hücre tipini dönüştürmek için rekombinant viral vektörler kullanılabilir. Virüsler bir konakçı bağışıklık tepkisini tetikleyebilmelerine rağmen, aynı zamanda etkili karşı önlemler geliştirmişlerdir, böylece hedef hücrelerine kolayca ulaşmaları ve burada çoğalmalarını sağlayabilmektedirler (Bouard vd., 2009)

2.6.1 Adenovirüsler

Adenovirüsler (Ad), çift sarmallı bir DNA genomuna sahip zarfsız virüslerdir. Birden fazla Ad serotipi vardır, ancak Ad2 ve Ad5 en sık kullanılan serotiplerdir. Adenovirüs vektörleri, gen terapisi deneyleri için hem önemli avantajlara hem de dezavantajlara sahiptir. Avantajı kolay entegre olma, büyük transgen kapasitesi; ve çeşitli hücre tiplerini dönüştürme yeteneği, dezavantajı ise Adenovirüs vektörlerinin kullanılması, yüksek oranda immünojenik olmalarıdır; bu durum transgen ekspresyonunun kaybına neden olur (Hunter vd., 2017).

2.6.2 Lentivirüsler

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) tip 1'e (HIV-1) dayalı lentivirüs vektörleri, gen terapisi alanında önem kazanmıştır. HIV-1'den türetilen vektörlerin önemli bir özelliği, bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme yetenekleridir. Gen aktarması için kullanılan lentivirüsler hematopoietik hücrelerde lentivirüs vektörü için genomik yerleştirme bölgelerinin analizinde genotoksisite olmadığını göstermiştir. Lentivirüs vektörleri ayrıca sentral sinir sisiteminde RNA susturmanın gen terapisi uygulamalarına tabi tutulmuştur (Lundstrom, 2018; White vd., 1999).

2.6.3 Retrovirüsler

Retroviral vektörler, gen terapisi için yaygın olarak kullanılmıştır. Milyonlarca yıl boyunca gen aktarım mekanizmalarını geliştiren doğal retrovirüslerden türemişlerdir. Retroviridae ailesi ait retrovirüsler ters transkriptaz enzimi tarafından DNA'ya retrokripsiyona dönüştürülen RNA genomları ile karakterize edilir. Bu DNA, konakçı hücre genomuna entegre edilerek, enfekte olmuş hücreler tarafından uzun bir süre için viral gen ekspresyonuna izin vermektedir (Morgan vd., 2021; Vargas vd., 2016).

2.7 Viral Olmayan Vektörler

Küçük engelleyici RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) dahil olmak üzere DNA, mRNA ve kısa çift sarmallı RNA'yı iletmek için çeşitli viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Bu vektörlerin serum endonükleazları tarafından bozulmasını önlemesi ve bağışıklık tespitinden kaçması gibi özelliklerinin olması gerekmektedir (H. Yin vd., 2014).

Viral vektörlerin sınırlamaları, viral olmayan dağıtım yöntemleri kullanılarak potansiyel olarak aşılabilir. Örneğin, sentetik polimerler, lipit katyonları, lipozom bazlı nanoparçacıklar ve polisakkaritler iyi transfeksiyon verimliliği gösterirler (Sharma ve Paschalis, 2022).

2.7.1 Lipozomlar

Lipozom yapılarına göre, çift tabakaların boyutuna ve sayısına göre dört kategoriye ayrılırlar: küçük tek katmanlı veziküller (SUV), büyük tek katmanlı veziküller (LUV), çok katmanlı vezikül (MLV) ve çok veziküller veziküller (MVV). Lipozomlar, kolesterol ve doğal, toksik olmayan fosfolipidlerden oluşan küresel şekilli küçük yapay veziküllerdir. Boyutları, hidrofobik ve hidrofilik karakterleri nedeniyle biyouyumluluğun yanı sıra, lipozomlar ilaç salımı için umut verici sistemlerdir. Birkaç etkili yeni ilaç verme sistemi arasında lipozomlar, aktif molekülleri hedef bölgeye iletmek için ileri bir teknolojiyi karakterize etmesiyle, birkaç formülasyonu klinik uygulamlarında kullanılmasıyla pazara girmiştir (Akbarzadeh vd., 2013; Nsairat vd., 2022).

Lipozomlar tipik olarak sonikasyon, mekanik karıştırma veya ekstrüzyon yöntemleriyle hazırlanmaktadır. Ancak hiçbiri tek dağılmış lipozomların sentezini ve boyut kontrolünü sağlayamamaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda lipozomların hazırlanması için bu yöntemlerden tercih edilmemektedir. Dikkatler mikroakışkan yöntemlere odaklanmaktadır (Choi vd., 2023).

siRNA hücrelere gönderimi için yüzlerce lipid bazlı dağıtım sistemi geliştilmiştir. Çünkü bu sistemler, siRNA'nın enzimlerin parçalamasından korunmaları, böbrek temizliğinden korunması, biyobozunur ve kolay üretilebilme avantajları vardır (Aghamiri vd., 2019).

Hem Pfizer hem de Moderna COVID-19 aşılarında kullanılan lipozomun bir bileşeni olan 1,2-Distearoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC)'nin güvenliği incelenmiştir. Farelerde yapılan araştırmalar, klinik belirtiler bulunmadığından insanlar için de muhtemelen toksik olmadığına karar verilmiştir. Lipozomların terapötik ajan olarak kullanılması güvenli olduğu ileri sürülmüştür (Halma vd., 2023).

2.7.2 Manyetik nanopartiküller

Günümüzde, manyetik nanopartiküller (MNP'ler) ilaç salımı, biyogörüntüleme, teşhis analizleri gibi biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fe_2O_4, $NiFe_2O_4$ ve $MnFe_2O_4$ gibi yüksek manyetik momentli bileşiklerle karıştırılan oksit nanopartiküller, diğer manyetik malzemelere kıyasla üstün performans sergilerler. Ancak kullanılan bu yapıda nanopartiküller, yüksek toksik olmaları nedeniyle in vivo ve in vitro biyomedikal uygulamalar için kullanımları sınırlanmıştır. Özellikle manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (γ-Fe_2O_3) gibi demir oksitler yüksek manyetik momentlere sahip ve nispeten güvenlidir ve şu anda MRI kontrast maddeleri olarak klinikte kullanılmaktadırlar (Kami vd., 2011).

Bağlı partikül/terapötik ajan kompleksi, genellikle hedef bölgesine konumlandırmak için kana verilir. Yüksek manyetik alanlar, hedef bölgede parçacıkları tutarak ve geçisine izin vererek etki eder. Bu durum vücudun yüzeyine yakın hedefler için etkili olsa da, vücudun daha derinlerindeki bölgelerin hedeflenmesi manyetik alan gücü mesafeyle hızla düşmesiyle zor hale gelmektedir (McBain vd., 2008).

Manyetik alana yanıt verebilen manyetik nanopartiküller, manyetik alan aracılığıyla kolayca manipüle edilebilir. Nanopartiküller manyetik alanla güçlendirilmiş benzersiz özellikleri nedeniyle gen iletimi ve gen terapisi için araştırılmaktadır. 1 ila 100 nm arasında değişen tekdüze ve kontrol edilebilir boyuta sahip olan MNP'ler, gen transfeksiyonları için hücresel zarlardan kolayca geçebilirler ayrıca ilaç dağıtımını kontrol etmede işe yarayacak manyetik rezonans görüntüleme özelliğini gösterirler (Xing vd., 2014)

Bu çalışmada, yeni sentezlenen süper manyetik demiroksit nanopartikülerinin (SPION) siRNA taşınmasında sitemin bir parçası olarak lipozom nanopartiküllerine entegre edilmesi ve KRAS genini susturmak için araç olarak kullanılması

amaçlanmıştır. Ayrıca sonraki çalışmalarda araştırmacılar için, demiroksit nanopartiküllerin özelliklerinden yararlanarak , terapotik ilaçların etkin taşıma ve hedeflemesinde yardımcı bir kaynak olacağı düşünülmketedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmaların yapılmasında, geçerli ve güvenirliği yapılmış literatür çalışmalarında test edilmiş, biyolojik kimyasal maddeler, cihazlar kullanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmalar, demiroksit nanapartikül sentezi, lipozom sentezi ve siRNA yüklenmesi Dicle Üniversitesi Fen Fakultesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır. Hücre çalışmaları Dicle Üniversitesi bağlı DÜBTAM Genetik Mühendisliği laboratuvarında yapılmıştır. Kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan Cihazlar

Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini	Thermo SAFE 2020 1.2 CLAS II
Karbondioksitli İnkübatör	Thermo Scientific
Mikroplate Okuyucu	Thermo Multi Scan Go,
Faz-Kontrast Mikroskop	Carl Zeiss Primo Vert
Su Banyosu	Stuart Swb24d
Real Time Pcr Cihazı	Roche LightCycler 480II
Thermal Cycler	Eppendorf Mastercycler
Hassas Elektronik Tartı	Weightlab instruments
-80°C Derin Dondurucu	Thermo
Ph Metre	Hanna
Rotatory Evaporatör	İKA
Ultra Saf Su Cihazı	Direct-Q® 3 UV
Görüntüleme Sistemi	Chemidoc™, Biorad
Santrifüj	Thermo
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	İka C-Mag Hs 7
Vorteks	Scılogex
Agaroz Jel Tankı	Biorad

3.1.2 Kullanılan malzemeler ve markaları

Kullanılan malzemeler, önceki yapılan çalışmalardan kullanımları ve hatasız sonuç vermelerine göre belirlenmişlerdir. Çalışmada kullanılan malzeme ve markaları Tablo 3.2'de verilmiştir.

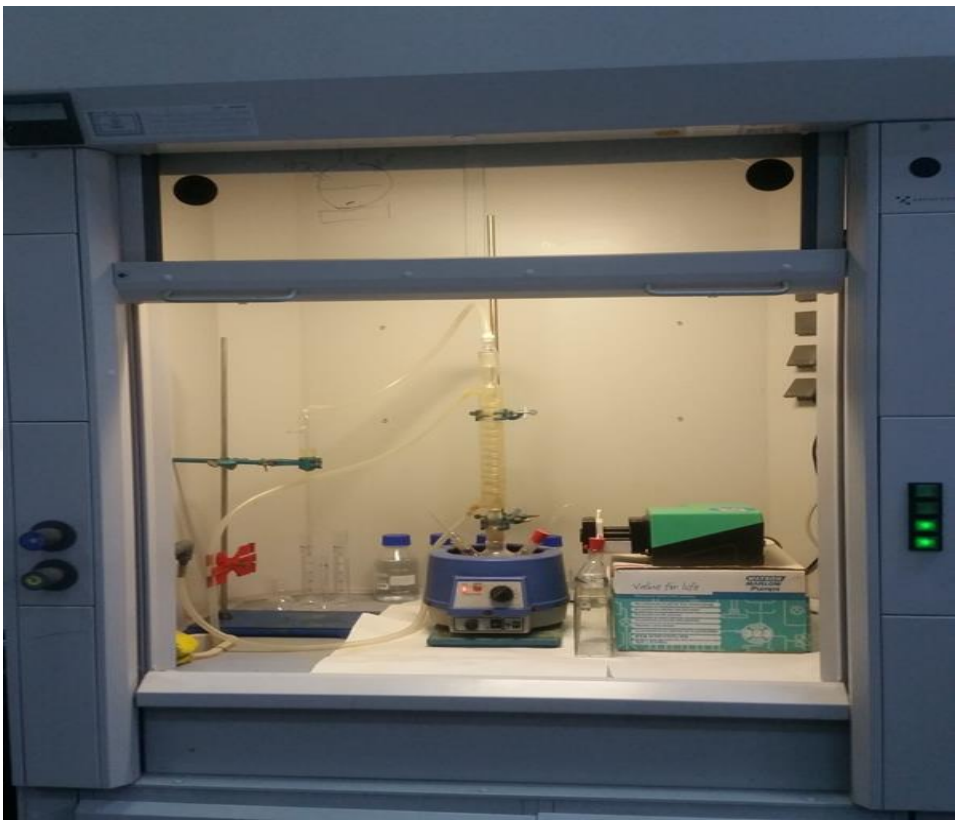
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan malzemeler ve markaları

FeCl2.4H2O	Sigma Aldrich
FeCl3.6H2O	Sigma Aldrich
Sitrik Asit	Sigma Aldrich
Polietilenglikol (PEG1000)	Sigma Aldrich
DSPC	Avanti molar
DC-Kolesterol	Avanti molar
RPMI 1640	Sigma Aldrich
DMEM	Sigma Aldrich
FBS(Fetal sığır serum)	Serox
Penisilin – Streptomisin	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA	Thermo
MTT	Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich
Kloroform	Sigma Aldrich
RNA izolasyon kiti	Roche
cDNA sentez kiti	abm
Sybergreen 1 RT-PCR kiti	Roche
Trypan Blue	Sigma Aldrich
Annexin V apoptozis tespit kiti	Sigma Aldrich
K-Ras siRNA	Dharmacon
5x siRNA tamponu	Dharmacon
Nükleaz içermeyen steril su	Sigma-Aldrich

3.2 Metot

3.2.1 Demir oksit nanopartiküllerin sentezi

Sentez için birlikte çökertme yöntemi kullanıldı. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ demir tuzları 2:1 mol oranında tartılarak, 50 ml suda çözünmesi sağlandı. Çözelti 3 boyunlu balon jojeye alınarak, nanopartikul sentez düzeneğinde 70 ºC de manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılması sağlandı. Daha sonra 0,1/ dk hızında üzerine damla şeklinde 10 ml NH_4OH (%5, v/v) ilave edildi. Siyah çökelti oluşana kadar işlem devam ettirildi. (Kılınç, 2016) Nanopartiküllerin sentezleniği düzenek Şekil 3.1'de verilmiştir.

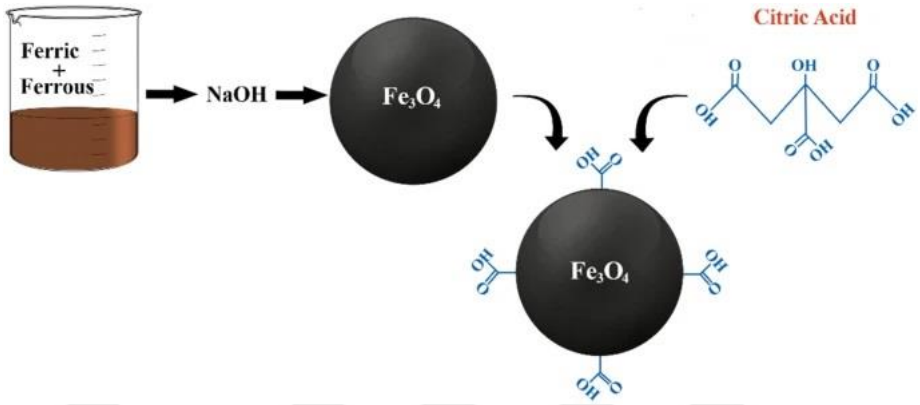


Şekil 3.1 Manyetik nanopartikül sentez düzeneği

3.2.2 Sentezlenen demiroksit nanopartiküllerinin sitrik asit kaplanması

Oluşan super manyetik demiroksit nanopartikullerinin topaklanmasını önlemek ve yüksek stabilite durumunu sağlamak için**,** 70 ºC manyetik karıştırlması devam eden nanopariküllere 100 mg sitrik asit (CA) eklenerek karışmasına devam ettirildi. Daha sonra bir gece inkübe edilerek, ɤ-Fe_2O_3 (ɤ-Fe_2O_3–CA) magnet yardımıyla ortamdan alındı. ilk olarak saf su ile yıkama işleminden sonra nanopartiküller mıknatısla ortamdan alındı. Aynı işlemler etil alkol ve aseton ile yıkamada da tekrarlandı.

Yıkama aşamasında nanopartikülleri toplamak için magnet kullanıldı. Daha sonra elde edilen nanopartiküller etüvde kurumaya bırakıldı. Demiroksit nanopartiküllerin sitrik asit ile kaplanması kimyasal yapıları Şekil 3.2 ‘de gösterilmektedir.



Şekil 3.2 Demir oksit nanopartiküllerin sitrik asit ile kaplanması (Ikhmayies, 2014)

3.2.3 Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon

Nanomalzemeler şekil, boyut, bileşim, yüzey özellikleri, moleküler ağırlık, çözünürlük ve stabilite açısından farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptir.

Bu özellikler fizyolojik davranışlarını belirleyen kritik faktörlerdir; bu nedenle nanomalzemelerin karakterizasyonu, nanotıp geliştirme sürecinde kalite ve güvenliği doğrulamak için vazgeçilmezdir. Çünkü in vivo dağılımı ve davranışı etkileyen benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptirler (Krishnan, 2020). Nanomateryalleri karakterize etmek için, elektron mikroskobu, özellikle taramalı prob mikroskopları, atomik kuvvet mikroskopisi, x-ışını kırınımı, nötron kırınımı, x-ışını saçılması, x-ışını floresans spektrometrisi, akustik dalga tekniği, temas açısı ölçümleri ve çeşitli spektroskopiler kullanılabilecek teknikler arasındadır (Ikhmayies, 2014).

3.2.4 Transmisyon elektron mikroskopu (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), uzun yıllar boyunca birçok bilimsel disiplinde yaygın olarak kullanılan oldukça gelişmiş bir alete dönüşmüştür. Nanoyapılı malzemelerin özelliklerini anlamak ve davranışlarını manipüle etmek için, TEM, atomik boyutlar düzeyine kadar bir dizi uzunluk ölçeğinde yapısal ve kimyasal bilgi sağlama konusunda benzersiz bir yeteneğe sahip olduğundan, bilim insanları için kullanılması vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu

(TEM), ince bir numuneden iletilen bir elektron demeti ile elde edilen görüntüleri sağlar, böylece numunenin içinin ayrıntılı olarak görselleştirilmesine olanak tanır (Malatesta, 2021; D. Smith, 2015).

Görüntüler, Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Merkezindeki TEM cihazıyla alındı. Kücük ince plaklara sırasıyla LP, MNP, LP-MNP-siRNA küçük plaklara damlatıldıktan 10 dk sonra görüntüleri alındı.

3.2.5 Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre (FTIR)

FTIR cihazı, bir zardaki fonksiyonel grubun belirlenmesi için, kimyasal bileşikler arasındaki olası moleküler bağlarla birlikte gösteren en güçlü araçlardan biridir. Spektrumdaki IR absorpsiyon bantlarının konumlarının dalga sayıları olarak anlaşılması, X-ışını fotoelektronunda spektroskopi spektrumlarıyla saptanamayan çeşitli kimyasal bileşenlerin (örneğin aromatik amidler) tanımlanması için kullanılabilir (Mohamed vd., 2017).

Görüntüler, Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi laboratuvarında bulunan cihaz ile çekildi. Sırasıyla LP, MNP, LP-MNP-siRNA sıvı formları cihaza bırakılarak pik değerleri alındı.

3.2.6 X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

1895'te X-ışınlarının keşfi, bilim adamlarının kristal yapıyı atomik seviyede araştırmasını sağladı. Laue, 1912'de, eğer mineral kristalleri, X-ışınlarının saçılma merkezleri olarak hareket edebilecek düzenli aralıklı atomlardan oluşuyorsa ve eğer X-ışınları, kristallerdeki atomlar arası mesafelere yaklaşık olarak eşit dalga boyundaki elektromanyetik dalgalardan oluşuyorsa, o zaman X-ışınlarını kristallerle kırmak mümkün olmalıdır görüşüne varmıştır. Laue'nin bu teorileri test etmek için yönettiği klasik deneyler, X ışınlarının dalga doğasını ve kristaller içindeki atomların düzeninin periyodikliğini ortaya koymuştur (Whittig ve Allardice, 2018).

X-ışını kırınımı, kristal yapılar ve atomik boşlukları belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. X-ışınları kırınımı çalışma mekanizması tek renkli ışın ve bir kristal numunenin yapısana dayanır. Katot tüpü tarafından üretilen X-ışınları, tek renkli radyasyon elde edilmesi için filtrelenilerek, yoğunlaşma işleminden sonra numuneye yönlendirilir ve değerler ölçülür (Bunaciu vd., 2015).

Demiroksit nanopartiküllarin XRD değerleri, İnönü Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında D/MAX-2200 model ve 2D3508N seri nolu cihaz ile ölçüldü.

3.2.7 Titreşimli numune manyetometrisi (VSM)

Titreşimli numune manyetometrisi (VSM), numunenin makroskopik mıknatıslanmasının algılandığı doğrudan manyetik ölçüm teknikleri sınıfına aittir. Enstrüman ve teknik ilk olarak Foner tarafından 1950'lerde geliştirildi. Manyetometre (VSM), Faraday yasasına dayanmaktadır. Bir manyetik numunenin bobinlerin yakınında kontrollü hareketinin neden olduğu bir dizi bobindeki elektromanyetik indüksiyon, bir örneğin manyetik momenti ile ilgili nicel bilgi verir. Bu manyetik moment algılama mekanizması, endüktif algılama olarak bilinir ve hassasiyeti ve performansı, bobinlerin alıcı bobin konfigürasyonu, fiziksel boyutları ve enine kesiti ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Foner, 2004; Jordán vd., 2018; Thomson, 2014).

Bu çalışmada katı toz halindeki demiroksit nanopartikülleri manyetik gücünü ölçmek için, İnönü Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Model P525 Ölçüm Sistemi - Quantum Design cihazla oda sıcaklığında analiz yapılmıştır.

3.2.8 Zeta potansiyel

Bir sıvı ile temas halindeki bir katı fazın yüzey yükü ile bağlantılı fenomenin açıklanması, elektriksel çift tabaka teorisi ile mümkün olmuştur. Bu teoriye göre elektrokinetik veya zeta potansiyeli, elektrikli bir arayüzün ölçülebilir bir özelliğidir (Salopek vd., 1992).

Nanopartikül boyutu, şekli ve yüzeyinde oluşan pozitif ve negatif yüklere bağlı olarak, nanopartiküllerin hücre transfer edilmesinde önemli bir rol oynar (Honary ve Zahir, 2013).

Zeta potensiyeli'nin ölçümü, koloidal dispersiyonların uzun süre depolama kararlılığı hakkında tahminler yapılmasını sağlar. Daha yüksek Zeta potansiyeli (negatif veya pozitif), elektriksel itmeler nedeniyle parçacık agregasyonunun meydana gelme olasılığı daha düşüktür (Patel vd., 2018).

Bu çalışmada demiroksit nanopartikül ve magneto-lipozomun zata potansiyeli ve parçacık boyutu, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Uygulama ve Araştırma Merkezinde Malvern Nano ZS 90 Zetasizer marka cihaz ile analiz ölçümler alınmıştır.

3.2.9 Katyonik lipozom sentezi

Kotyonik lipozom sentezinde ince tabaka metodu kullanıldı. DSPC:DC-Cholesterol ve DSPE-PEG1000 (70:26:4 Mol oranı) kloroform içinde çözdürüldü. Çözeltiler birbirine iyice karıştırıldıktan sonra, 55 ℃ de kloroform uçuruldu ve vakum altında kuruması sağlandı. İnce tabaka haline gelen çok katmanlı lipozom, PBS ile çözdürüldü.Tek katmanlı lipozoma dönüştürme ve boyut küçültmesi için 20 dk ve 55 ℃ ultrasonik su banyosunda bekletildi. Daha sonra kullanılması için +4 ℃ ye bırakıldı (Naciute ve ark. 2021, Ball ve ark 2015).

3.2.10 siRNA stoklarının hazırlanması

ON-TARGET plus Human KRAS (3845)(J-005069-08-0050) 50 nmol siRNA hedef sekansı GGAGGGCUUUCUUUGUGUA Dharmacon firmasından alınmıştır. Stokların hazırlanması iligili firma protokülüne göre yapılmıştır. siRNA peletinin tüpün altında toplanmasını sağlamak için, siRNA içeren tüp kısa santrifüjlemesi yapıldı. İstenen nihai konsantrasyon için RNaz içermeyen 1xsiRNA (60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7.5, ve 0.2 mM $MgCl_2$) . tamponunda süspanse edildi. Örneğin: 10 nmol siRNA ve 20 µM stok konsantrasyonu için, 500 µL 1x siRNA tampon eklenir. 50 nmol siRNA üzerine 500 µL1x siRNA tamponu bırakılarak, 100 µMolarlık stok çözelti hazırlandı. Çözelti 3-5 kez yukarı ve aşağı pipetlendi, kabarcıkların girmemesine özen göstererek, tüpün kapağı güvenli bir şekilde kapatıldı. Daha sonra çözelti, orbital çalkalayıcıya oda sıcaklığında 30 dakika süreyle çalkalanması sağlandı. Solüsyonun tüpün altında toplanmasını sağlamak için siRNA içeren tüpler kısa santrifüj işlemi yapıldıktan sonra 260 nm uv spektrofotometride konsantrasyonu doğrulandı.(1 µM = 13.3 ng/µL). RNaz içermeyen ve steril ependorflarda alikotları hazırlandı. Daha sonra kullanılmak üzere – 80 ℃ saklanmaya bırakıldı. siRNA hazırlama cetveli Tablo 3.3 verilmiştir.

Tablo 3.3 siRNA konsantrasyon hazırlama cetveli

siRNA Miktarı (nmol)	İstenen konsantrasyon için eklenecek 1 x siRNA tamponu	
	100 µM Stok	20 µM Stok
1.0	10	50
2.0	20	100
5.0	50	250
10	100	500
20	200	1000
50	500	Tüp hacmini aşmaktadır.
100	1000	

3.2.11 MNP ve siRNA'nın lipozomla kapsüllenmesi

Demiroksit nanopartikülleri PBS içinde ultrasonik su banyosunda çözdürüldü. siRNA uygulması yapılan hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki final konsantrasyon 50 nm olacak şekilde hesaplanarak, sodium sitrat tamponu(pH:4) içinde seyreltildi.lipit, spion ve siRNA örnekleri karıştırılarak, ağırlıkça, Lipozom:Spion:siRNA , 1 nolu örnek 12,5:2,5:1, 2 nolu örnek 25:5:1, 3 nolu örnek 50:100:1 ve 4 nolu Örnek 100:20:1 oranında dört farklı konsantrasyon hazırlandı oda sıcaklığında 20 dk bekletildikten sonra hücrelere uygulandı. Uygulamalarda final konsantrasyon 50 nM olacak şekilde siRNA kullanıldı.

3.2.12 Hücrelerin stoklardan çoğaltılması

Caco-2 kolon kanseri hücre hattı İnönü Üniversitesi Biyokimya araştırma laboratuvarından temin edildi. HT29 kolon kanseri hücre hattı Dicle Üniversitesi, Gen Teknolojisi laboratuvarından temin edildi. Sıvı azotta bulunan Caco-2 ve HT29 hücre stokları alınarak, 37 ℃de su banyosunda çözünmeleri sağlandı. Cryotüplerdeki buz yapı çözünür çözünmez hızlı bir şekilde, Caco-2 hücreleri FBS (%10) ve Penisilin-Streptomisin (%1) antibiyotik içeren RPMI1640 besiyeri içeren falkon tüpüne bırakıldı. HT29 hücreleri ise FBS (%10) ve Penisilin-Streptomisin (%1) içeren DMEM besiyeri içeren falkon tüpüne bırakıldı. Daha sonra çözdürülen hücreler Stoklanma sırasında kullanılan DMSO dan temizlemek için 1200 rpm devirde 5 dk

süreyle santrifüjlenerek süpernatant atıldı. Hücre pelletleri besiyeri ile çözdürüldükten sonra 75 cm filter kapaklı flasklara aktarıldı. İnverted ışık mikroskobunda incelendikten sonra 37 ºC, %5' lik CO_2'li inkübatöre bırakıldı.

3.2.13 Hücrelerin pasajlanması

Günlük olarak izlenen hücreler, konfluent olduktan sonra başka flasklara aktarılacak şekilde pasajlamaları yapıldı. Besiyerleri +4 ºC de buz dolabından alınarak 37 ºC su banyosuna sıcaklıkları 37 ºC gelene kadar bekletildi. CO_2 inkübatöründen alınan flasklar, öncelikle içlerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra 10 ml PBS ile 1 kez yıkaması yapılarak ortamdaki PBS uzaklaştırıldı. 75 cm flaska hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 1 ml 1x Tripsin-EDTA eklenerek, tekrardan CO_2 inkübatöre bırakıldı. Yaklaşık Caco-2 hücreleri için 3 dk ve HT29 hücreleri için 5 dk bekletildikten sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskopla gözlendi. Tripsin-EDTA inaktif hale getirmek için bırakılan oranın en az iki katı kadar besiyerleri eklendi. Hücreler pipetlendikten sonra genelde ¼ kadarı yeni flaska aktarıldı ve Caco-2 hücrelerine 12 ml RPMI1640, HT29 hücrelerine ise 12 mL DMEM besiyerleri eklendi. Tarih ve pasaj numarası kaydedildikten sonra hücrelerin çoğalması için 37 ºC, %5' lik CO_2'li nemli inkübatöre bırakıldı.

3.2.14 Hücre stoklarının hazırlanması

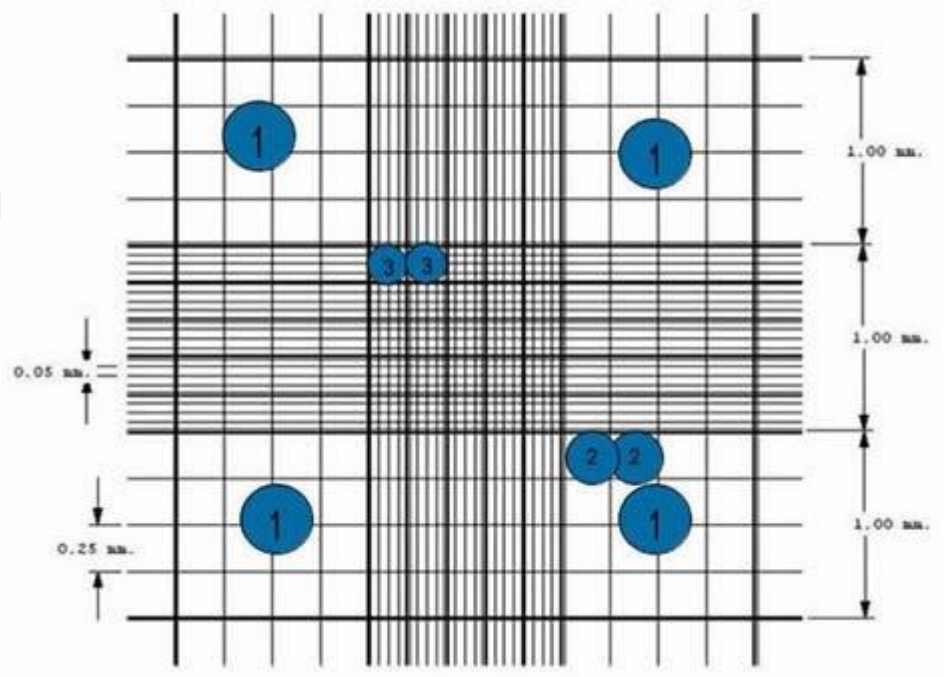
Mikroskopta Caco-2 ve HT29 hücreleri yoğunlukları %75 ulaştığı gözlemlenince, flaskın içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışık hücreler 1 kez PBS tampunu ile yıkandıktan sonra ortamdaki PBS uzaklaştırıldı. Hücreler flask yüzeyinden kalkmaları için üzerine 75 cm flask için 1 ml Tripsin EDTA bırakıldı. Caco-2 için 3 dk ve HT29 hücreleri için 5 dk CO_2'li nemli inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopta gözlenince, Tripsin-EDTA inaktif hale getirmek için hücrelerin üzerine kullanılan Tripsin-EDTA miktarının en az iki katı kadar RPMI1640 ve DMEM besiyerleri eklendi.

Hücreler sayıldıktan sonra, %20 FBS, %1 Penisilin-Streptomisn ve %10 DMSO olacak şekilde Caco-2 hücreleri için RPMI1640 ve HT29 hücreleri için DMEM besiyeri stok çözeltileri hazırlandı. Herbir kryotüpe 1,5 mL stok besiyeri ve 1 milyon hücre bırakıldı. Tarih ve pasaj numarası not edildikten sonra kademeli olarak önce 2 saat – 20 ℃ de daha sonra 1 gece -80 ℃ de ve en son sıvı azotta sonraki deneylerde kullanmak üzere bırakıldı. Hücre hattına bağlı olarak hücreler – 80 ℃ en az 6 ay ve

en fazla 1 yıl saklanabilmektedir. Sıvı azotta ise 4 yıla kadar hücrelerin saklanabildiği gözlemlenmiştir.

3.2.15 Hücre sayımı

Hücre sayımları, hücreler flask yüzeyinden kaldırılıp, Tripsin-EDTA inaktif edildikten sonra inverted mikroskopta yapıldı. Hücreler pipetlendikten sonra 100 µl hücre ve ölü hücre sayma hatasında kurtulmak için 100 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Tripan mavisi ölü hücreleri boyayarak koyu bir renk almasını sağlamaktadır. Hücre sayımları için Neubauer chamber lamı kullanıldı. 10 µL hücre lamelle kapatılmış alana pipetlendikten sonra lamın üstünde bulunan karelerdeki hücreler sayıldıktan sonra ilgili formüle göre hesaplanarak, 1 mL'de bulunan hücre sayısı belirlendi. Naubauer chamber lamı Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3 Neubauer chamber lamı

1 nolu bölge için 1ml hücre= (Toplam sayılan hücre)X(10.000)X Seyreltme faktörü
2 nolu bölge için 1mL hücre=(Toplam hücre/Toplam kare)X(160.000)X dilüsyon faktörü

3.2.16 Caco-2 hücrelerinin KRAS gen seviyelerinin belirlenmesi

Caco-2 kolon kanseri hücreleri sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 2mL RPMI1640 besiyeri 150.000 Caco-2 hücresi eklenerek 37 ºC, %5' lik CO_2' li nemli inkübatöre bırakıldı. 24. Saat sürenin sonunda farklı konsantrasyonda(1 nolu örnek 12,5:2,5:1 , 2 nolu örnek: 25:5:1, 3 nolu örnek 50:10:1, 4 nolu örnek 100:20:1 olacak şekilde Lipozom: Spion: siRNA(100 pmol:133 µg) , w/w) örnekleri hazırlanmıştır. Lipozom ve manyetik nanopartiküller karıştırıldıktan sonra oluşan magneto-lipozom üzerine sodium sitrat tampon içinde dilute edilmiş KRAS siRNA eklenerek, 20 dk oda sıcaklığında siRNA'nın magneto-lipozoma yüklenmesi için bekletildi. Pozitif kontrol olarak Mission siRNA transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Herbir pozitif kontrol kuyucuğu için, 1 numaralı ependorf tüpüne 100 µL serum ve antibiyotik barındırmayan besiyerine 8 µL mission siRNA TA bırakılarak dilute edildi. 2 numaralı ependorf tüpüne 100 µL serum ve antibiyotik barındırmayan besiyeri 100 pmol KRAS siRNA eklenerek dilute edildi. Daha sonra 1 ve 2 numaralı ependorf tüplerdeki besiyerleri karıştırılarak, siRNA nın transfeksiyon ajanı tarafından kapsüllenmesi için 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek, hücrelere uygulanmaya başlandı. Her örnek için final konsantrasyon 50 nM KRAS siRNA olacak şekilde hazırlandı. Uygulama 3 er tekrarlı olarak 6 kuyucuklu plaklar 37 ºC, %5'lik CO_2'li nemli inkübatöre bırakıldı.

3.2.17 HT29 hücrelerinin KRAS gen seviyelerinin belirlenmesi

HT29 kolon kanseri hücreleri sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 2mL DMEM besiyeri ve 180.000 HT29 hücresi eklenerek 37 ºC, %5'lik CO_2'li nemli inkübatöre bırakıldı. 24 saat sürenin sonunda farklı konsantrasyonda (1 nolu örnek 12,5:2,5:1 , 2 nolu örnek: 25:5:1, 3 nolu örnek 50:10:1, 4 nolu örnek 100:20:1 olacak şekilde (Lipozom:Spion:siRNA(100 pmol:1,33 µg) w/w) hazırlanmıştır. Lipozom ve manyetik nanopartiküller karıştırıldıktan sonra oluşan magneto-lipozom üzerine sodium sitrat tampon içinde dilute edilmiş KRAS siRNA eklendikten sonra, 20 dk oda sıcaklığında siRNA'nın magneto-lipozoma yüklenmesi için bekletildi. Pozitif kontrol olarak Mission siRNA transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Herbir pozitif kontrol kuyucuğu için, 1 numaralı ependorf tüpüne 100 µL serum ve antibiyotik barındırmayan besiyerine 8 µL mission siRNA TA bırakılarak dilute edildi. Daha sonra 2 numaralı ependorf tüpüne 100 µL serum ve antibiyotik barındırmayan

besiyerine 100 pmol KRAS siRNA eklenerek karışması için nazikçe pipetlendi. 1 ve 2 numaralı ependorf tüplerdeki besiyerleri karıştırma işleminden sonra siRNA'nın transfeksiyon ajanı tarafından kapsüllenmesi için 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek, hücrelere uygulanmaya başlandı. Her örnek için final konsantrasyon 50 nM KRAS siRNA şekilde hazırlandı. Uygulama 3 er tekrarlı olarak yapıldı. Daha sonra 6 kuyucuklu plaklar 37 ºC, %5' lik CO_2'li nemli inkübatöre bırakıldı

3.2.18 Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu Roche firmasının RNA izolasyon kiti ile ve kitin sağladığı protokolle göre yapılmiştir. Caco-2 ve HT29 hücreleri, belirlenen konsantrasyonlarda muamele edildikten 24 saat sonra her kuyucuk için ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyucuklardaki yapışık hücreler PBS tamponuyla yıkandıktan sonra PBS tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 µL Tripsin-Edta bırakıldı ve hücrelerin yüzeyden sökülmesi için Caco-2 hücreleri için 3 dk ve HT29 hücreleri için 5 dk CO_2'li inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kuyucuk yüzeylerinden sökülmeleri mikroskopta gözlendikten sonra üzerlerine 800 µL besiyeri eklenerek Tripsin-Edta inaktif hale getirildi. Hücreler numaralandırılmış ependorf tüplerine bırakılarak 1200 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreleri yıkamak için hücre pelletleri üzerine 1 ml PBS tampon eklenerek, 1200 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri 200 µL PBS tamponuyla çözdürülüp süspanse hale getirildi. 200 uL PBS tamponuyla süspanse edilmiş hücrelere ve her bir örneğe 400 µL lizis bağlama tampon eklenerek 15 sn vortekslendi. Daha sonra yüksek saflıktaki filtreli tüpler, toplanma tüplerine eklenmiştir. Bütün örnek maksimum final 700 µL olacak şekilde yüksek saflıktaki filtreli tüplerin üst rezervlerine eklenmiştir. Tüpler santrifüje bırakılarak, 8000 x g. devirde 20 sn santrifüj edilmiştir. Filter tüpleri toplanma tüplerinden ayrılarak, toplanma tüplerinde biriken örnek içinden geçen sıvı atılmıştır ve tekrardan filtreli tüpler toplanma tüplerine eklenmiştir. Her örnek için 10 µL DNaz, 90 µL DNaz inkübasyon tamponuyla pipetlenerek karıştırılmıştır. DNaz içeren tampon filtreli tüplerin üst rezervlerine bırakıldıktan sonra +15 - +25 ºC arası 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem ortamdaki DNA'yı parçalamak için yapılmıştır. 15 dk'nın sonunda fitreli tüplerin üst rezervlerine yıkama tamponu I eklendikten sonra 8000 x g. devirde 20 sn santrifüj edilmiştir. Toplanma tüplerinde biriken sıvı atıldıktan sonra filtreli tüpler, toplanma

tüplerine eklenmiştir. Sonraki adım 500 µL yıkama tampon II filtreli tüplerin üst rezervlerine bırakıldıktan sonra 8000 x g. devirde 20 sn santrifüj edilmiştir. Fitreli tüpler toplanma tüplerinden çıkarılarak, toplanma tüplerinde biriken sıvı atıldıktan sonra filtreli tüpler tekrardan toplanma tüplerine eklenmiştir. 200 µL yıkama tamponu II fitreli tüplerin üst rezervlerine eklendikten sonra 15000 x g. 3 dk santrifüj edilmiştir. Toplanma tüpleri ve içindeki sıvılar atıldıktan sonra fitreli tüpler 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir. Filtreli tüplerin üst rezervlerine 50 µL elüsyon tampunu eklendikten sonra 1 dk bekletilerek, 8000 x g. devirde 1 dk santrifüj edilmiştir.mBu aşamada RNA mikrosantrifüj tüplerine geçmiştir. Filtreli tüpler mikrosantrifüj tüplerinden çıkarılarak atılmiştir. İzole edilen total RNA miktarı ve kalitesi A260/A230 ve A260/A280 dalga boylarında Nanodrop ve bant görüntülenmesi formaldehitli agaroz jel ile belirlenmiştir.

3.2.19 İzole edilen total RNA'nın agaroz- formaldehit jelde yürütülmesi

İzole edilen RNA'lar Agaroz jelde yürütülerek bant görüntüleri alındı. %1 olarak hazırlanan jel için 0,5 gr agaroz tartılarak 50 mL 0,5X TAE tamponuna eklendi. Agarozun tamamen çözünmesi için 3 dk mikrodalga fırınla ısıtıldıktan sonra sıcaklığın 55 ºC düşmesi için bir süre bekletildi. RNA'nın denatüre olması için 5 mL % 37 formaldehit ve görüntülenmesi için 0.5 µg/mL final konsantrasyonda Etidyum Bromür ile karıştırma işleminden sonra kasete döküldü. Jel soğuduktan sonra, içinde 1X TAE tampon olan elektroforez tankına yerleştirildi. RNA örneklerinden 5 µL alınarak ependorf tüplerine bırakıldı. Herbir örneğe 1µL DNA yükleme boyası eklenerek karışması için pipetlendi. RNA örnekleri jele yüklenerek 100 V güç ve 30 dk jelde yürümesi için bırakıldı. Süre tamamlandıktan sonra UV altında bant gürüntüleri alındı.

3.2.20 cDNA sentezi

OneScript® cDNA sentezi kiti abm firmasında alınmıştır. cDNA sentezlenmeden önce nanodropla ölçülen RNA miktarları eşitlenmiştir. cDNA sentezi ilgili kit'in protokolü ile yapılmıştır. Kit'in bütün bileşenleri nazikçe vortekslenmiştir. Her örnek için küçük PCR ependorflarına 1uL oligo(dT), 1uL random primerler (10µM), 1uL dNTP mix (10mM) ve her örnekte 1 ug RNA olacak şekilde final volümü nükleaz içermeyen su

le 14,5 µL pipetlenerek tamamlanmıştır. Örnekler PCR cihazında 65 ºC ve 5 dk süreyle ısıtılmıştır. 5 dk sonunda en az 1 dk buz üzerinde bekletilmiştir.

Kısa santrifüj ile örnekler toplandıktan sonra herbir örneğe 5x konsantrasyonda RT tamponundan 4 µL, 0,5 µL RNaseoff inhibitörü (40 U/µL) ve 1 µL OneScript®RTase (200U/µL) eklenerek final hacim 20 µL olacak şekilde her örneğin karışımı sağlanarak kısa santrifüjden sonra PCR cihazına bırakılmıştır. ilk adım 25 ºC ve 10 dk; ikinci adım 42 ºC ve 50 dk; üçüncü adım 85 ºC ve 5 dk olarak PCR cihazı programlanmıştır. Program bittikten sonra sentezlenen cDNA 10 kez seyreltilerek saklanmak üzere -20 ºC bırakılmıştır. Abm cDNA kit bileşenleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4 abm cDNA kit bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonları
Total RNA veya poly(A)+mRNA	Isteğe bağlı	1ng-2µg/reaksiyon
Oligo(dT)(10 uM) veya	1µL	0,5 µM
random primerler	1µL	0,5 µM
Nükleaz içermeyen su	14,5 üzerinde	
dNTP mix(10 mM)	1µL	500 µM
5xRT tamponu	4 µL	1x
RNaseoff ribonükleaz inhibitör(40 U/µL)	0,5 µL	20U/reaksiyon
OneScript®RTase(200U/µL	1 µL	200U/reaksiyon

3.2.21 RT-PCR ve KRAS gen ekspresyonu

RT-PCR ROCHE firmasının Sybr Green I Master kiti kullanılarak, ROCHE marka LightCycler480 II RT-PCR cihazında belirlenmiştir. İnsan KRAS geni ve referans genin primerleri dizayn edilip, Sentebiolab firmasından temin edilmiştir. Primerler nükleaz içermeyen su ile çözdürülüp, 100 µM stoklar hazırlanmıştır. KRAS primerleri Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5 Primer gen dizilişleri

Primerler	Primer gen dizilişi	Erime sıcaklığı
KRAS ileri primer	5'-AAGAGTGCCTTGACGATAC-3' 19 bP	Tm:48,93 ºC
KRAS geri primer	5'-CTCCATCAATTACTACTTGCTTC -3' 23 bp	Tm:51,71ºC
GAPDH ileri primer	5'-CATTGCCCTCAACGACCACTTT -3' 22 bp	Tm:54.84ºC
GAPDH geri primes	5'-GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC -3' 22 bp	Tm:60.43ºC

RT-PCR ilgili kit'in protokolü ile yapılmıştır. Her örnek için hedef gen KRAS ve referans olarak GAPDH ekspresyonuna bakılacak şekilde iki ayrı örnek hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu PCR plakına her örnek hedef KRAS geni için her kuyucuğa 4 µL pcr su, 0,5 µL KRAS ileri primer, 0,5 µL KRAS geri primer ve 10 µL master mix eklenmiştir. Referans GAPDH geni için her kuyucuğa pcr su 4 µL, GAPDH ileri primer 0,5 µL, GAPDH geri primer 0,5 µL ve 10 µL master mix eklenmiştir. Son olarak her örnek için kuyucuklara 5 µL cDNA eklenmiştir. Alt-üst pipetleme yapılarak RT-PCR cihazına bırakılmıştır. Syber green I kit bileşenleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6 Syber green I kit bileşenleri

Kit içeriği	Hacim
PCR grade su	3 µL
PCR 10x konsantrasyon	2 µL
Master mix	10 µL
Toplam hacim	15 µL

96 kuyucuklu PCR plakı PCR cihazına bırakılmadan önce PCR döngü programları girilmiştir. RT-PCR döngü programları Tablo 3.7 'da gösterilmiştir.

Tablo 3.7 RT-PCR program ve döngüler

Program	Sıcaklık	Süre	Devir sayısı
Pre-inkübasyon	94 ºC	10 dk	1
Amplifikasyon			
Denatürasyon	94 ºC	1 dk	45
Primer bağlanması	55 ºC	30 sn	
Uzama-sentez	72 ºC	1 dk	
Erime eğrisi	95 ºC	10 sn	
	65 ºC	1 dk	1
	97 ºC	Sürekli	
Uzama-sentez	72 ºC	2 dk	1
Soğuma	40 ºC	10 sn	

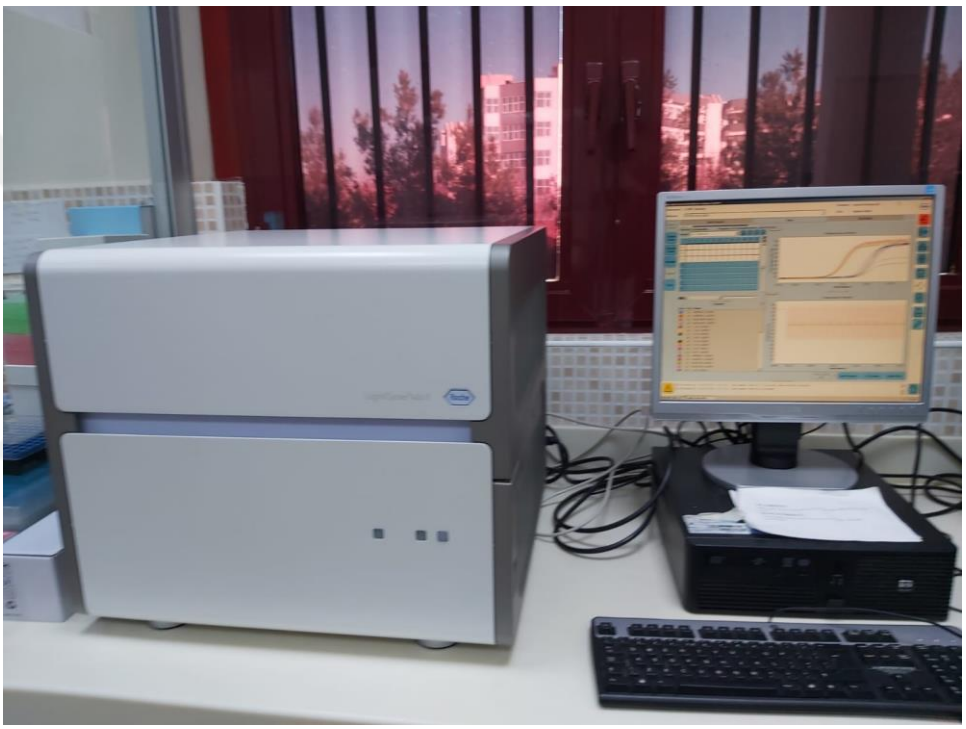
Program bittikten sonra CT değerleri kaydedilip, daha sonra gen ekspresyonu double delta $\mathbf{2^{(-\Delta\Delta Ct)}}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.22 BCL-2 ve BAX gen seviyelerinin belirlenmesi

BCL-2 ve BAX genlerinin primer gen dizilişleri Tablo 3.8'de verilmiştir. Gen ekspresyonlarını belirlemek için 96 kuyucuklu PCR plakına her örnek hedef BCL-2 ve BAX genleri için her kuyucuğa 4 µL pcr su, 0,5 µL BCL-2 ve BAX ileri primer, 0,5 µL BCL-2 ve BAX geri primer ve 10 µL master mix eklenmiştir. Referans GAPDH geni için her kuyucuğa pcr su 4 µL, GAPDH ileri primer 0,5 µL, GAPDH geri primer 0,5 µL ve 10 µL master mix eklenmiştir. Son olarak her örnek için kuyucuklara 5 µL cDNA eklenmiştir. Alt-üst pipetlenme yapılarak RT-PCR cihazına bırakılmıştır. BCL-2 ve BAX genlerinin primer gen dizilişleri Tablo 3.8 'de verilmiştir.

Tablo 3.8 BCL-2 ve BAX genlerinin primer gen dizilişleri

BCL-2	İleri Primer	5’-TCAGGCTGCTTGGGATAAAGATG-3’
	Geri primer	5’-GGCTTCTGGAGGACATTTGGA-3’
BAX	İleri primer	5’-AAGAAGCTGAGCGAGT-3
	Geri primer	5’-GCCCATGATGGTTCTG-3’



Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan RT-PCR cihazı

3.2.23 Sitotoksisite deneyi (MTT)

Hücreler sayılarak, Caco-2 için her kuyucuğa $5x10^5$ hücre olacak şekilde ve HT29 hücreleri sayılarak her kuyucuğa $6x10^5$ hücre olacak şekilde eklenmesi için hesaplandı. Caco-2 hücreleri, serum ve antibiyotik içeren RPMI-1640 hücre büyüme ortamına transfer edilip, 96-kuyucuklu plaka ve her kuyucuğa 90 µL besiyeri eklenerek %5 CO_2 ile 37°C’de inkübe edildi. HT29 hücreleri, serum ve antibiyotik DMEM hücre büyüme ortamına transfer edilip, 96-kuyucuklu plaka ve her kuyucuğa 90 µL besiyeri eklenerek %5 karbondioksitli inkübatörde 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra farklı konsantrasyonda (1 nolu örnek 12,5:2,5:1 , 2 nolu örnek:

25:5:1, 3 nolu örnek 50:10:1, 4 nolu örnek 100:20:1 olacak şekilde Lipozom:Spion:siRNA w/w) örnekler hazırlanarak eklendi. Pozitif kontrol olarak Mission siRNA transfeksiyon ajanı kullanıldı. Bir ependorfa 100 µL serumsuz besiyeri ve 8µl Mission siRNA TA eklenerek pipetlendi. İkinci ependorfa 100 µL serumsuz besiyeri 100 pmol KRAS siRNA eklendi. Bir ve ikinci ependorflar karıştırılarak, oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra hücrelere eklendi. Kuyucuklardaki final siRNA oranı 50 nm olarak hesaplandı. Hücre canlılığı 0, 24, 48 ve 72 saatlerin sonunda PBS'de (5 mg/ml) çözünmüş MTT reaktifi (Sigma) her kuyucuğa 10µL besiyerlerine eklenerek 3.5 saaat süre, % 5 karbondioksitli inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyucuğa 100µL DMSO bırakıldı. MTT azalması, 570 nm dalga boyunda mikroplak ile okuması yapıldı.

3.2.24 Yara iyileşme deneyi

Caco-2 kolon kanseri hücreleri, kuyucuk başına 300.000 hücre ve HT29 kolon kanseri hücreleri 500.000 olacak şekilde 6 kuyucuklu plağa ve her kuyucuğa 2 mL %10 FBS ve %1 Penisilin- Streptomisin içeren besiyerlerine eklendi. Hücreler %90 yoğunluğa geldiklerinde, besiyeri uzaklaştırılarak, 200 µL pipet ucuyla hücrelere çapraz şekilde çizgi açılarak, 2 tekrarlı PBS tamponu ile yıkandı. Hücrelere besiyerleri eklendikten sonra farklı konsantrasyonda hazırlanmış 1,2,3,4 nolu örnekler eklendi. Pozitif kontrol olarak Mission siRNA transfeksiyon ajanı kullanıldı. Yara kapanma hızı ve oranını görmek için 12 saatte bir mikroskop resimleri çekildi.

3.2.25 Annexin V apoptoz testi

Apoptoz testi ilgili kit'in protokolüne göre yapıldı. Caco-2 hücreleri sayılarak 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 120.000 hücre olacak şekilde 2 mL RPMI1640 besiyerine eklendi. HT29 hücreleri sayılarak her 6 kuyucuklu plaklara ve her kuyucuğa 130.000 hücre olacak şekilde 2 mL DMEM besiyerine eklendi. Daha sonra plaklar hücrlerin plaka yapışması için %5 lik CO_2 ve 37 ºC inkübatöre bırakıldı. 24 saatin sonunda kuyucuklardaki eski besiyeri uzaklaştırılarak, 2 mL taze besiyerleri eklendi. Pozitif kontrol olarak siRNA yüklü Mission siRNA transfeksiyon ajanı kullanıldı. siRNA yüklü magneto-lipozom olarak en yüksek doz olan 4 nolu örnek hücrelere uygulandı. 24.saatin sonunda ortamdan besiyerleri uzaklaştırılarak, kuyucuklar 2 mL

PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden sökülmeleri için kuyucuk başına 200 µL Tripsin-Edta eklenerek, Caco-2 için 3 dk ve HT29 hücreleri için 5 dk olacak şekilde inkübatöre bırakıldı. Hücreler plak yüzeyinden ayrılmaları mikroskop ile gözlendikten sonra ortama kullanılan Tripsin-Edta oranının en az iki katı kadar besiyerleri eklendi. Daha sonra hücreler 1,5 mL'lik santrifüj ependorf tüplerine bırakıldı. Hücreler 150 X g 5 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı atılarak final konsantrasyon 1x 10^6 hücre olacak şekilde üzerine soğuk 1 x bağlama çözeltisi eklendi. Sonraki aşama 5 µL Annexin v çözeltisi eklendikten sonra 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. 15 dk sonunda hücreler 1000 X g hızında 5 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Hücre pelletleri 100 µL soğuk 1 x bağlama çözeltisiyle tekrar çözdürülerek 10 µL Propodium iyodid eklendi. Hücreler karanlıkta 5 dk bekletildikten sonra lamel üzerine bırakılarak, lamelle kapatıldı. Rastgele 3 tekrarlı olarak axio Lab A1 model ZEISS marka florasan mikroskopla resimleri çekildi.

3.3 İstatistiksel Analiz

istatistiksel anlamlılığı, Graphpad Prism 7.0 yazılımında Student t-testi kullanılarak belirlendi. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi ve tüm deneyler üç kez tekrarlandı. ($p \leq 0.05$'e karşı kontrol; **$p \leq 0.01$'e karşı kontrol,***$p \leq 0.001$'e karşı kontrol, ****$p \leq 0{,}0001$)

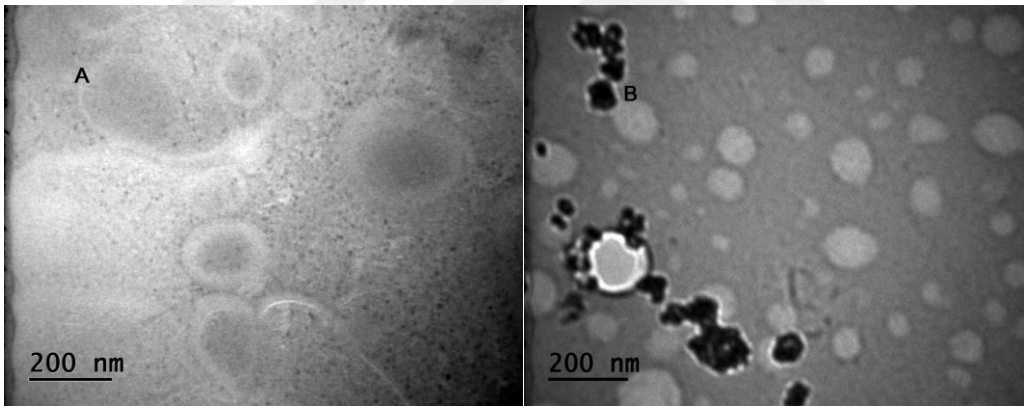
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Nanopartikül Karakterizasyon Bulguları

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu için TEM, FTIR; XRD, VSM, ZETA potansiyeli ve parçacık boyutu analizleri yapılmıştır.

4.1.1 Transmisyon elektron mikroskopu (TEM)

Tem görüntülerinde farklı boyutlarda lipozomlar görüntülendi. Lipozomların boyut ve boyut dağılımı, bir ilaç veya teşhis olarak kullanılması üzerinde önemli bir etkisi vardır. TEM taramalı elektron mikroskobu (SEM), diğer tekniklerle birlikte genel olarak nanopartiküllerin ince yapısını ve özel olarak lipozomları karakterize etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Baxa, 2018). Tem görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



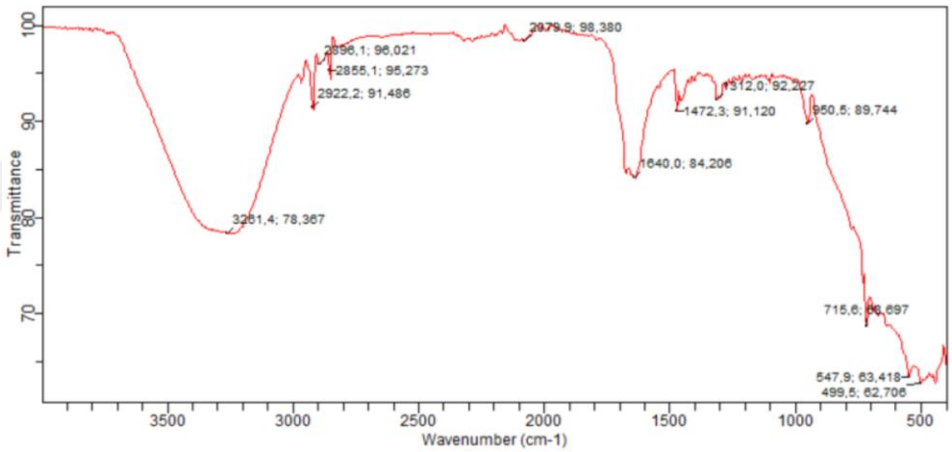
Şekil 4.1 SPİON ve lipozom TEM görüntüleri(A-magneto Lipozom+siRNA, B- Lipozom)

Tem görüntüleri lipozomun farklı boyutta olduğunu göstermiştir. Boyutların standart ve hücrenin kullanabilme forma dönüştürmesi önemli bir husustur. Lipozom boyutu diyaliz, mikroakiskan ve polycarbon filtreler gibi sistemlerden geçirilerek ayarlanabilir.

Petrichenko vd., (2015), sentezledikleri magneto lipozomun TEM görüntülerini almışlardır. Elde edilen veriler, aynı numunenin manyetik NP'lerle doldurulmuş hem yuvarlak hem de tübüler lipozomlar olarak var olabileceğini göstermişlerdir.

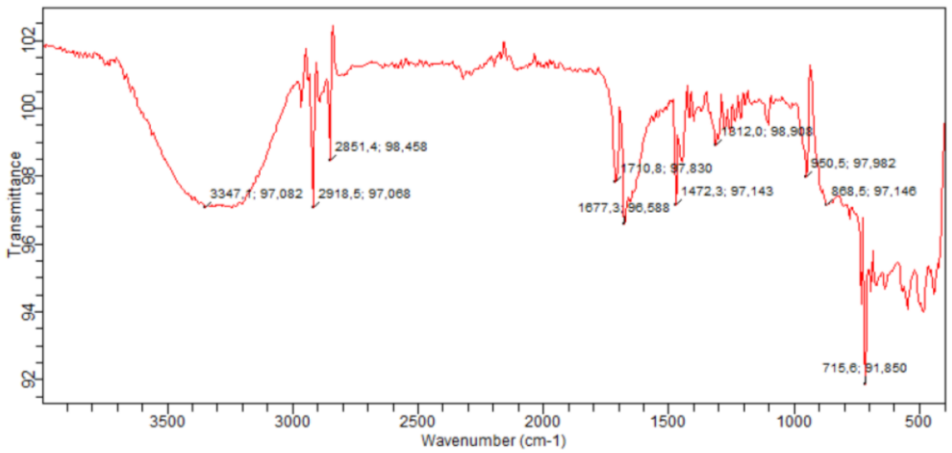
4.1.2 Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre (FTIR)

İlaçların kimyasal yapılarının korunması kritiktir, çünkü kimyasal yapılarındaki değişiklikler biyolojik aktivitelerinde değişikliklere neden olabilir (Ghaferi, ve ark.2020). Bu çalışmada, DSPC:DC-kolesterol:PEG kimyasal yapısını değerlendirmek için Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) yöntemi kullanıldı. Sentezlenen nanopartiküllerin FTIR ölçüm sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Sentezlenen nanopartiküllerin FTIR değerleri

Lipozomun FTIR spektrumunda ise 3268 cm^{-1}'de karakteristik amin bandı ve 1640 cm^{-1}'de karboksil grubuna ait pik kaydedilmiştir. Lipozom ile modifiye edilmiş süperparamanyetik Fe_2O_3'a ait spektrumda ise hem lipozom hem de Fe_2O_3'a ait karakteristik piklerin varlığı lipozomun Fe_2O_3'a bağlandığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.3 Magneto lipozom+siRNA FTIR değerleri

FTIR analiz sonuçlarına göre 1599 ve 1405 cm^{-1}'deki karakteristik pikler yapının süperparamanyetik özellikte Fe_2O_3 olduğunu doğrulamaktadır.
SPION spektrumu, 590–605 cm−1'de güçlü bir bant olarak Fe-O-Fe için karakteristik bir tepe noktasının varlığını gösterir. 3450-3515 cm-1'deki belirgin ve geniş bir tepe, SPION'ların yüzeyinde çok sayıda yüzey hidroksil grubunun varlığını açıkça ortaya koyar. Sitrik asidin FTIR spektrumu, 1668 cm-1'de (C=O) absorbans tepe noktaları gösterir (Kumar ve Agnihotri, 2016).

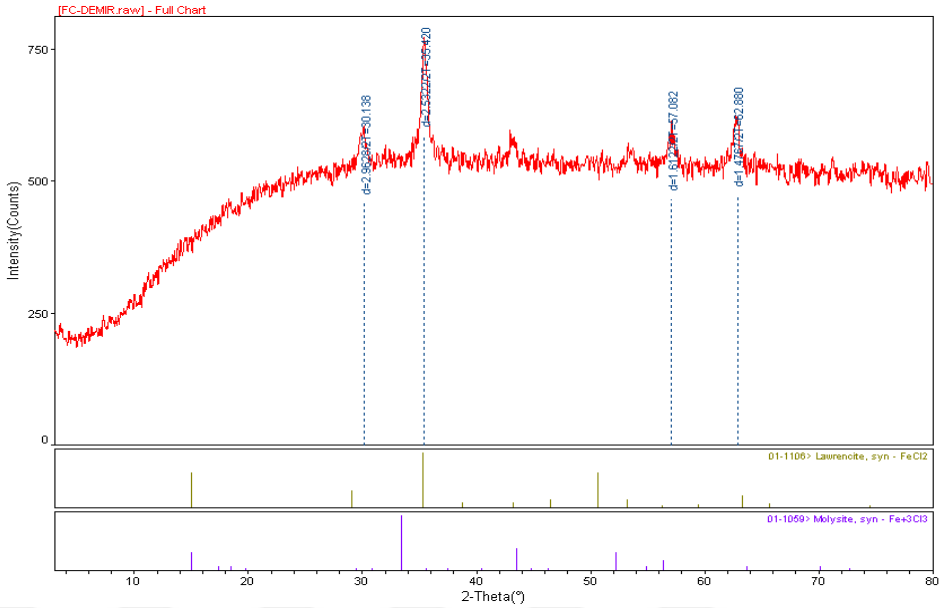
Alzoubi vd., (2022) sitrik asit ile kaplı demiroksit FTIR analizlerini yapmışlardır. Bu durumda sitrik asit, karboksilat grubu vasıtasıyla Fe_3 partiküllerinin yüzeyine bağlanmıştır. C= O titreşimine (simetrik esneme) atanan 1600 cm− 1 pik ve Sitrik asidin (CA) COOH grubu, yaklaşık 1533,97 cm− 1'de pik elde ederek sitrik asidin manyetik nanopartiküllerine bağlandığını doğrulamışlardır.

M. El-Khawaga vd., (2020), sitrik asit kaplı manyetik nanopartikülün antimikrobiyal çalışmalarında, FTIR ile nanpartikül karekterizasyonunu yapmışlardır. Demiroksit nanopartikül için 220, 311, 400, 422, 511, 440 piklerini elde ederken, sitrik asit kaplamasında 1600 cm−1 pik değerlerini elde etmişlerdir. Fosfolipidlere karşılık gelen pikler, sırasıyla fosfolipit pikleri ve C = O gerilmesi için 1.240 ve 1.656 cm-1'de gözlemişlerdir. Bu değerler, manyetik nanopartikülleri kapsülleyen lipozom tabakası hakkında bilgi sağladığını belirtmişlerdir. (Vlasova vd., 2019).

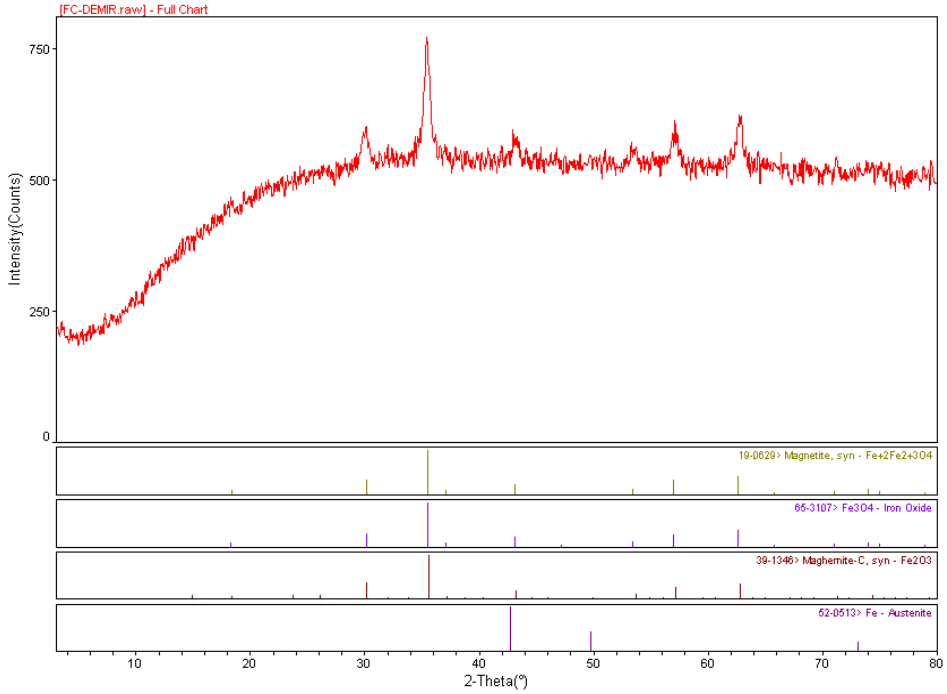
4.1.3 X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

Nanopartiküllerin kimyasal bileşimi, yapısı, boyutu ve şekli ilaç taşınımında önemlidir. Parçacıkların bileşimi, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi'nden (ICDD, daha önce Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi, JCPDS olarak bilinir) veri tabanından temin edilebilen referans modellerle tepe noktalarının konumu ve yoğunluğu karşılaştırılarak belirlenme prensibine dayanır.

Sentezlenen nanopartiküllerin XRD ölçümü ile güçlü bir manyetik kuvvete sahip magnetit ve maghemit olduğu analizi yapılmıştır. Nanopartiküllerin dalga yoğunlukları XRD Şekil 4.4'de, faz analizi Şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.4 Demiroksit nanopartiküllerin XRD cihazında ölçülen dalga yogunlukları



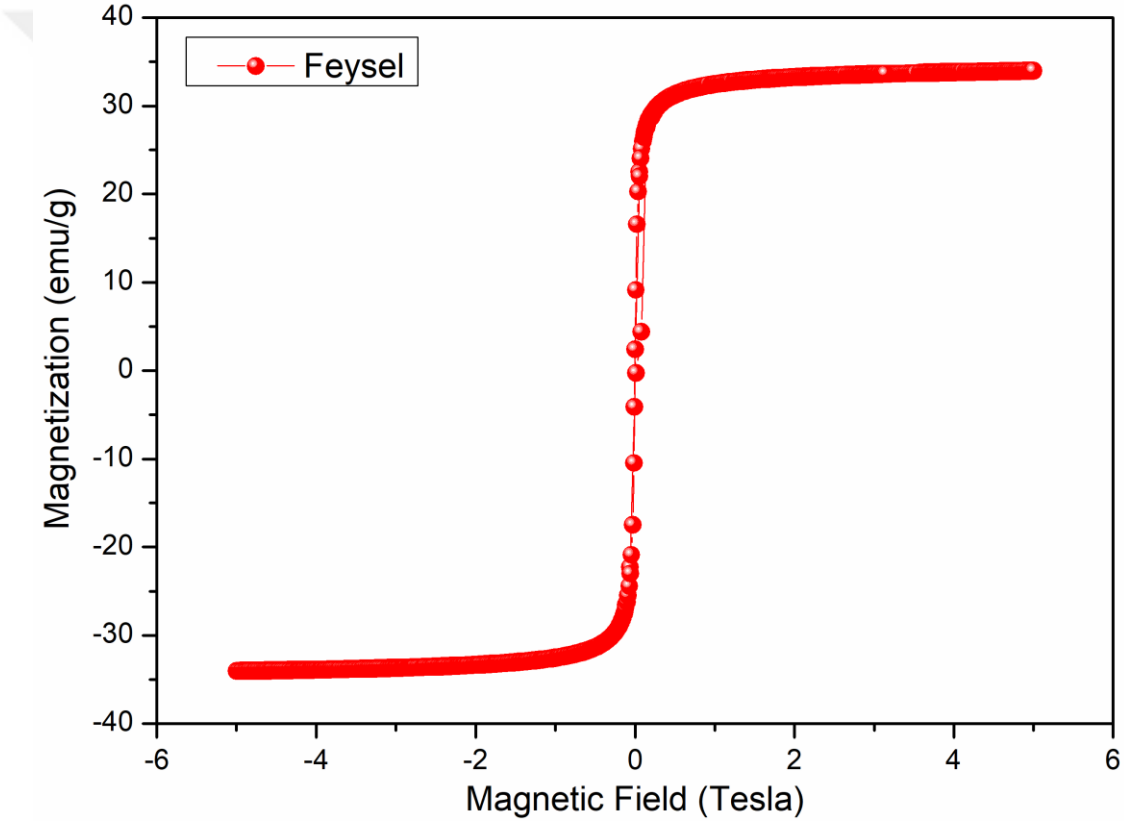
Şekil 4.5 Demiroksit nanopartiküllerin XRD faz analizi

Omelyanchik vd., (2021), maghemite (γ-Fe_2O_3) yaptıkları çalışmada XRD analizinde 220, 311 ,400, 422, 511, 440 XRD pik değerleri ile maghemit olduğu görüşüne varmışlardır.

Cheraghipour vd., (2012), hipotermi terapide kullanmak üzere sitrik asit kaplı demiroksit nanopartikülleri sentezlemişlerdir. 220, 311, 400, 422, 511, 440 XRD pik değerleri ile maghemite (γ-Fe_2O_3) olduğunu belirtmişlerdir.

4.1.4 Titreşimli numune manyetometrisi (VSM)

Sitrik asit kaplı demiroksit nanopartiküllerin (γ-Fe_2O_3) mayetik özelliği, ölçüm 300 K sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Moment verileri malzemenizin ağırlığına (0.0065 g) bölünmüşür. Maghemit (γ-Fe_2O_3) manyetizasyon değeri 33,9 emu/g olarak hesaplanmıştır. Histeresis döngüsü Şekil 4.6 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Maghemit (γ-Fe_2O_3) manyetik özelliği grafiği

Süperparamanyetik davranışa sahip küçük boyutlu (9 nm) kaplanmamış demir oksit nanoparçacıkları için, sitrik asit kaplaması süperparamanyetik özelliğini etkilemeyecektir. Daha büyük boyutlu (25 nm) demir oksit nanoparçacıkları için, sitrik asit kaplama mamanyetik özelliğini azaltabilir (Li vd., 2013).

Mikelashvili vd., (2023), sentezledikleri SPİON sitrik asit kaplamaları sonucunda 50 emu/g manyetizasyon değeri hesaplamışlardır. Sentezlediğimiz manyetik nanopartiküllerin daha düşük mayetizma göstermesi parçacık boyutunun büyük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.5 Zeta potansiyeli

Sentezlenen manyetik nanopartikül ve magneto-lipozomun zeta potansiyeli ve zeta parçacık boyut analizi yapılmıştır. Maghemiti çin Reaktif İndeks 2,63, Magneto-lipozom için Reaktif İndeks 1,45, dispersant olarak kullanılan saf su için Reaktif İndeks 1,330 alınarak zeta potansiyelleri ve parçacık boyutları ölçülmüştür. Zeta potanisyeli Maghemit için -40,3 mV, magneto-lipozomun için -21,6 mV olarak ölçülmüştür.

Zeta potansiyeli, nanoparçacıkların yüzey özelliklerini katyonik, anyonik veya nötr olarak tanımlamak için kullanılabilir. Bununla birlikte, teknik birçok değişkene duyarlıdır. Zeta potansiyelindeki farklılıklar, solvent iyonik kuvveti, viskozite, pH ve sıcaklık gibi ölçüm koşullarındaki farklılıklara bağlanabilir. Zeta potansiyeli ayrıca nanoparçacık yüzey karakterindeki küçük değişikliklere duyarlıdır (M. C. Smith vd., 2017).

Naciute vd., (2021), yaptıkları çalışmada Dspc:Dc-Kolesterol ile sentezledikleri lipozomlarda +21mV ve +43 mV zeta potansiyeli ölçümleri elde etmişlerdir.

Dheyab vd., (2020), sentezledikleri demiroksit nanopartiküllerini sitrik asit ile kaplamışlardır. Sitrik asit ile kaplanan demiroksit nanopartiküllerin zeta potansiyeli anyonik olarak artırdığını, -31,3 mV değerinden -45,3 mV değerine yükseldiğini göstermişlerdir. Kullandığımız magneto-lipozom yükünün anyonik olarak ölçülmesi değeri maghemitin yükünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2 Caco-2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Nanodrop Ölçüm Değerleri

Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin cDNA'ya çevirme ve sorasında RT-PCR gen ekpresyonları belirlemek için, RNA miktarları ve kaliteleri yeterli olarak ölçülmüştür. Bu ölçüm değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA miktarları ve kaliteleri nanodrop ölçümleri

Caco-2 Hücreleri	A260/A230	A260/A280	RNA Miktarı
Kontrol	2.293	1.980	139.0 µg/mL
Mision siRNA TA	2.296	1.998	123.3 µg/mL
1 Nolu Örnek	2.322	2.000	186.9 µg/mL
2 Nolu Örnek	2.312	2.003	143.8 µg/mL
3 Nolu Örnek	2.932	1.965	66.78 µg/mL
4 Nolu Örnek	2.273	2.003	121.4 µg/mL

4.3 HT29 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Nanodrop Ölçüm Değerleri

HT29 hücrelerilerinden izole edilen RNA'ların, cDNA çevrilmesi ve sonrasında RT-PCR gen seviyelerinin ölçülmesi için kalite ve miktarları yeterli olarak ölçülmüştür. Bu değerler Tablo 4.2 verilmiştir.

Tablo 4.2 HT29 hücrelerinden izole edilen RNA miktarları ve kaliteleri nanodrop ölçümleri

HT29 Hücreleri	A260/A230	A260/A280	RNA Miktarı
Kontrol	2.210	1.994	97.91 µg/mL
Mision siRNA TA	2,161	2.013	93.81 µg/mL
1 Nolu Örnek	2.176	2.048	54.77 µg/mL
2 Nolu Örnek	2.230	1.986	87.02 µg/mL
3 Nolu Örnek	2.199	1.983	129.1 µg/mL
4 Nolu Örnek	2.235	1.990	57.91 µg/mL

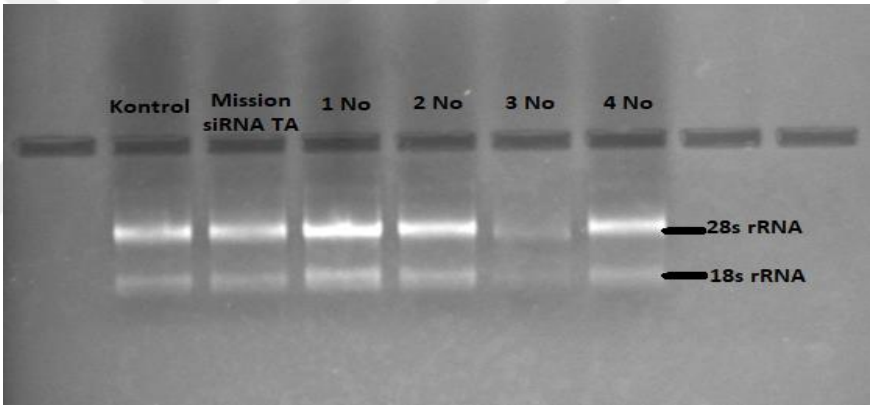
Gen ifadesi değerlendirmesinin doğruluğunun, başlangıç RNA'sının miktarı ve kalitesinden etkilendiği kabul edilmektedir. RNA'nın saflığı ve bütünlüğü, RNA tabanlı analizlerin genel başarısı için kritik unsurlardır. Düşük kaliteli RNA ile başlamak, genellikle yoğun emek, zaman alıcı ve oldukça pahalı olan sonraki uygulamaların sonuçlarını büyük ölçüde tehlikeye atabilir . En bariz sorun, RNA'nın bozulmasıyla ilgilidir ve bu, en iyi şekilde, her RNA'nın hazırlık, nitelik ve nicelik açısından titizlikle değerlendirilmelidir (Fleige ve Pfaffl, 2006; Raeymaekers, 1993).

Spektrometrik 260/280 okunan saflık değeri protein konaminasyonunu gösterir. Bu oran RNA kalitesi için en ideal faflık değeri 2,0'dır.A260/A230 oranında okunan

saflık değeri 2,0 – 2,2'nin altında ise bu durum taşınan karbonhidratlar, çökeltme için nükleik asit ekstraksiyonundan elde edilen artık fenol, artık Guanidin (sıklıkla kolon bazlı kitlerde kullanılır) ve Glikojen gibi birçok faktörden kaynaklanabilir. A260/A230 oranında okunan saflık değeri 2,0 – 2,2 değerinin üzerinde ise kör ölçümün kirli bir zeminde yapılması ve ölçüm için uygun olmayan bir solüsyon kullanılması gibi bunun birçok nedeni olabilir (Sophian ve Nasir, 2023).

4.4 Caco-2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Jel Görüntüsü

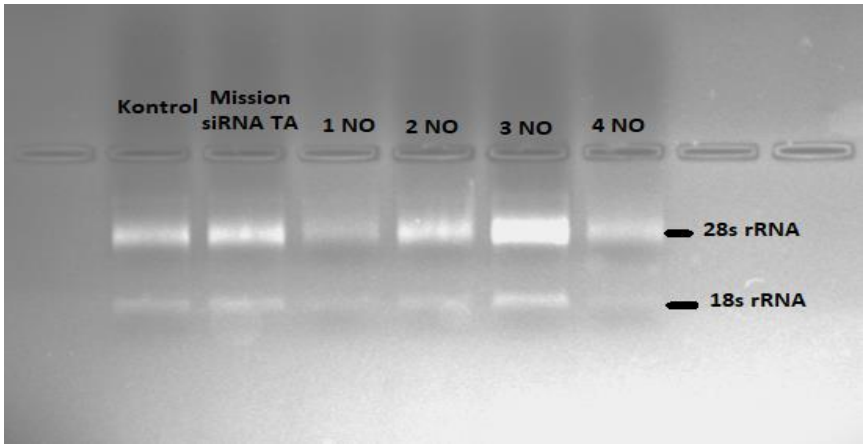
Caco-2 hücrelerine farklı doz siRNA yüklü magneto-lipozomlarının, uygulamadan 24 saat sonra izole edilen RNA'nın jel görüntüsünde, 28s rRNA ve 18s r RNA iki bant olarak ayrımları gözlendi. RNA miktarları nanodrop ölçümleriyle uyumlu şekilde gözlendi. Bant görüntüleri Şekil 4.7'da verilmiştir.



Şekil 4.7 Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA'nın bant görüntüleri

4.5 HT29 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'nın Jel Görüntüsü

siRNA yüklü magneto-lipozomların farklı dozlarla uygulamadan 24 saat sonra HT29 hücrelerinden izole edilen RNA'nın elektroforez jel görüntüsünde herbir örneğin 28s rRNA ve 18S rRNA olarak iki bant olarak ayrıldığı gözlenmiştir. HT29 hücrelerinin Jel görüntüsü şekil 4.8'da verilmiştir.

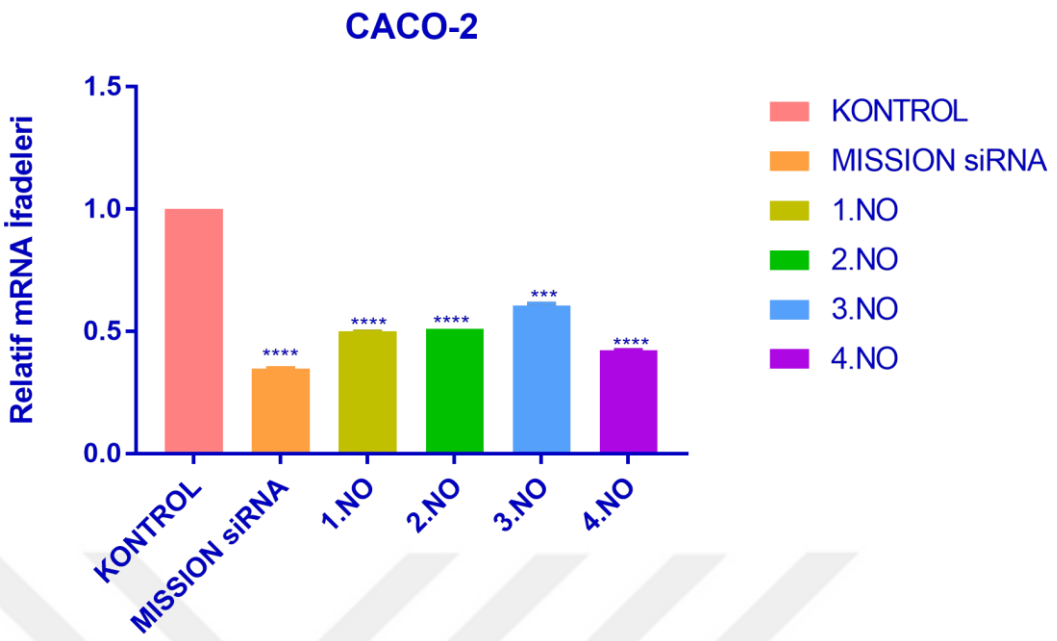


Şekil 4.8 HT29 hücrelerinden izole edilen RNA'nın bant görüntüleri

Bozulmamış rRNA'da 28S ve 18S bant yoğunluk oranının 2:1 olması gerektiği kabul edilir. Bununla birlikte, bazı dokularda, normal saflaştırmadan sonra 28S/18S oranı 1:2 veya 1:3'tür. Bu etkinin, saflaştırma sürecindeki sadece RNA bozulmasına bağlı olması gerekmediği belirtilmiştir. Bu 2:1 oranı (28S:18S), bozulmamış RNA'nın iyi bir göstergesidir. RNA bütünlüğü azaldıkça 28S:18S bandının yoğunluğu azalacaktır. Kısmen bozulmuş RNA lekeli bir görünüme sahip olarak ve keskin rRNA bantlarından yoksun olacaktır. Tamamen bozulmuş RNA, çok düşük moleküler ağırlıklı olarak jelde yayma olarak görünecektir (Skrypina vd., 2003; Thomas, 2023).

4.6 Caco-2 Hücrelerinin KRAS Gen Susturma Seviyeleri

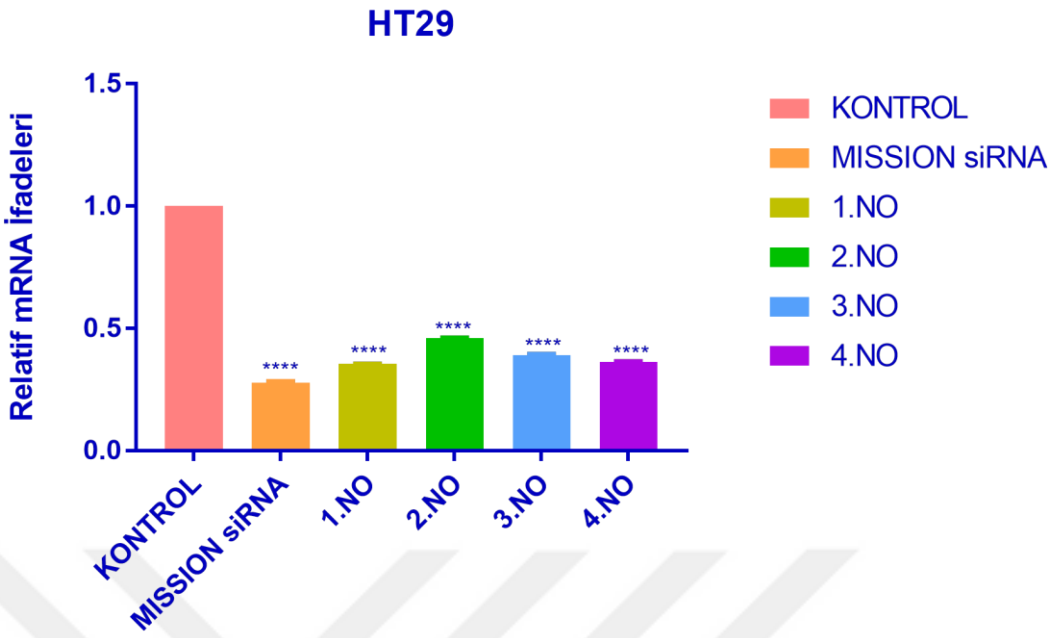
Caco-2 hücreleri için hazırlanan doz örneklerde final konsantrasyon 50 nM KRAS siRNA olarak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak Mission siRNA TA %66, 1 nolu örnek %50, 2 nolu örnek %49, 3 nolu örnek %39 ve 4 nolu örnek %58 oranında KRAS genin ifadesinin baskılandığı hesaplanmıştır. Burada 4 nolu örnek diğer örneklerle karşılaştırıldığında en yüksek susturma kabiliyetine sahip olduğu gözlenmiştir. En az susturma seviyesi 3 numaralı örnekte ve pozitif kontrol olarak kullanılan Mision siRNA transfeksiyon ajanında ise en fazla susturma oranı görülmektedir. Ancak 4 numaralı örnekle kıyaslandığında aralarında önemli ölçüde fark gözlenmemiştir. Farklı dozlar uygulanan Caco-2 hücrelerinin KRAS gen ifadesi Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Caco-2 hücrelerine uygulanan farklı dozların KRAS gen susturma değerleri

4.7 HT29 Hücrelerinin KRAS Gen Susturma Seviyeleri

HT29 hücreleri gen ifade değerlerine bakıldığında, final konsantrasyon 50 nM olarak kullanılan KRAS siRNA uygulamalarında 1 nolu örnek %64,4, 2 nolu örnek %53,7, 3 nolu örnek 61,6 ve 4 nolu örnek % 63,4 oranında KRAS genini baskıladığı hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Mission siRNA TA %72,3 oranla en fazla gen baskılama değerine sahip olduğu gözlenmiştir.. Kullanılan doz değerleri değerlendirildiğinde, 1,3 ve 4 nolu örnekler birbirine yakın KRAS genini baskıladığı görülmektedir. HT29 hücrelerinin KRAS gen ifadesi Şekil 4.10' de verilmiştir.



Şekil 4.10 HT29 hücrelerine uygulanan farklı dozların kras gen susturma değerleri

Kamran vd., (2022), SW480 kolon kanseri hücre hattıyla yaptıkları çalışmada, KRAS ve P38a gen ifadelerini siRNA ile hedeflemişlerdir. Gen transferi olarak kullandıkları siRNA transfeksiyon ajanıyla, 100 nM final konsantrasyon KRAS siRNA ile yapılan hedeflemede, 24. Saatin sonunda gen ifadesini % 26.48 düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler, yaptığımız çalışmada final konsantrasyonu 50 nM siRNA olan, pozitif kontrol Mission siRNA transfeksion ajanıyla benzer özellikler göstermiştir.

Strand vd., (2019), pankreas ve kolon kanserinde, transfer ajanı olarak, oligonükleotid yoğunlaştırıcı peptit nanopartikülerle yaptıkları in vitro çalışmada, siRNA ile KRAS genini hedeflemişlerdir. Kolon kanserinde %55 oranında bir gen susturma oranını gözlemlemişlerdir.

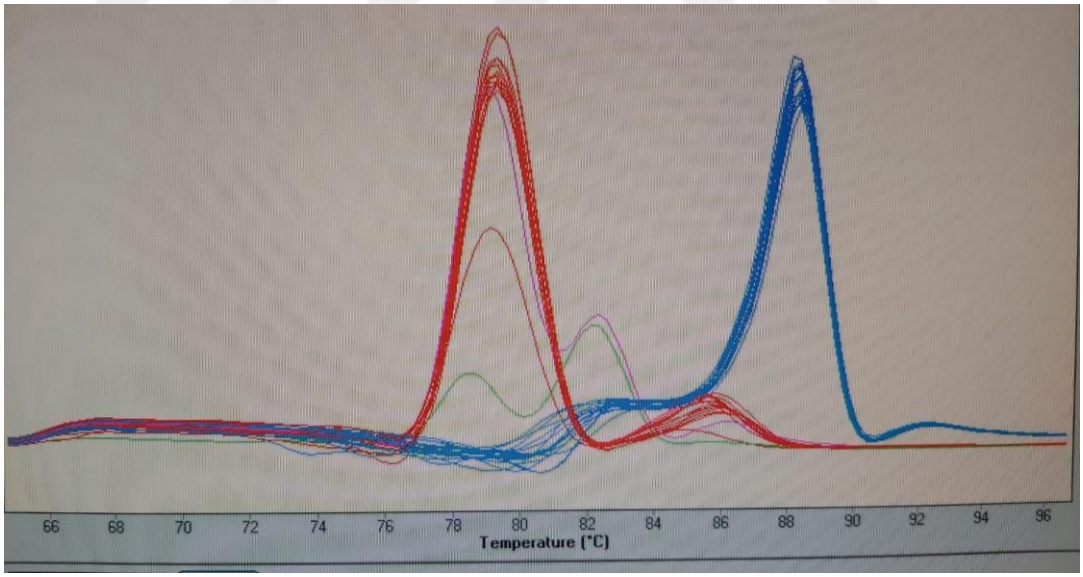
Tirella vd., (2019), hiyalüronik asit kapli Çitosan ve Nanocin nanopartiküllerine KRAS siRNA yükleyerek kolon kanseri hattı olan HCT-116 hücrelerine uygulamışlardır. Final konsantrasyon 40 nM siRNA uygulamalarında, pozitif kontrol olarak kullandıkları transfeksiyon ajanı lipofektamin %71 oranında, Çitosan %76 ve Nonocin %44 oranında KRAS genini susturduğunu hesaplamışlardır.

Zarredar vd., (2019), KRAS siRNA ve EGFR inhibitörü kullanarak akciğer kanseri A549 hücrelerinde gen ifadesini baskılamışlardır. siRNA transfeksiyon ajanına yükledikleri 80 pM KRAS siRNA % 73,3 oranında KRAS genini baskılandığını gözlemlemişlerdir.

Luo vd., (2021), pankreas kanseri PANC-1 ve CFPAC-1 hücre hatlarında KRAS si RNA yüklü HAp-PEI ve farklı nanopartiküller kullanarak KRAS genini hedeflemişlerdir. Sadece HAp-PEI nanopartiküllerle etkili bir susturma gözlemişlerdir.

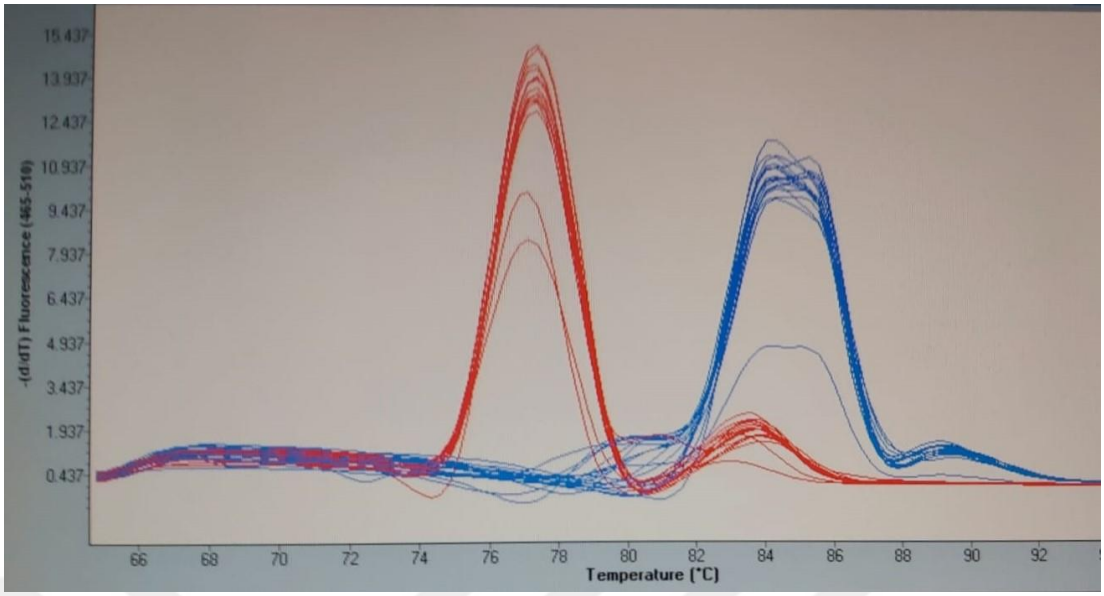
4.8 Erime Eğrisi

Caco-2 hücrelerinin gen seviyesi ölçümü sırasında kullanılan primerin, RT-PCR' daki erime eğrisi grafiği yorumlandığında, primerler arasında herhangi bir dimerleşme olmadığı, bu da primerlerin sadece hedef gene bağlanması ve sorunsuz bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Erime eğirisi Şekil 4.11 de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Caco-2 hücreleri gen ifadesi ölçümü RT-PCR erime eğrisi grafiği

HT29 hücrelerinin gen ifade seviyesi ölçümü sırasında kullanılan primerlerin RT-PCR erime eğrisi grafiğine bakıldığında, kullanılan primerlerin dimerleşme göstermediği gözlenmiştir. Erime eğrisi Şekil 4.12 'de gösterilmiştir.



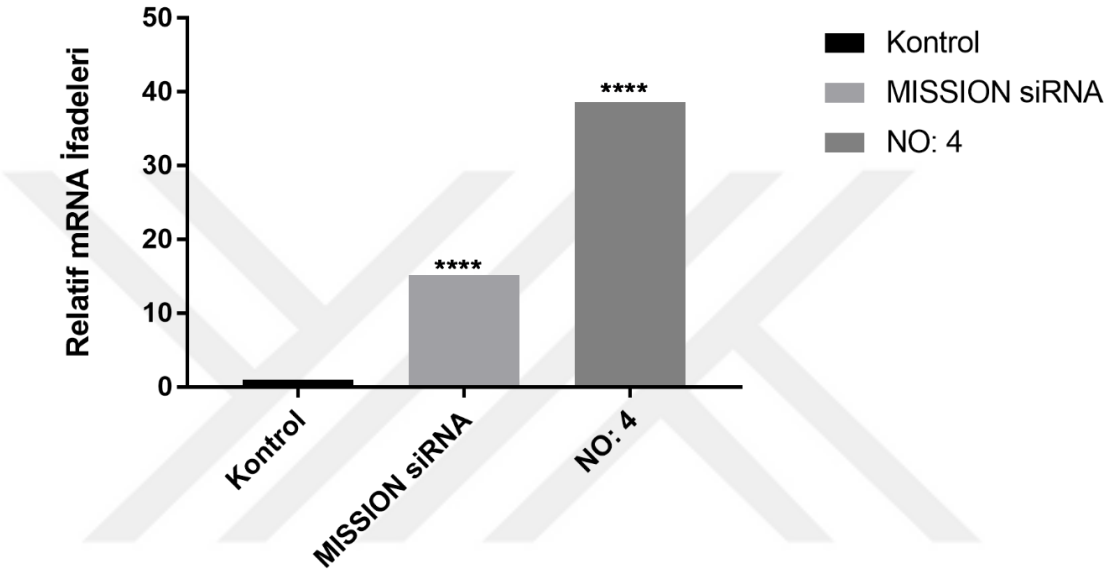
Şekil 4.12 HT29 hücrelerinin gen ifadesi ölçümü RT-PCR erime eğrisi grafiği

Herhangi bir amplifikasyon yöntemi için temel zorluk, spesifik olmayan ürünlerin oluşumuna yol açan ve testlerin özgüllüğünü ve duyarlılığını azaltan yan reaksiyonlardan kaçınmaktır. İstenmeyen reaksiyonlar genellikle zayıf primer tasarımı veya uzun süreli amplifikasyondan kaynaklanan primer dimer (PD) oluşumu nedeniyle meydana gelir. Doğru primer tasarımı için yöntemler ve bilgisayar programları geliştirilmiştir (Garafutdinov vd., 2020).

Her ürünün erime sıcaklığı (Tm), karşılık gelen tepe noktası sıcaklığı olarak tanımlanır. Erime noktası (Tm), optimum primer hizalamasını sağlamak için en önemli faktördür. Bu sıcaklık 58 ile 60 °C arasında olmalı ve her iki primer de benzer Tm'ye sahip olmalıdır. Primerler ve problar, onları son derece spesifik hale getirmeye çalışarak dikkatlice tasarlanmalıdır. seçilen primerlerin özgüllüğünü doğrulamanın yanı sıra, küçük boyutlarından dolayı genellikle istenen üründen daha düşük sıcaklıklarda eriyen primer-dimerlerin varlığını ortaya çıkarır ve bunların varlığı, hedef genin amplifikasyon etkinliğini ciddi şekilde azaltır (Prada-Arismendy ve Castellanos, 2011).

4.9 Caco-2 Hücrelerinin BCL-2 ve BAX Gen Seviyeleri

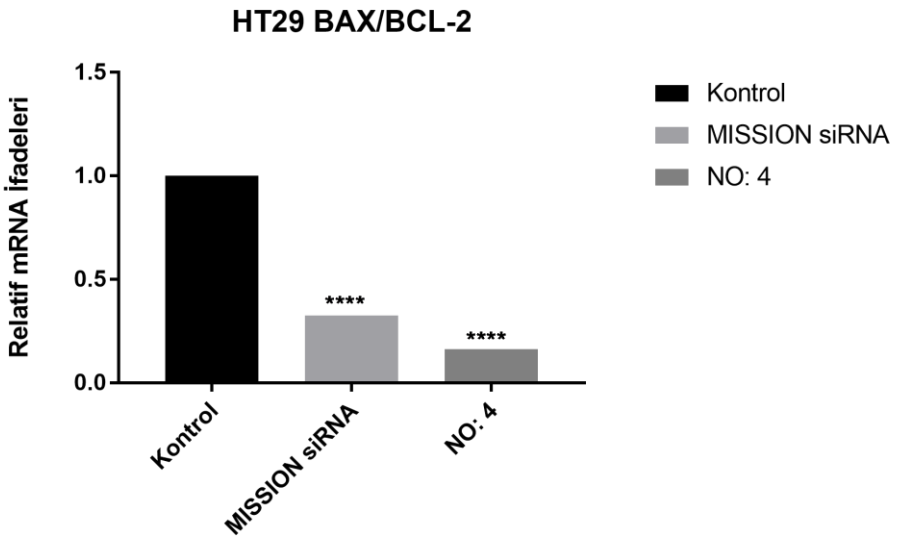
Caco-2 hücreleri gen seviyeleri BAX/BCL-2 oranı Şekil 4.13'te verilmiştir. Gen ifadeleri oranı, Caco-2 hücreleri uygulamadan sonra kontrol ile kıyaslandığında hem pozitif kontrol olarak Mission siRNA TA hem de 4 nolu örnek (100:20:1, Lipozom:SPİON:siRNA w/w) apoptoza sürüklediği hesaplanmıştır. En yüksek değer 4 nolu örnekte görülmüştür.



Şekil 4.13 Caco-2 hücreleri BAX/BCL-2 gen seviyeleri oranı

4.10 HT29 Hücrelerinin BCL-2 ve BAX Gen Seviyeleri

HT29 hücreleri BCL-2 ve BAX gen ifadeleri oranı, kontrol ile kıyaslandığında Mission siRNA TA ve 4 nolu örneklerde bu oran düşük çıkmıştır. BCL-2 yüksek ifadesi apoptozu engelendiği düşünülmektedir. HT29 hücreleri kanser spesifik hücreleri olarak apoptozdan kaçtıkları gözlemlenmiştir. HT29 hücrelerinin BAX/BCL-2 gen ifade oranları Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 HT29 hücreleri BAX/BCL-2 gen seviyeleri oranı

BCL-2 ailesinin, mitokondriyal işlev bozukluğu tarafından tetiklenen içsel apoptotik yolu teşvik etmede veya engellemede önemli bir rol oynadığı keşfedilmiştir. Bu nedenle, bu ailenin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki denge, hücresel kaderi belirleyebilir. BAX ve BCL-2 BCL-2 ailesinin başlıca üyeleridir.Tümör ilerlemesinde ve farklı insan malignitelerinin prognozundaki potansiyel rolü çeşitli çalışmalarda ilgi konusu olmuştur. (Khodapasand vd., 2015; Yip ve Reed, 2008).

BAX, apoptozu kontrol etmede çok önemli rol oynayan pro-apoptotik bir proteindir. Genellikle anti-apoptotik proteinlerle heterodimerize olarak sitoplazmada bulunur. Bir hücre apoptotik bir uyarana maruz kaldığında, BAX proteini mitokondriye taşınır. BAX'ın artan ifadesi erken apoptoza aracılık eder. BCL-2, hücre sağ kalımını ve canlılığını destekleyerek; füzyon ve fisyon gibi mitokondriyal dinamikleri düzenler (Alam vd., 2022).

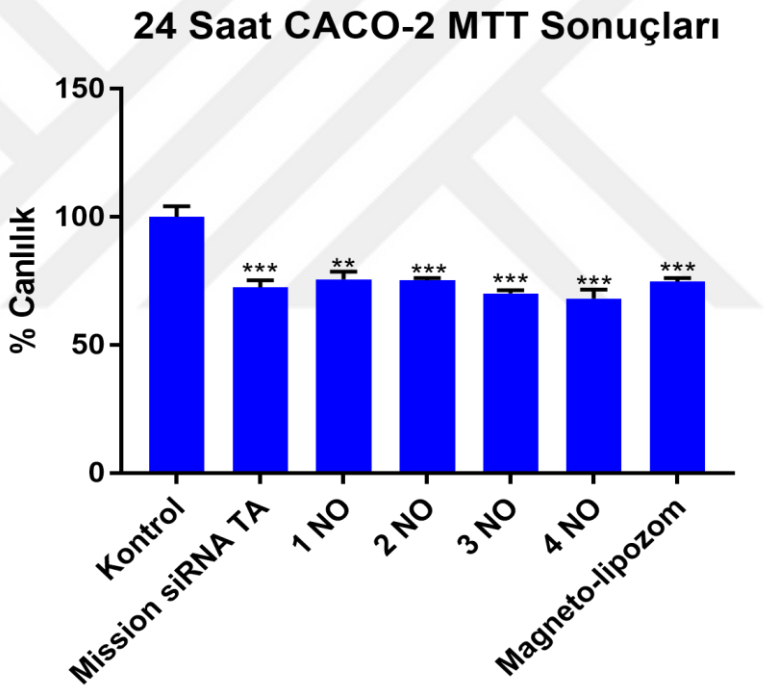
4.11 Hücrelerin Sitotoksisite Çalışmaları

Hücrenin yaşayabilirliği, pozitif kontrol olarak KRAS siRNA yüklenmiş Mission siRNA transfeksiyon ajanı, farklı dozlarda hazırlanmış siRNA yüklü Magneto-lipozom (DSPC:DC-Cholesterol: PEG+SPİON+siRNA) ve hazırlanan dozlarda en yüksek değerde (Lipozom:SPİON, 100:20 w/w) kullanılan siRNA yüklenmemiş magneto-lipozom (DSPC:DC-Cholesterol: PEG+ SPİON) Caco-2 ve HT29 hücrelerine uygulanarak, sitotoksisite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler %

Canlı hücre sayısı: (Örneğin absorbansı/ Kontrolün absorbansı) X 100 formülü ile belirlenmiştir.

4.11.1 Caco-2 hücre sitotoksisite deney (MTT) sonuçları

Caco-2 hücrelerine doz uygulamasından 24. saatin sonunda örneklerin absorbans değerleri alınarak canlı hücre yüzde olarak hesaplamıştır. Hesaplanan değerler Şekil 4.15'da verilmiştir. Kullanılan bütün dozlarda bir hücre ölümü gözlenmiştir. En yüksek sitotoksisite etki 4 nolu örnekte ve siRNA yüklü olmayan Magneto-lipozomda gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Mission siRNA transfeksiyon ajanı örneğinde anlamlı bir sitotoksisite etki gösterdiği hesaplanmıştır.



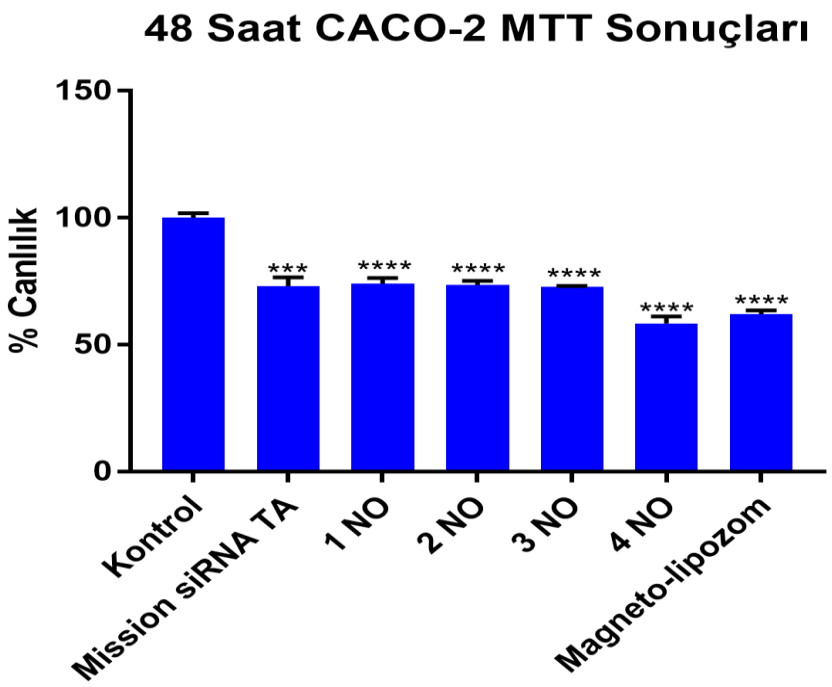
Şekil 4.15 Caco-2 24.saat MTT sonuçları

Zeng vd., (2014), yaptıkları çalışmada insan pankreas kanseri mutant KRAS PANC-1 ve BXPC-3 hücre hatlarını kullanmışlardır. Final konsantrasyon 100 nM KRAS siRNA yüklü PEG-PLL nanopartiküLLERİNİ farklı dozlarda kullanmışlardır. 24, 48 ve 72 saatlerin sonunda MTT testiyle sitotoksisite etkisine bakmışlardır. Birleştirilmiş nanopartiküllerin yüksek düzeyde sitotoksisite etki gösterdiğini ve kullanılan siRNA yüklü olmayan nanopartiküllün de sitotoksisite etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu

çalışmada 24. saatin sonunda gelişen sitotoksisite etkisi 3 ve 4 nolu örneklerde yüksek dozda magneto-lipozom kullanılmasından dolayı meydena geldiği düşünülmektedir.

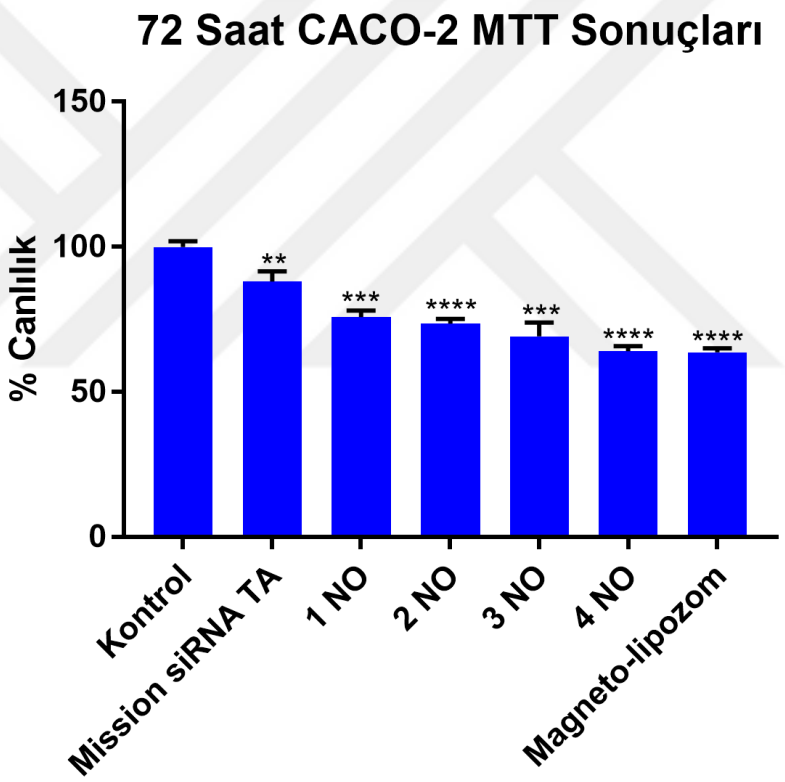
Wen vd., (2017), insan akciğer kanseri A549 and H69 hücre hatlarına DOX/PJDA-PEG-siRNA Kras çoklu ilaç geliştirmişlerdir. Sitotoksisite ölçmek için MTT testi uygulamışlardır. 24.saatin sonunda DOX/PJDA-PEG-siRNA çoklu ilacın, sadece DOX ve DOX/PJDA-PEG uygulamalarından daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Caco-2 hücrelerine uygulamadan 48. saatin sonunda ölçülen MTT değerleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, uygulanan bütün dozların sitotoksisite etki gösterdiği gözlenmiştir. 48.saate en yüksek sitotoksisite değeri 4 nolu örnek ve siRNA yüklü olayan magneto-lipozom göstermiştir. Pozitif kontrol, 1, 2 ve 3 nolu örneklerde benzer sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. 48.saatin sonunda 4 nolu örnekte meydana gelen hücre ölümü yüksek dozda kullanılan magneto-lipozomdan geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.16 Caco-2 48.saat MTT sonuçları

Caco-2 hücreleri uygulamadan 72. Saatin sonunda ölçülen MTT değerleri hesaplanarak yüzde canlılık olarak Şekil 4.17'de verilmiştir. Doz artırımına bağlı olarak artan sitotoksisite değeri ölçülmüştür. En düşük sitotoksisite değeri pozitif kontrol olarak kullanılan Mission siRNA TA'da gözlenmiştir. En yüksek değerler 4 nolu örnek ve siRNA yüklü olmayan magneto-lipozomda ölçülmüştür. 72. Saatin sonunda ölçülen değerde Mission siRNA TA sitotoksisite etkisinin azaldığını, siRNA yüklü magneto-lipozom örneklerinde ise doza bağlı olarak sitotoksisite etkileri gözlenmiştir. 1, 2, 3 ve 4 nolu örneklerde doza bağlı olarak gelişen sitotoksisite etkinin magneto-lipozomun sitotoksik etkisinden geldiği düşünülmektedir.



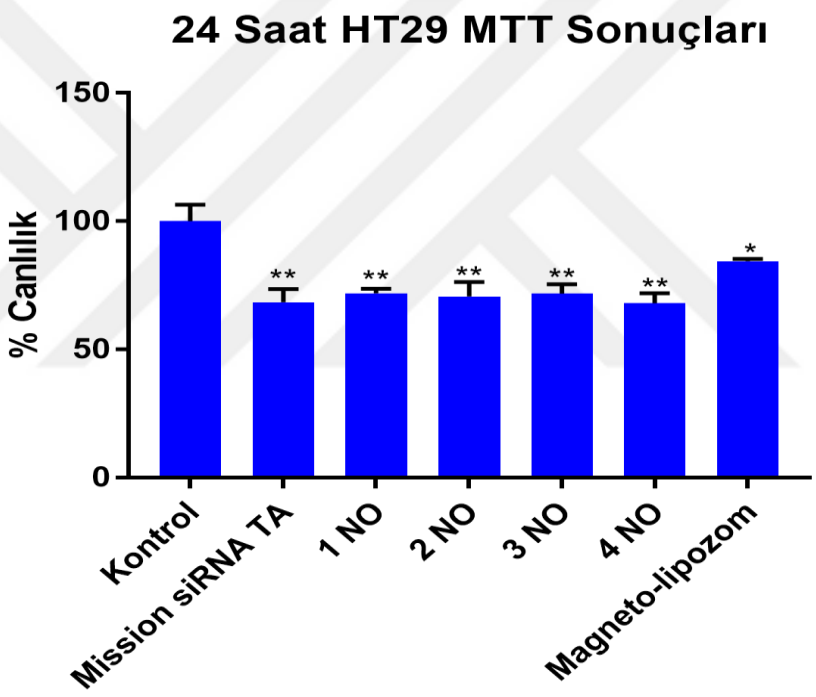
Şekil 4.17 Caco-2 72. saat MTT sonuçları

Wang vd.,(t.y.), manganez katkılı çinko selenid QD KRAS siRNA yükleyerek,Panc-1 ve Miapaca-2 insan pankreas kanseri hücre hatları ve MDA-MB-231 insan göğüs kanseri hücre hattı ve RAW 264.7 fare lösemik monosit makrofaj hücrelerine uygulama yapmışlardır. Gen ifadesinde bir susuturma gözlemledikleri taşıyıcı nanopartiküllerin MTT testiyle 48.saat sonrasında sitotoksisite ölçmüşlerdir. En düşük

etkiyi dot ve PAH kaplamalı dot nanopartiküllerinde, en yüksek değeri kadmiyum nanopartiküllerinde gözlemlemişlerdir.

4.11.2 HT29 hücre sitotoksisite deney (MTT) sonuçları

HT29 hücrelerine uygulanmak üzere hazırlanan doz, uygulamadan 24. saatin sonunda ölçülen absorbans değerleri ile hücre canlılığı Şekil 4.18'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde kullanılan bütün dozlar yaklaşık aynı oranda sitotoksisite etki gösterdiği gözlenmiştir. siRNA yüklü olmayan magneto- lipozom en düşük sitotksisite etki göstermiştir.



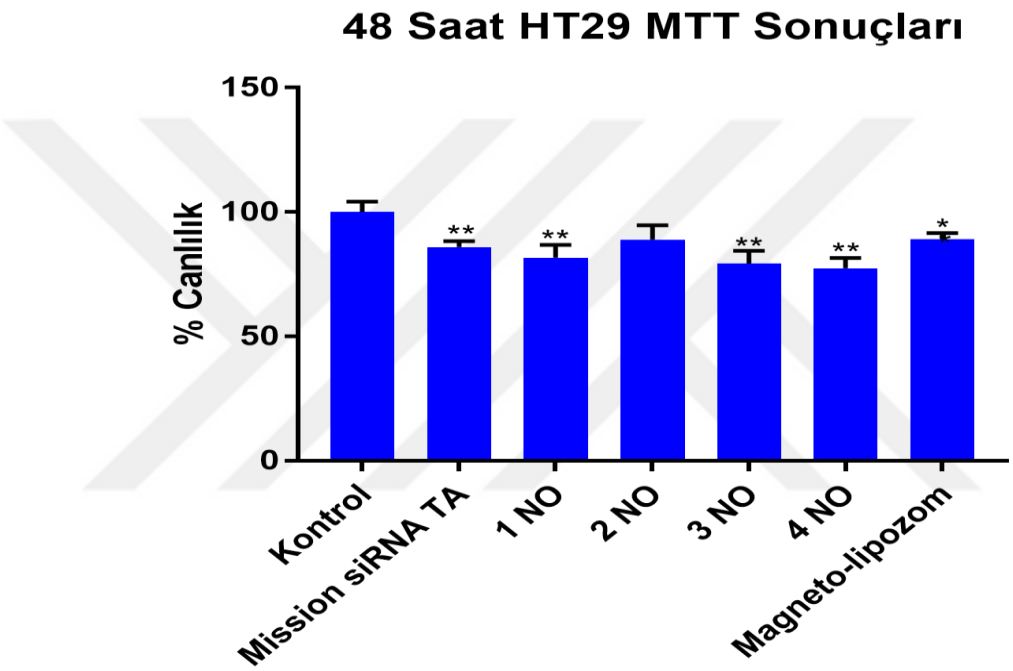
Şekil 4.18 HT29 24. saat MTT sonuçları

Luo vd., (2021), insan pankreas kanseri PANC-1, BXPC-3, CFPAC-1 hücre hattları ve insan pankreas ductal epitel hücre hattı HPDE6-C7 uygulanmak üzere farklı dozlardaki HAp-PEI nanopartiküllerine KRAS siRNA yüklemişlerdir. Kontrol ile kıyaslandığında hücre hatlarına sırasıyla %40, %65 ve %40 olarak önemli ölçüde yüksek sitotoksisite etki gözlemlemişlerdir.

Lin vd., (2012), insan kolon kanseri DLD-1, SW480 ve COLO320DM hücre hatlarını vektörlerle KRAS siRNA aktarmışlardır. Daha sonra, hücreler oxaliplatin, irinotecan,

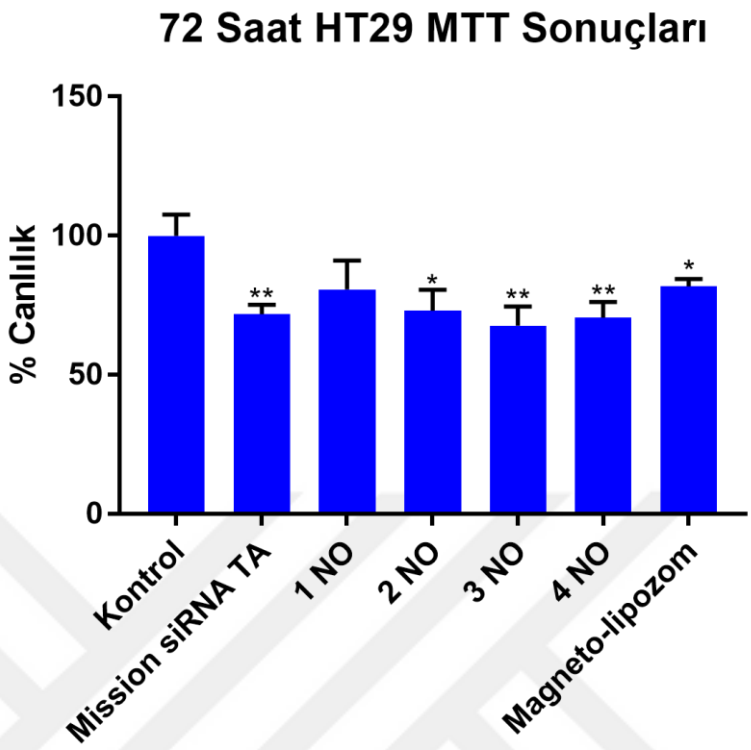
5-FU ve doxorubicin muamele etmişlerdir. 24, 48 ve 72 saatlerin sonunda hücre canlılığında bir azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir.

48. saat sonunda ölçülen ve hesaplanan değerler Şekil 4.19'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde ve kontrol ile kıyaslandığında en yüksek sitotoksiste değeri, en yüksek doz değerine sahip 4 nolu örnekte ve Mission siRNA TA olduğu hesaplanmıştır. Diğer uygulama dozları ise birbirlerine yakın değerde sitotoksisite etki göstermiştir.



Şekil 4.19 HT29 48. saat MTT sonuçları

HT29 hücrelerinin 72.saat sonunda elde edilen absorbans değerleri ölçülerek, hücre canlılığı yüzde olarak Şekil 4.20 'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde ve kontrol ile kıyaslandığında en yüksek sitotoksisite 4 nolu örnek ve Mission siRNA TA gözlenmiştir. En düşük değeri siRNA yüklü olmayan magneto-lipozom göstermiştir. Buradaki sitotoksisite etki kullanılan magneto-lipozom nanopartiküllerinden gelmediği, yüklü KRAS siRNA gen ifadesini baskılamasından geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.20 HT29 72. saat MTT sonuçları

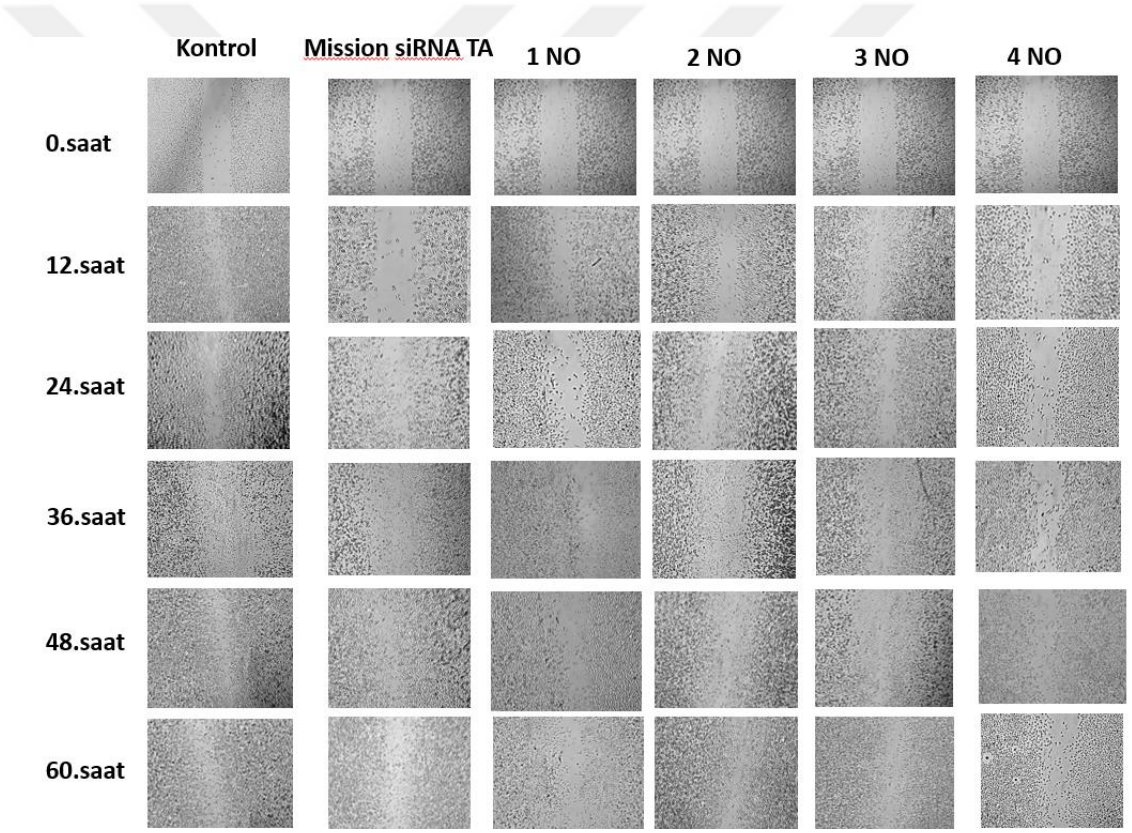
4.12 Yara iyileşme Deneyi Bulguları

Yara iyileşme deneyi veya çizik deneyi , pozitif kontrol olarak KRAS siRNA yüklü Mission siRNA TA ve farklı dozlarda magneto-lipozomla hazırlanmıştır. siRNA yüklü Magneto-lipozom (DSPC:DC-Cholesterol: PEG+SPİON+siRNA) ve hazırlanan dozlarda en yüksek değerde 4 nolu örnek magneto-lipozom (Lipozom:SPİON, 100:20 w/w). Hazırlanan dozlarda en yüksek değere sahip siRNA yüklenmemiş magneto-lipozom (Lipozom:SPİON, 100:20 w/w) Caco-2 ve HT29 hücrelerine çizik açılarak uygulanmıştır.

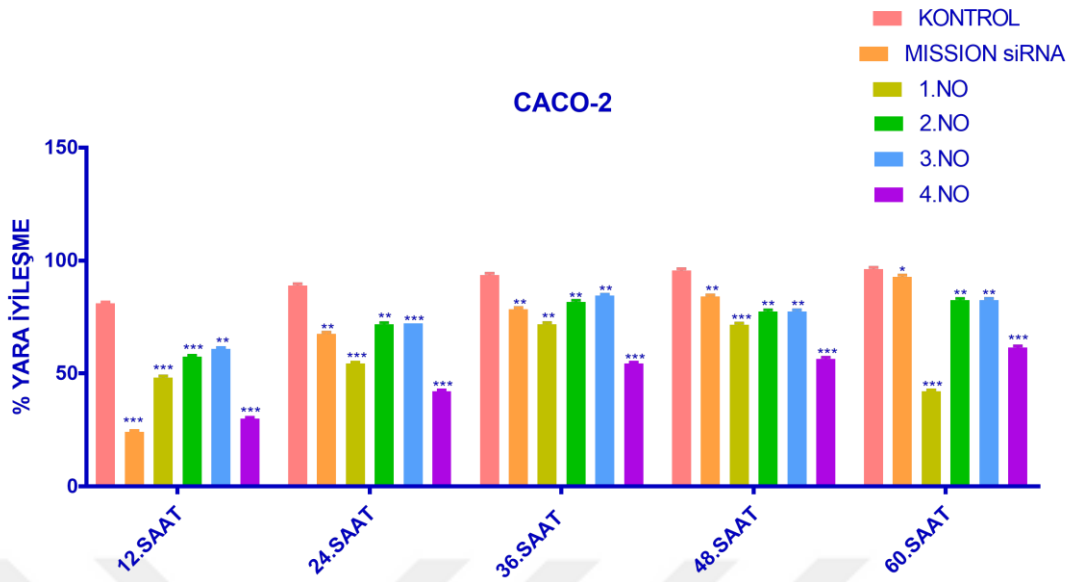
Hücre göçü, embriyonik gelişim, yara onarımı, anjiyogenez ve tümör metastazı gibi birçok fizyolojik süreç için gereklidir. Bu testte, fiziksel, mekanik, termal ve kimyasal hasar yoluyla hücrelerin bölgeden uzaklaştırılmasıyla birleşen tek tabakada hücresiz bir alan yaratılır. Hücresiz alana maruz kalma, hücrelerin boşluğa göç etmesine neden olur (Jonkman vd., 2014; Kauanova vd., 2021).

4.12.1 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deney sonuçları

Caco-2 hücrelerinin uygulama sonrası açılan yaranın kapanma durumu gösteren mikroskoptan çekilmiş resimler, Şekil 4.21' de verilmiştir. 12 saate bir çekilmiş yara durumu, image j programıyla hesaplanan % yara iyileşme oranı değerleri Şekil 4.22'de verilmiştir. 12. Saatte yaranın kapanmadığı en yüksek değerler, Mission siRNA TA ve 4 nolu örnekte görülmüştür. 3 nolu örnekte ise yaranın erken kapandığı gözlenmiştir. 24. saatin sonunda hesaplanan değerlerde, kontrol ile kıyaslandığında 2 nolu ve 4 nolu örneklerde yaranın kapanmadığı hesaplanmıştır. 36. 48. ve 60. Saat değerleri kontrol ile kıyaslandığında Mission siRNA TA giderek daha hızlı bir şekilde kapanmıştır. En geç kapanma 2 ve 4 nolu örneklerde gözlenmiştir.



Şekil 4.21 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deneyi sonuçları



Şekil 4.22 Caco-2 hücreleri yara iyileşme deneyi istatiksel sonucu

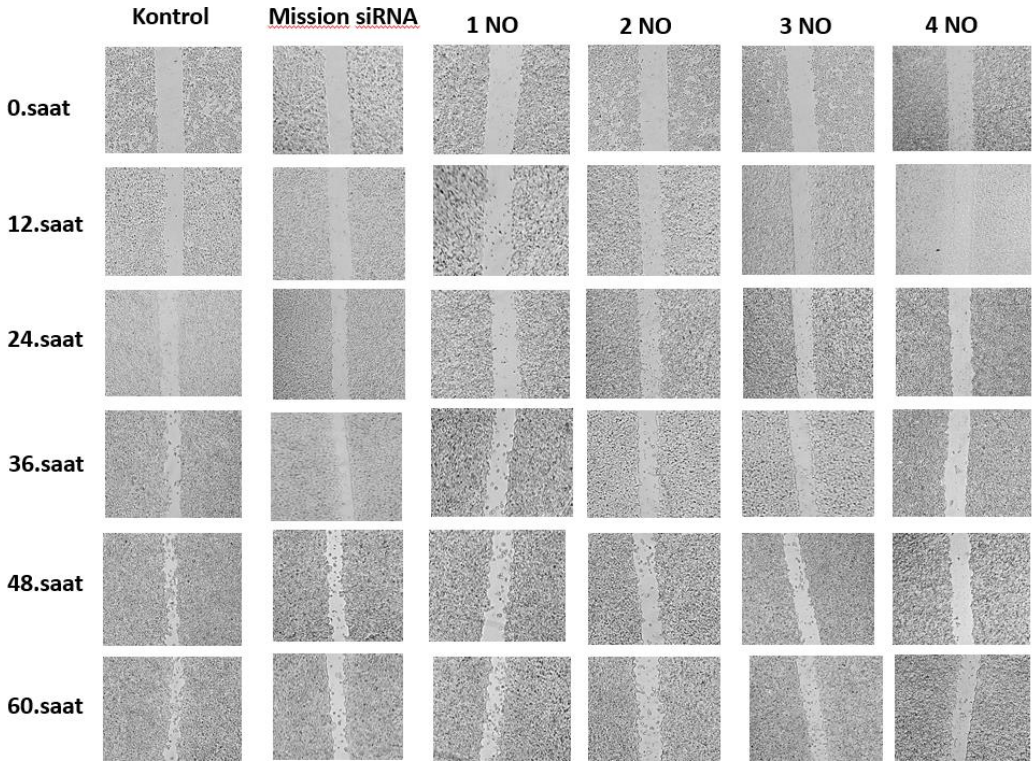
Kamran vd., (2022), SW480 kolon kanseri hücrelerine final konsantrasyon 100 nM KRAS siRNA ve 80 nM p38a siRNA yüklü transfeksiyon ajanıyla hedeflemişlerdir. Yaptıkları yara iyileşme deneyinde, açtıkları çiziklerin yara iyileşme durumlarını gösteren görüntüler her 24. saatte bir alınmıştır. Deney 72 saate kadar devam etmiştir. Hem KRAS siRNA hem de p38a siRNA uygulmaları kontrol ile kıyaslandığında yaranın geç kapandığını tespit etmişlerdir.

Al-Ghamdi vd., (2011), SW620 kolon kanseri hücrelerine transfeksiyon ajanıyla Kras siRNA ile hedefleme yapmışlardır. Yaptıkları yara iyileşme deneyinde 0. ve 48. Saat görüntülerini almışlardır. Kontrol ile kıyaslandığında 48. saatte yaranın kapanmadığını gözlemlemişlerdir.

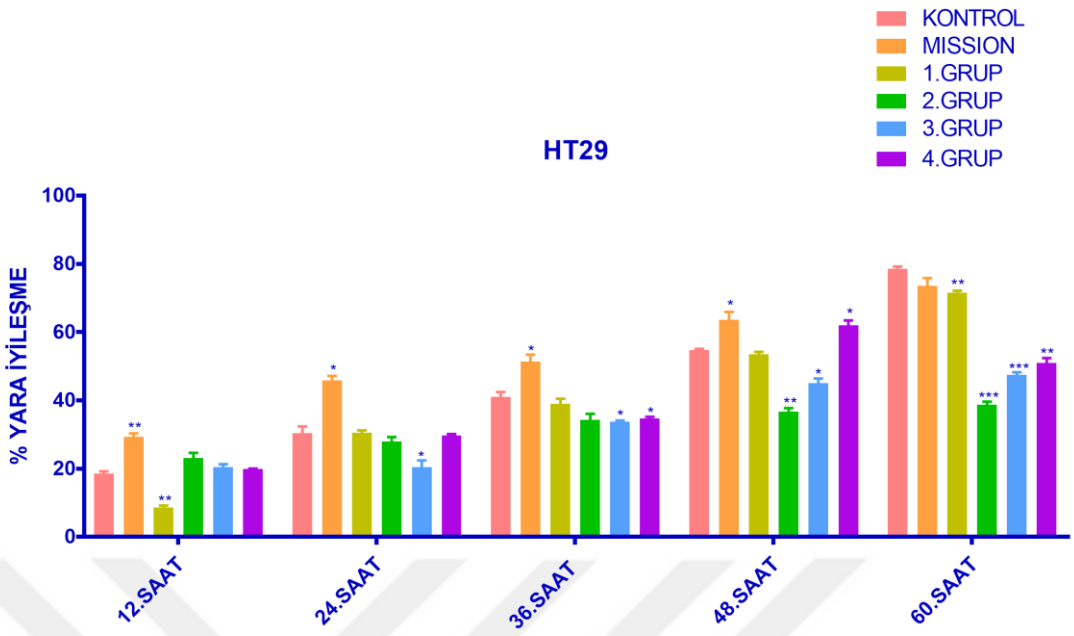
4.12.2 HT29 hücreleri yara iyileşme deney sonuçları

HT29 hücreleri belirlenen dozlarda uygulama sonrası yara kapanma durumu, her 12 saatte bir ve 60. saate kadar mikroskop görüntüleri alınmıştır. Yara kapanma durumu zamana bağlı olarak şekil 4.23'te verilmiştir. Çekilen resimlerin İmage J programıyla hesaplanan yara alanları yüzde olarak Şekil 4.24'da verilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında Mission siRNA TA 48. Saaten sonra yara kapanma durumunda bir gerileme olmuştur. 2 nolu örnekte zamana bağlı olarak geç kapanma söz konusu olmuştur. 60. saatin sonunda 3 ve 4 nolu örnekler, kontrol ile kıyaslandığında yara

kapanması en yavaş olarak hesaplanmıştır. Bu oranın 3 ve 4 nolu örneklerde geç kapanması, pozitif kontrol ile kıyaslandığında siRNA taşıyıcı olarak kullanılan yüksek doz magneto-lipozom nanopartiküllerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.23 HT29 hücreleri yara iyileşme deneyi sonuçları



Şekil 4.24 HT29 hücreleri yara iyileşme deneyi istatiksel sonucu

Yang vd.,(2015), insan pankreas kanseri MiaPaCa-2 hücrelerine KRAS siRNA yüklü biyolojik olarak parçalanabilen yüklü polyester bazlı vektör (BCPV) ve oligofektamin ile uygulama yapmışlardır. Yaptıkları yara iyileşme deneyinde 0, 24, 48 ve 72 saatlerde yara durumu, kontrol ile kıyaslandığında siRNA yüklü hem oligofektamin hem de BCPV yaranın geç kapandığını tespit etmişlerdir.

Yin vd., (2018), pankreas kanseri PANC-1 hücrelerine MoS_2 nano tabakalarına hem KRAS siRNA hem de birlikte kullanılmak üzere HDAC1 siRNA yüklemişlerdir. Yaptıkları yara iyileşme deneyinde 4 ve 72. Saatlerde yara kapanma durumunu gözlemlemişlerdir. Kontrol ile kıyaslandığında tek başına hem KRAS siRNA hem de KRAS ve HDAC1 siRNA birleştirilmiş çoklu ilaç uygulamasında, yaranın geç kapandığını gözlemlemişlerdir.

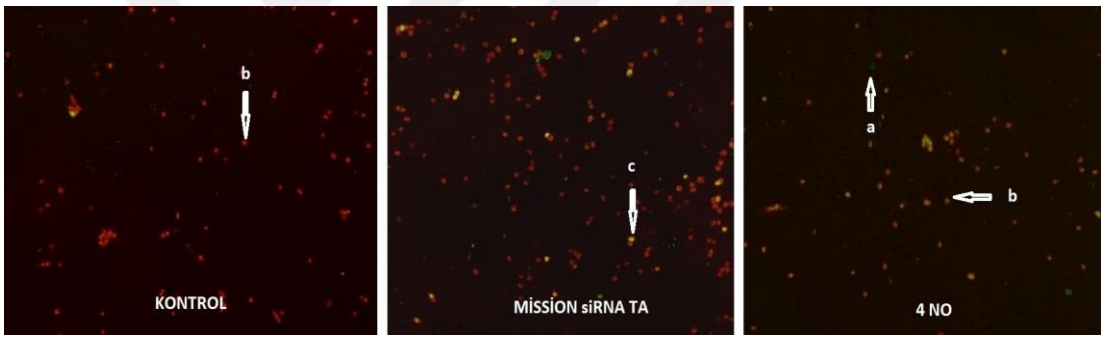
Zhang vd., (2021), pankreas kanseri PANC-1 hücrelerine KRAS siRNA yüklü katyonik polikarbonat nanopartiküllerle farklı dozlarda uygulama yapmışlardır. Gerçekleştirdeki yara iyileşme deneyine 0, 48 ve 72 saatlerde yara kapanma durumu belirledikleri bütün dozlarda, kontrol ile kıyaslandığında yaranın geç kapandığını tespit etmişlerdir.

4.13 Annexin V Apoptoz Testi

Caco-2 ve HT29 hücrelerine uygululanmak üzere pozitif kontrol olarak Mission siRNA TA ve 4 nolu örneklerin apoptoz etkileri anexin V ve PI ile belirlenmiştir.

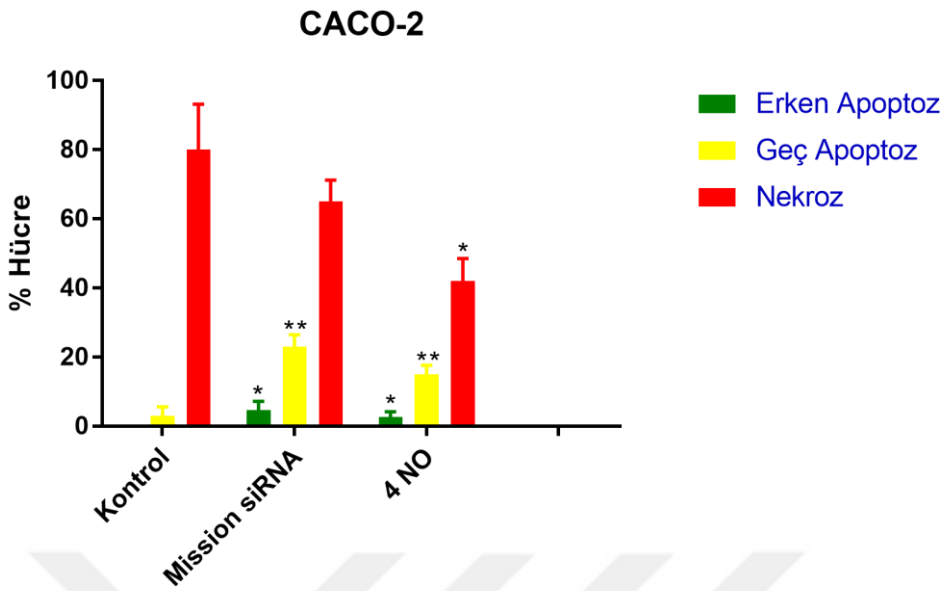
4.13.1 Caco-2 hücreleri apoptoz değerleri

Caco-2 hücreleri florasan mikroskopla çekilen resimlerde, rastgele seçilen alanlarda 3 tekralı olarak apoptoz aşamaları için hücreler sayılmıştır. Erken apoptoz hücreleri pozitif kontrol olarak kullanılan Mission siRNA TA ve 4 nolu örnekte sayılmıştır. Kontrol hücrelerin nekrotik hücre varlığı siRNA TA ve 4 nolu örnekten fazla olduğu gözlemlenmiştir. Caco-2 hücreleri florasan mikroskop görüntüleri Şekil 4.25'de ve isatiksel grafiği Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.25 Caco-2 hücreleri apoptoz florasan mikroskop görüntüleri

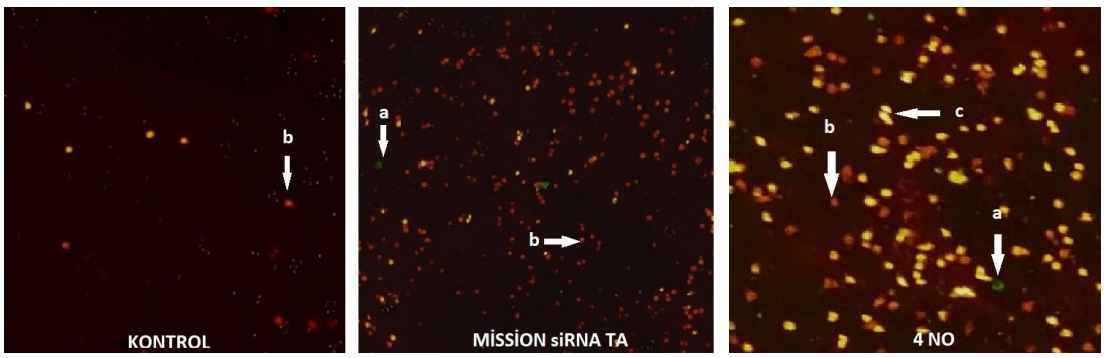
a:Erken apoptoz, yeşil renk (annexin+), b: Nekrosiz, kırmızı renk (PI+), c:Geç apoptoz, sarı renk (annexin+,Pİ+).



Şekil 4.26 Caco-2 hücreleri apoptoz istatiksel grafiği

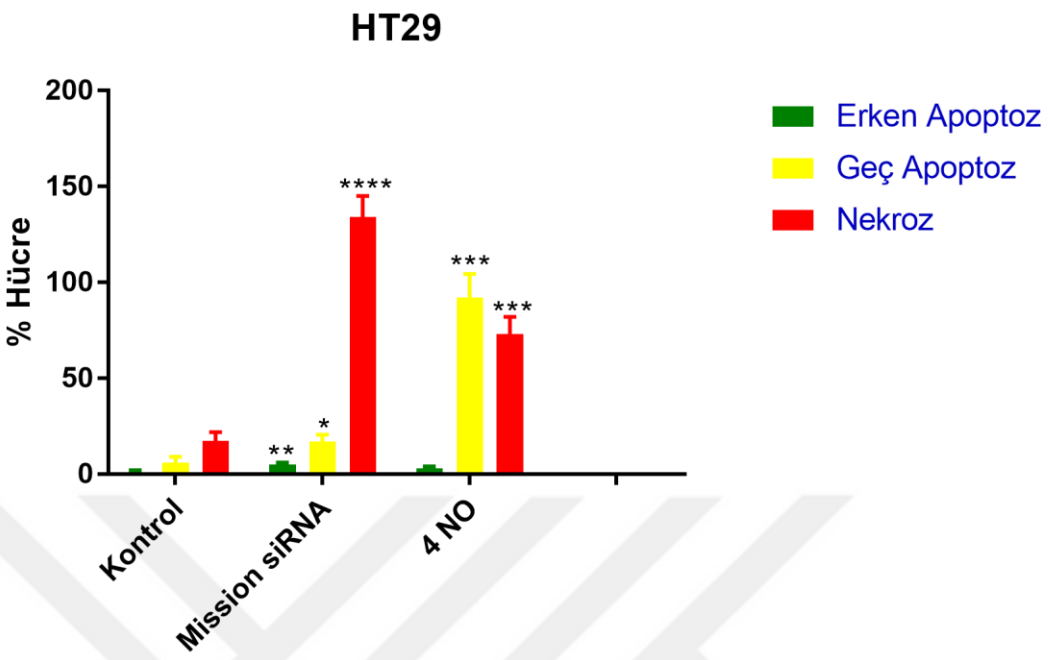
4.13.2 HT29 hücreleri apoptoz değerleri

HT29 hücrelerinin florasan mikroskop resimlerinde 3 tekrarlı rastgele seçilen alanlarda hücre apoptoz sayımları yapılarak, apotoz aşamaları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 4 nolu örnekte geç apoptoz oranın fazla olduğu, nekroz hücrelerinin az olduğu hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Mission siRNA TA nekrotik hücre yogunluğu fazla olduğu belirlenmiştir. Konrol grubunda ise sadece nekrotik hücre varlığı gözlemlenmiştir. HT29 hücreleri apoptoz değerleri Şekil 4.27 ve istatiksel grafiği Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.27 HT29 hücreleri apoptoz florasan mikroskop görüntüleri

(a:Erken apoptoz, yeşil renk (annexin+), b: Nekroz, kırmızı renk (PI+), c: Geç apoptoz, sarı renk (annexin+,Pİ+))



Şekil 4.28 HT29 hücreleri apoptoz istatiksel grafiği

Bäumer vd.,(2015), KRAS siRNA ve anti-EFGR monoklonal anikor birleştirmesiye hem in vitro hem de invivo çalışması yapmışlardır. İn vitro çalışmalarında kolon kanseri, HTC-116, SW480, HT29, DLD-1 ve Lovo hücre hatlarına apoptoz çalışması yapmışlardır. Apoptoz oranı en çok DLD-1 hücrelerinde, en az olarak da HT29 hücrelerinde tespit etmişlerdir.

Mehta vd., (2019), siRNA yüklü sığır serumu albümin nanopartikülleri ile KRAS mutant akciğer kanseri hücrelerini hedefleme çalımalarında, A549 hücrelerini hedeflemişlerdir. 30 nM final konsantrasyonda siRNA yüklü nanopartikülleri uygulayarak, 48. Saatte apoptoz değerlerini anexin v ile ölçmüşlerdir. Hem siRNA KRAS ^{G12S} hem de siRNA KRAS toplam mutant ve normal hedeflemede apoptoz etkilerini incelemişlerdir. Kayde değer olarak, KRAS siRNA G12S ile transfekte edilen hücreler, toplam KRAS'a karşı siRNA ile transfekte edilen hücrelere kıyasla %1 daha fazla erken apoptotik hücre artışı gösterdiği ve bu da G12S'ye özgü susturmanın önemini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Zarredar vd., (2019), akciğer kanseri A549 hücrelerine 80 pM KRAS siRNA havuzu ve EGFR inhibitörü (Sapitinib) ve ikisini birleştirerek çoklu ilaç uygulamasını yapmışlardır. siRNA'nın hücrelere tranferini transfeksiyon ajanıyla yapmışlardır. 24.saatin sonunda anexin v ile ölçtükleri apoptoz değerlerinde hem KRAS siRNA hem de KRAS siRNA EGFR inhibitöründe apoptoz gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Süper manyetik demiroksit nanopartiküllerin(SPION) sentezlenmesi birlikte çöktürme yöntemiyle başarılı bir şekilde yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda demir oksit nanopartiküllerinin ökaryotik hücreler tarafından kullanılma formunda olduğu, toksik olmadığı anlaşılmıştır. Ancak demiroksit nanopartiküllerinin toksisitesi, boyut, şekil, konsantrasyon, yüzey yükü, kaplama tipi ve fonksiyonel gruplar dahil olmak üzere birçok özellikten etkilenmektedir (Yarjanli ve ark. 2017).

Sentezlenen nanopartikül karakterizasyonu TEM, FTIR, XRD, VSM ve Zata potansiyel ölçümleriyle nanopartikül yapı hakkında bilgi edinilmiştir. TEM görüntüleriye şekil ve boyutu görüntülenmiştir. FTIR değerlerinin faz analiz değerlerinde sentezlenen nanopartikülün karakteristik pikleri, yapının süperparamanyetik özellikte Fe_2O_3 olduğunu göstermiştir. Yapılan XRD ölçümleri faz analizinde, sentezlenen yapının maghemit (Fe_2O_3) olduğu tespit edilmiştir. VSM manyetik alan ölçümlerinde nanopartikülün manyetik özelliği olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyeli değerlerinde ise -40,3 mV ile negative bir yüke sahip olduğu, literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslanarak doğrulanmıştır. Manyetik nanopartikül zeta parçacık boyutu analizinde ortalama 190 nm olduğu tespit edilmiştir. Lipozom sentezi ince film yöntemiyle DSPC:DC-Kolesterol:PEG1000 kullanılarak başarılı bir şekilde yapılmıştır. Sentezlenen lipozom, manyetik nanopartiküller ile birleştirilerek magneto-lipozom oluşturulmuştur. Bu yapının karakterizasyonu TEM, FTIR, Zeta potansiyel yükü ve Zeta parçacık boyut analizi ile yapılmıştır. TEM görüntüleri ile lipozomun varlığı gösterilmiştir.Elde edilen Zeta potansiyel değeri -21,6 mV ile yüzey yükünün negatif olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyel yükü literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslanarak elde edilen değerlerin doğrulaması yapılmıştır. +30 mV'dan daha pozitif veya -30 mV'dan daha negatif yüke sahip kolloidal sistemlerin daha kararlı olduğu değerlendirilir. Sentezlenen magneto-lipozom zeta parçacık boyutu ortalama 767,4 olarak bulunmuştur. Çalıştığımız matriks kolloidal bir sistemdir. Sistemi oluşturan partiküller arasında itme ve çekme kuvvetleri bulunur. Çekme kuvvetlerinin etkili olması durumunda kolloidler bir araya gelerek daha büyük aglomerlere dönüşme ve çökelme eğilimi gösterirler. İtme kuvvetlerinin etkili olması durumunda ise partiküller bir araya gelemedikleri için süspanse olurlar. Lipozom ile

kaplandıktan sonra yüzey negatif yükünde kararlılığı da düşürecek şekilde bir azalma meydana gelmiştir. Yüzey yükündeki azalma sonucu, partiküller arasındaki itme kuvvetinin azalması nedeniyle daha büyük partikül boyutu ile sonuçlanacak aglomerleşme, floke oluşumu meydana geldiği düşünülmektedir.

Hem Caco-2 hem de HT29 hücrelerine uygulanmak üzere siRNA'nın transferi için farkılı konsantrasyonlarda (1, 2, 3, 4 nolu örnekler) magneto-lipozom dozlar belirlenmiştir. siRNA'nın transferi için, pozitif kontrol olarak Mission siRNA tarnsfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Herbir doz örneğe aynı oranda KRAS siRNA(final 50 nm) eklenmiştir. Caco-2 hücrelerinin KRAS gen ifadesinde en yüksek değer Mission siRNA TA'da gözlemlenmiştir. Taşıyıcı ajan olarak kullanılan magneto-lipozom dozları birbirine yakın değerde gen ifadesini baskıldığı tespit edilmiştir. HT29 hücrelerinde en yüksek gen ifadesi yine Mission siRNA TA'da gözlemlenmiştir. Magneto-lipozom ile belirlenen dozlar birbirine yakın değerde gen ifadesini baskıladığı gözlemlenmiştir. Gen ifadesi baskılama oranına bakıldığında her iki hücre tipinde de doza bağlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda daha az toksik etki göstermesi için daha az magneto-lipozom kullanılması uygun olduğu düşünülmektedir. Küçük parçacık boyutta manyetik nanopartikül elde edilmesi ve sentezlenen lipozomun diyaliz, polikarbon filtre ve mikroakışkan cihazı gibi farklı aşamalardan geçirilmesi ile daha saf oranda ve daha küçük partikül boyut elde edilmesiyle, gen ifadesinin baskılama oranı da artacağı düşünülmektedir.

Caco-2 hücreleri için BAX ve BCL-2 gen ifade oranı kontrol ile kıyaslanarak değerlendirildiğinde apoptoza sürükleği ve apoptozun Anexin V ile yapılan testlerde uyumlu olduğu tespit edilmiştir. HT29 hücrelerinde ise kontrol ile kıyaslandığında BAX/BCL-2 düşük oranıyla kanser hücre spesifik olarak apoptozdan kaçtığı tespit edilmiştir. HT29 hücrelerinin Annexin V ile yapılan apoptoz değerlerine bakıldığında tam tersi bir durum söz konusu olduğu tespit edilmiştir.

Sitotoksisite deney sonuçları değerlendirildiğinde Caco-2 hücreleri için, 24. Saat sonunda kullanılan dozlar birbirine yakın sitotoksisite etki gösterdiği gözlemlenmiştir. siRNA yüklü olamayan ve kullanılan en yüksek doza eş değer olan magneto-lipozom, daha az sitotoksisite etki göstermiştir. Burada KRAS siRNA'nın gen baskılamasından

bir hücre ölümü gerçekleştiği düşünülmektedir. 48. Saate bakıldığında siRNA yüklü olmayan magneto-lipozomun sitotoksisite etkisi artan doza bağlı olarak artığı gözlemlenmiştir. 48. Saat sonrasında elde edilen sitotoksisite değerleri, magneto-lipozomdan kaynaklandığı düşünülmektedir. 72. Saatin sonunda KRAS siRNA 'nın gen baskılamasından gelen hücre ölümünde bir azalma olduğu ve doza bağlı olarak gerçekleşen sitotoksisitenin, büyük oranda kullanılan magneto-lipozomun yüksek konsantrasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. HT29 hücreleri 24.Saatin sonunda Caco-2 hücreleriyle bezerlik göstermiştir. siRNA yüklü olmayan magneto-lipozom daha az toksik etki göstermiştir. Bu durum, meydana gelen sitotoksisite etki, KRAS siRNA'nın gen baskılamasından geldiği düşünülmektedir. 48. Saat MTT verileri incelendiğinde 24. Saat ile benzer durumun devam ettiği gözlemlenmiştir. 72. Saatin sonunda ölçülen değerlerde ise siRNA yüklü magneto-lipozom daha az sitotoksisite etki göstermiştir. Bu durumda HT29 hücrelerinin, transfer ajanı olarak kullanılan magneto-lipozoma daha dirençli olduğu düşünülmektedir.

Çizik çizilerek oluşturulan yara iyileşme deney sonuçları incelendiğinde, Caco-2 hücreleri için mission siRNA TA'nın zamana bağlı olarak yaranın kapandığı ve 60. Saatte kontrolle aynı değere yaklaştığı gözlemlenmiştir. Diğer dozlarda ise daha sabit ve yavaş yara kapanması tespit edilmiştir. 72. Saatin sonunda en düşük magneto-lipozom dozuna sahip 1 nolu örnek poztif kontrol ile benzerlik göstermiştir. Diğer dozlarda meydana gelen yara kapanma olayının yavaş olması yüksek oranda taşıyıcı olarak kullanılan magneto-lipozomdan kaynaklandığı düşünülmketedir. HT29 hücrelerinin yara iyileşme değerlerine bakıldığında 60. Saatte Caco-2 hücreleriyle benzer bir yara kapanma olduğu tespit edilmiştir.

Annexin V ile yapılan apoptoz deneyinde hem Caco-2 hücrelerinde hem de HT29 hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında, uygulama dozlarında az olmakla birlikte erken apoptoz ve geç apoptoz, kontrol gruplarında ise nekroz görüldüğü tespit edilmiştir.

Magneto-lipozomu oluşturan demiroksit nanopartikülleri ve lipozom bazı işlemlerle daha saf ve uygun boyutlarda hazırlanması, kullanılan magneto-lipozomun oranını düşürecektir. Kullanılan daha düşük konsantrasyonda magneto-lipozomun, toksik etkisi ortadan kalkacağı ve daha etkin gen ifadesinin baskılalayacağı düşünülmektedir.

İn vivo çalışmalarında, gen ve ilaç taşıyıcı olarak kullanılacak olan magneto-lipozomun, manyetik özelliğinden yararlanılarak istenilen bölgeye taşıma manüpülasyonları ve yapısında bulundurduğu demiroksit nanopartiküllerden dolayı dışardan uygulanacak sıcaklık ve ışın gibi etkilerle hedef bölgede ilaç dağıtımını sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aghamiri, S., vd., (2019). Targeting siRNA in colorectal cancer therapy: Nanotechnology comes into view. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(9), 14818-14827. https://doi.org/10.1002/jcp.28281

Akbarzadeh, A., vd., (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, *8*(1), 102. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102

Alam, M., vd., (2022). Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway: Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, *12*, 869672. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.869672

Al-Ghamdi, S., vd., (2011). Cten Is Targeted by Kras Signalling to Regulate Cell Motility in the Colon and Pancreas. *PLoS ONE*, *6*(6), e20919. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020919

Alzoubi, F. Y., vd., (2022). *Citric Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles as Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging* [Preprint]. In Review. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1390032/v1

Bäumer, S., vd., (2015). Antibody-Mediated Delivery of Anti–KRAS-siRNA In Vivo Overcomes Therapy Resistance in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*, *21*(6), 1383-1394. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2017

Bobbin, M. L., ve Rossi, J. J. (2016). RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *56*(1), 103-122. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103633

Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F.-L. (2009). Viral vectors: From virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, *157*(2), 153-165. https://doi.org/10.1038/bjp.2008.349

Bulcha, J. T., vd., (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6

Bunaciu, A. A., vd., (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *45*(4), 289-299. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616

Buscail, L., vd., (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology ve Hepatology*, *17*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0245-4

Cai, Y., vd., (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics ve Bioinformatics*, *7*(4), 147-154. https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3

Cancer today. (t.y.). Geliş tarihi 21 Mayıs 2023, gönderen http://gco.iarc.fr/today/home

Cervantes, A., vd., (2023). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *34*(1), 10-32. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003

Cheraghipour, E., vd., (2012). *Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy*. *2012*. https://doi.org/10.4236/jbise.2012.512089

Choi, S.,vd., (2023). Precise control of liposome size using characteristic time depends on solvent type and membrane properties. *Scientific Reports*, *13*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-023-31895-z

Cox, A. D., vd., (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/nrd4389

Dessale, M., vd., (2022). Nanotechnology: A Promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis. *International Journal of Nanomedicine*, *17*, 3735-3749. https://doi.org/10.2147/IJN.S378074

Dheyab, M. A., vd., (2020). Simple rapid stabilization method through citric acid modification for magnetite nanoparticles. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67869-8

Fire, A., vd., (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, *391*(6669), 806-811. https://doi.org/10.1038/35888

Fleige, S., ve Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(2-3), 126-139. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003

Foner, S. (2004). Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, *30*(7), 548-557. https://doi.org/10.1063/1.1716679

Freeman, H. J. (2013). Early stage colon cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *19*(46), 8468-8473. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8468

Ganju, A., vd., (2017). MiRNA nanotherapeutics for cancer. *Drug Discovery Today*, *22*(2), 424-432. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.014

Garafutdinov, R. R., vd., (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides ve Nucleic Acids*, *39*(9), 1251-1269. https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354

Gavrilov, K., ve Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: Principles, Challenges, and Strategies. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *85*(2), 187-200.

Gurtan, A. M., ve Sharp, P. A. (2013). The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks. *Journal of Molecular Biology*, *425*(19), 3582-3600. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.007

Hajdu, S. I. (2006). Thoughts about the cause of cancer. *Cancer*, *106*(8), 1643-1649. https://doi.org/10.1002/cncr.21807

Hakim, A., vd.,(2023). Gene therapy strategies for glaucoma from IOP reduction to retinal neuroprotection: Progress towards non-viral systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *196*, 114781. https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114781

Halma, M. T. J., Rose, J., & Lawrie, T. (2023). The Novelty of mRNA Viral Vaccines and Potential Harms: A Scoping Review. *J*, *6*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/j6020017

Hendrikse, C. S. E., vd., (2023). The potential of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) signaling pathway inhibitors in ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, *171*, 83-94. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.01.038

Honary, S., ve Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems—A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19

Hossain, M. S., vd., (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, *14*(7), 1732. https://doi.org/10.3390/cancers14071732

Hu, B., vd., (2020). Therapeutic siRNA: State of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x

Hui, R. W.-H., vd., (2022). RNA interference as a novel treatment strategy for chronic hepatitis B infection. *Clinical and Molecular Hepatology*, *28*(3), 408-424. https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0012

Hunter, J. E., vd., (2017). Viral Vectors in the CNS☆. Içinde *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02446-9

Ikhmayies, S. J. (2014). Characterization of Nanomaterials. *JOM*, *66*(1), 28-29. https://doi.org/10.1007/s11837-013-0826-6

Jeevanandam, J., vd., (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*, 1050-1074. https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98

Jeong, W.-J., vd., (2018). Interaction between Wnt/β-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β-catenin and RAS by targeting the Wnt/β-catenin pathway. *NPJ Precision Oncology*, *2*(1), 5. https://doi.org/10.1038/s41698-018-0049-y

Jonkman, J. E. N., vd., (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion ve Migration*, *8*(5), 440-451. https://doi.org/10.4161/cam.36224

Jordán, D., vd., (2018). Detection of magnetic moment in thin films with a home-made vibrating sample magnetometer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *456*, 56-61. https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.01.088

Kami, D., vd., (2011). Application of Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(6), 3705-3722. https://doi.org/10.3390/ijms12063705

Kamran, S., vd., (2022). Combination Therapy with KRAS and P38α siRNA Suppresses Colorectal Cancer Growth and Development in SW480 Cell Line. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, *53*(3), 597-604. https://doi.org/10.1007/s12029-021-00667-1

Kansara, K., vd., (2018). Synthesis of biocompatible iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle. *International Journal of Nanomedicine*, *13*(T-NANO 2014 Abstracts), 79-82. https://doi.org/10.2147/IJN.S124708

Kauanova, S., vd., (2021). The Frequent Sampling of Wound Scratch Assay Reveals the "Opportunity" Window for Quantitative Evaluation of Cell Motility-Impeding Drugs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.640972

Khodapasand, E., vd., (2015). Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? *Iranian Biomedical Journal*, *19*(2), 69-75. https://doi.org/10.6091/ibj.1366.2015

Kılınç, E. (2016). Fullerene C60 functionalized γ-Fe2O3 magnetic nanoparticle: Synthesis, characterization, and biomedical applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *44*(1), 298-304. https://doi.org/10.3109/21691401.2014.948182

Knickelbein, K., ve Zhang, L. (2015). Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & Diseases*, *2*(1), 4-12. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.10.002

Korzeniecki, C., ve Priefer, R. (2021). Targeting KRAS mutant cancers by preventing signaling transduction in the MAPK pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *211*, 113006. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113006

Kumar, P., ve Agnihotri, S. (2016). Synthesis of Dox Drug Conjugation and Citric Acid Stabilized Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Drug Delivery. *Biochemistry ve Physiology: Open Access*, *01*(05). https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000194

Labianca, R., vd., (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *74*(2), 106-133. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010

Lam, K. K., vd., (2023). Targeting the 'Undruggable' Driver Protein, KRAS, in Epithelial Cancers: Current Perspective. *Cells*, *12*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/cells12040631

Lee, S. J., vd., (2016). Delivery Strategies and Potential Targets for siRNA in Major Cancer Types. *Advanced drug delivery reviews*, *104*, 2-15. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.010

Li, L., vd., (2013). Effect of synthesis conditions on the properties of citric-acid coated iron oxide nanoparticles. *Microelectronic Engineering*, *110*, 329-334. https://doi.org/10.1016/j.mee.2013.02.045

Lin, Y.-L., vd., (2012). KRAS Mutation Is a Predictor of Oxaliplatin Sensitivity in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, *7*(11), e50701. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050701

Lippman, S. M., ve Hawk, E. T. (2009). Cancer Prevention: From 1727 to Milestones of the Past 100 Years. *Cancer Research*, *69*(13), 5269-5284. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1750

Lito, P., vd., (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Medicine*, *19*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/nm.3392

Liu, J., ve Guo, B. (2020). RNA-based therapeutics for colorectal cancer: Updates and future directions. *Pharmacological Research*, *152*, 104550. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104550

Lundstrom, K. (2018). Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases*, *6*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/diseases6020042

Luo, D., vd., (2021). SiRNA-Loaded Hydroxyapatite Nanoparticles for KRAS Gene Silencing in Anti-Pancreatic Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, *13*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091428

M. El-Khawaga, A., vd., (2020). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citric Acid Functionalized Magnetite Nanoparticles. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, *EJMM29*(4), 143-149. https://doi.org/10.51429/EJMM29418

Mahmood-ur-Rahman, Ali, I., vd., (2008). RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnology Advances*, *26*(3), 202-209. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.002

Malatesta, M. (2021). Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12789. https://doi.org/10.3390/ijms222312789

Mastutik, G., vd., (2018). THE MUTATION STATUS OF KRAS GENE CODON 12 AND 13 IN COLORECTAL ADENOCARCINOMA (Status Mutasi Gen Kras Kodon 12 dan 13 di Adenocarcinoma Kolorektal). *Indonesian Journal Of*

Clinical Pathology And Medical Laboratory, *23*(1), 12-17. https://doi.org/10.24293/ijcpml.v23i1.1177

McBain, S., vd., (2008). Magnetic Nanoparticles for Gen and Drug Delivery. *International journal of nanomedicine, 3*, 169-180.

Mehta, A., vd., (2019). Targeting KRAS Mutant Lung Cancer Cells with siRNA-Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles. *Pharmaceutical Research, 36*(9), 133. https://doi.org/10.1007/s11095-019-2665-9

Merz, V., vd., (2021). Targeting KRAS: The Elephant in the Room of Epithelial Cancers. *Frontiers in Oncology*, *11*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.638360

Mikelashvili, V., vd., (2023). Synthesis and Characterization of Citric Acid-Modified Iron Oxide Nanoparticles Prepared with Electrohydraulic Discharge Treatment. *Materials*, *16*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/ma16020746

Mohamed, M. A., vd., (2017). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Içinde *Membrane Characterization* (ss. 3-29). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2

Morgan, M. A., vd., (2021). Retroviral gene therapy in Germany with a view on previous experience and future perspectives. *Gene Therapy*, *28*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/s41434-021-00237-x

Nandety, R. S., vd., (2015). Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, *6*(1), 8-19. https://doi.org/10.4161/21655979.2014.979701

Nsairat, H., vd., (2022). Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, *8*(5), e09394. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394

Omelyanchik, A.,vd., . (2021). Effect of citric acid on the morpho-structural and magnetic properties of ultrasmall iron oxide nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, *883*, 160779. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.160779

Patel, S. G., vd., (2018). Chapter 8—Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery. Içinde P. Kesharwani ve U. Gupta (Ed.), *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors* (ss. 191-244). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812218-1.00008-7

Petrichenko, O., vd., (2015). Formation of magnetoliposomes using self-assembling 1,4-dihydropyridine derivative and maghemite γ-Fe2O3 nanoparticles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds, 51*. https://doi.org/10.1007/s10593-015-1755-9

Plummer, M., vd., (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, *4*(9), e609-e616. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7

Pollock, C. B., vd., (2005). Oncogenic K-RAS Is Required to Maintain Changes in Cytoskeletal Organization, Adhesion, and Motility in Colon Cancer Cells. *Cancer Research*, *65*(4), 1244-1250. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1911

Prada-Arismendy, J., ve Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Medica*, 243-258. https://doi.org/10.25100/cm.v42i2.778

Prenen, H., vd., (2010). New Strategies for Treatment of KRAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, *16*(11), 2921-2926. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2029

Raeymaekers, L. (1993). Quantitative PCR: Theoretical Considerations with Practical Implications. *Analytical Biochemistry*, *214*(2), 582-585. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1542

Rao, D. D., vd., (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(9), 746-759. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.004

Rathod, L. S., vd., (2023). Recent progress in targeting KRAS mutant cancers with covalent G12C-specific inhibitors. *Drug Discovery Today*, *28*(5), 103557. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103557

Roy, P. S., ve Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, *53*(3), 441. https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658

Ryan, M. B., ve Corcoran, R. B. (2018). Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *15*(11), 709-720. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0105-0

Salopek, B., vd., (t.y.). *Measurement And Application Of Zeta-Potential*.

Saraiva, M. R., vd., (2023). Early-onset colorectal cancer: A review of current knowledge. *World Journal of Gastroenterology*, *29*(8), 1289-1303. https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i8.1289

Sattler, M., vd., (2023). Precision oncology provides opportunities for targeting KRAS-inhibitor resistance. *Trends in Cancer*, *9*(1), 42-54. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.10.001

Sawicki, T., vd., (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, *13*(9), 2025. https://doi.org/10.3390/cancers13092025

Serebriiskii, I. G., vd., (2019). Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11530-0

Sharma, J., ve Paschalis, E. I. (2022). The future of non-viral gene delivery for the treatment of inherited retinal diseases. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *30*, 354. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.10.011

Skrypina, N. A., vd., (2003). Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of Biotechnology*, *105*(1), 1-9. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00140-8

Smith, D. (2015). CHAPTER 1: Characterization of nanomaterials using transmission electron microscopy. İçinde A. I. Kirkland ve S. J. Haigh (Ed.), *Hierarchical Nanostructures for Energy Devices* (ss. 1-29). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781782621867-00001

Smith, M. C., vd., (2017). Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(24), 5779-5787. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z

Sophian, A., ve Nasir, L. O. (2023). Analysis of Purity and Concentration of DNA Isolated in Dragonfly (Onychogomphus forcipatus). *Wahana-Bio: Jurnal Biologi Dan Pembelajarannya*, *14*(2), Article 2.

Sran, S., ve Bedrosian, T. A. (2023). RAS pathway: The new frontier of brain mosaicism in epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *180*, 106074. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106074

Strand, M. S., vd., (2019). Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*, *10*(46), 4761-4775. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27109

Sung, H., vd., (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Talukdar, A., vd., (2022). Cancer: Infection and Vaccines. İçinde A. C. Kataki ve D. Barmon (Ed.), *Fundamentals in Gynaecologic Malignancy* (ss. 37-46). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5860-1_4

Tang, D., vd., (2021). Oncogenic KRAS blockade therapy: Renewed enthusiasm and persistent challenges. *Molecular Cancer*, *20*(1), 128. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01422-7

Thomas, F. (2023). Optimizing the Manufacture of Emerging Therapies. *BioPharm International*, *18*(10), 24-27.

Thomson, T. (2014). 10—Magnetic properties of metallic thin films. İçinde K. Barmak ve K. Coffey (Ed.), *Metallic Films for Electronic, Optical and Magnetic Applications* (ss. 454-546). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857096296.2.454

Tirella, A., vd., (2019). CD44 targeted delivery of siRNA by using HA-decorated nanotechnologies for KRAS silencing in cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, *561*, 114-123. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.032

Tong, L., vd., (2023). Research Status and Prospect of Non-Viral Vectors Based on siRNA: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/ijms24043375

Tria, S. M., vd., (2023). The Therapeutic Landscape for KRAS-Mutated Colorectal Cancers. *Cancers*, *15*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/cancers15082375

van Krieken, J. H. J. M.,vd., (2008). KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: Proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv*, *453*(5), 417-431. https://doi.org/10.1007/s00428-008-0665-y

Vargas, J. E., vd., (2016). Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: Advances, current challenges and perspectives. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 288. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1047-x

Vlasova, K. Yu., vd., (2019). Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF). *Journal of Colloid and Interface Science*, *552*, 689-700. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.05.071

Wang, C., Lei, C., & Hu, S. (2023). Chapter 18—Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA overcomes therapy resistance in colon cancer. Içinde S. Hu (Ed.), *Novel Sensitizing Agents for Therapeutic Anti-EGFR Antibodies* (ss. 131-135). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821584-5.00003-1

Wang, H., vd., (2023). Annual review of KRAS inhibitors in 2022. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *249*, 115124. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115124

Wang, Y., vd., (t.y.). Assembling Mn:ZnSe Quantum Dots-siRNA Nanoplex for Gene Silencing in Tumor Cells. *Biomaterials Science*.

Wen, Z.-M., vd., (2017). A self-assembled polyjuglanin nanoparticle loaded with doxorubicin and anti-Kras siRNA for attenuating multidrug resistance in human lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(4), 1430-1437. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.132

White, S. M.,vd., . (1999). Lentivirus Vectors Using Human and Simian Immunodeficiency Virus Elements. *Journal of Virology*, *73*(4), 2832. https://doi.org/10.1128/jvi.73.4.2832-2840.1999

Whittig, L. D., ve Allardice, W. R. (2018). X-Ray Diffraction Techniques. İçinde A. Klute (Ed.), *SSSA Book Series* (ss. 331-362). Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c12

Xing, R., vd., (2014). Functional Magnetic Nanoparticles for Non-Viral Gene Delivery and MR Imaging. *Pharmaceutical Research*, *31*(6), 1377-1389. https://doi.org/10.1007/s11095-013-1205-2

Xi, Y., ve Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, *14*(10), 101174. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174

Xie, J., ve Wang, S. (2022). Small Interfering RNA in Colorectal Cancer Liver Metastasis Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *21*, 15330338221103318. https://doi.org/10.1177/15330338221103318

Yadav, P., vd., (2022). Emerging nanotechnology-based therapeutics to combat multidrug-resistant cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 423. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01626-z

Yang, C., vd., (2015). Biodegradable nanoparticle-mediated K-ras down regulation for pancreatic cancer gene therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(10), 2163-2172. https://doi.org/10.1039/C4TB01623H

Yin, F., vd., (2018). Functionalized MoS2 Nanosheets as Multi-Gene Delivery Vehicles for In Vivo Pancreatic Cancer Therapy. *Nanotheranostics*, *2*(4), 371-386. https://doi.org/10.7150/ntno.27308

Yin, H.,vd., (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, *15*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/nrg3763

Yip, K. W., ve Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, *27*(50), 6398-6406. https://doi.org/10.1038/onc.2008.307

Zarredar, H., vd., (2019). Combination therapy with KRAS siRNA and EGFR inhibitor AZD8931 suppresses lung cancer cell growth in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(2), 1560-1566. https://doi.org/10.1002/jcp.27021

Zeng, L., vd., (2014). Combination of siRNA-directed Kras oncogene silencing and arsenic-induced apoptosis using a nanomedicine strategy for the effective treatment of pancreatic cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *10*(2), 463-472. https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.08.007

Zenonos, K., ve Kyprianou, K. (2013). RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *5*(5), 97-101. https://doi.org/10.4251/wjgo.v5.i5.97

Zhang, X., vd., (2021). Carbon Dioxide-Derived Biodegradable and Cationic Polycarbonates as a New siRNA Carrier for Gene Therapy in Pancreatic Cancer. *Nanomaterials*, *11*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/nano11092312

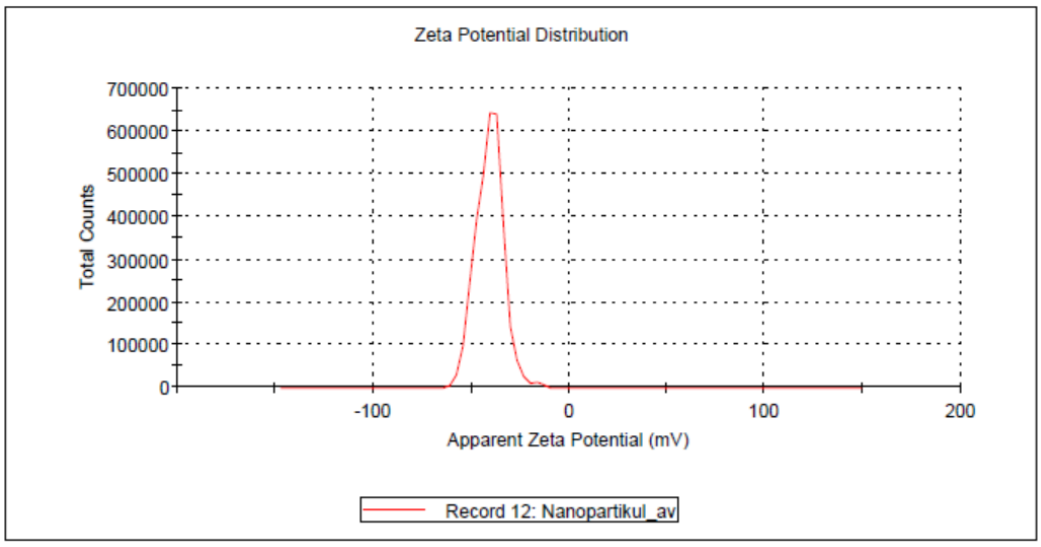
Zhu, C., vd., (2022). Targeting KRAS mutant cancers: From druggable therapy to drug resistance. *Molecular Cancer*, *21*(1), 159. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01629-2

Zorde Khvalevsky, E., vd., (2013). Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), 20723-20728. https://doi.org/10.1073/pnas.1314307110

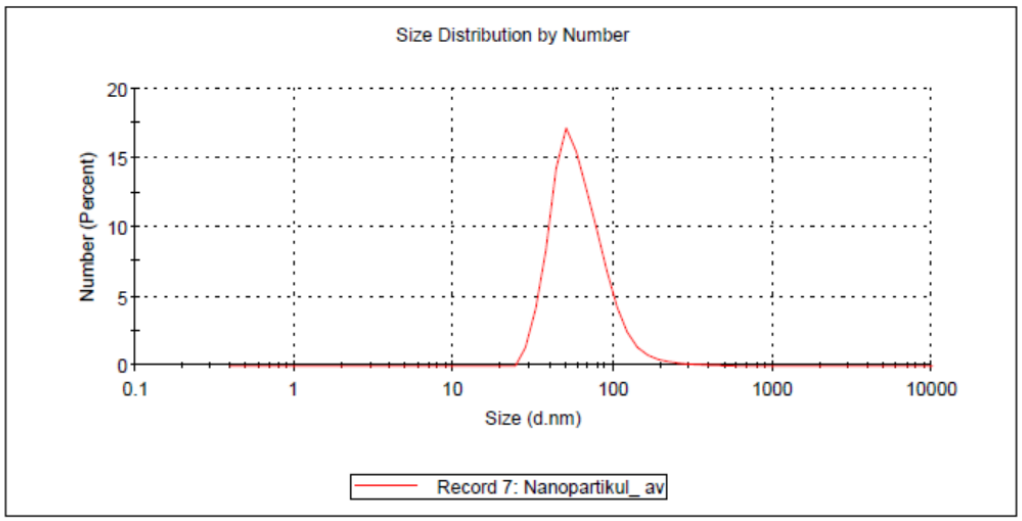
Whittig, L. D., ve Allardice, W. R. (2018). X-Ray Diffraction Techniques. İçinde A. Klute (Ed.), *SSSA Book Series* (ss. 331-362). Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c12

EKLER

		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -40,3	Peak 1:	-40,5	99,0	6,78
Zeta Deviation (mV): 7,08	Peak 2:	-16,4	1,0	2,58
Conductivity (mS/cm): 0,0569	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality Good				

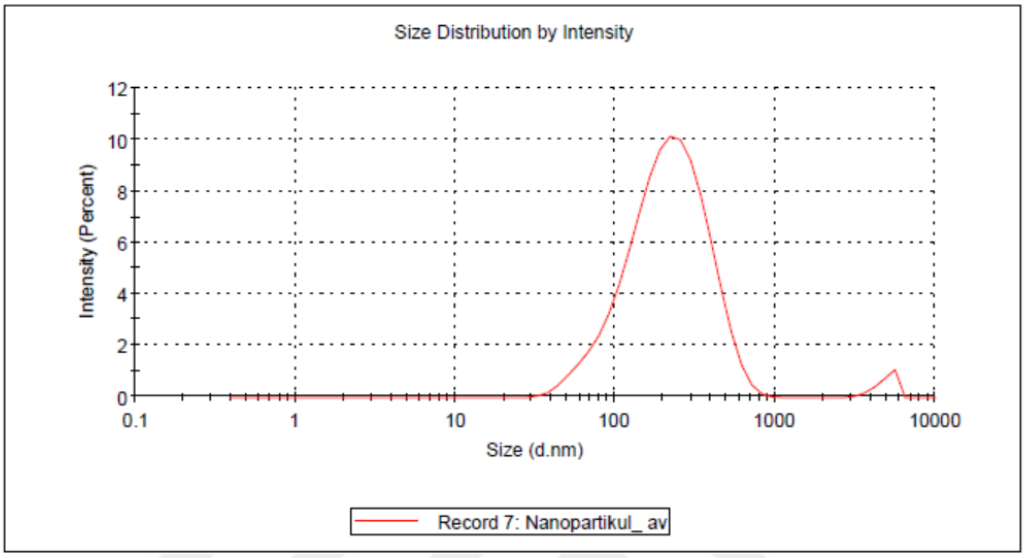


		Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 190,7	Peak 1:	65,55	100,0	34,19
PdI: 0,310	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,930	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality Good				

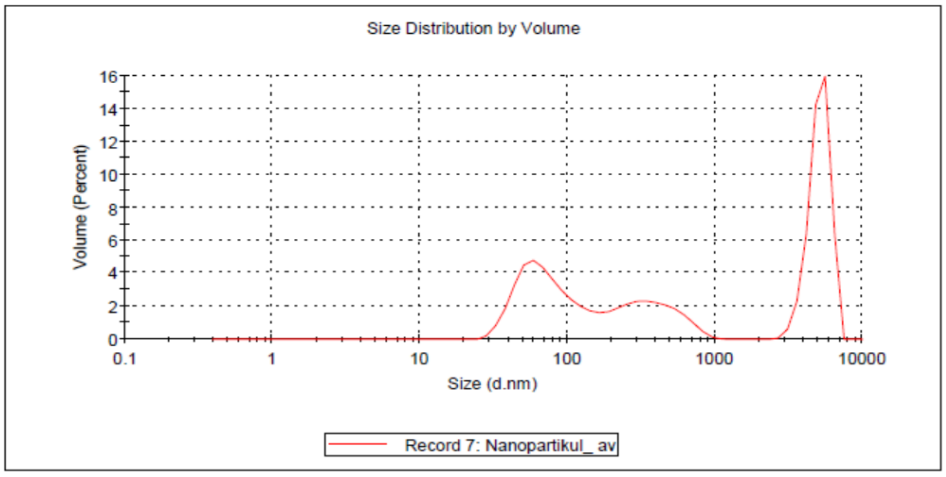


Ek 4.1: Sentezlenen nanopartikül zeta potansiyeli ve boyutun sayıya göre dağılım grafiği

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 190,7	Peak 1:	238,6	97,6	128,8
PdI: 0,310	Peak 2:	4907	2,4	689,9
Intercept: 0,930	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality Good				



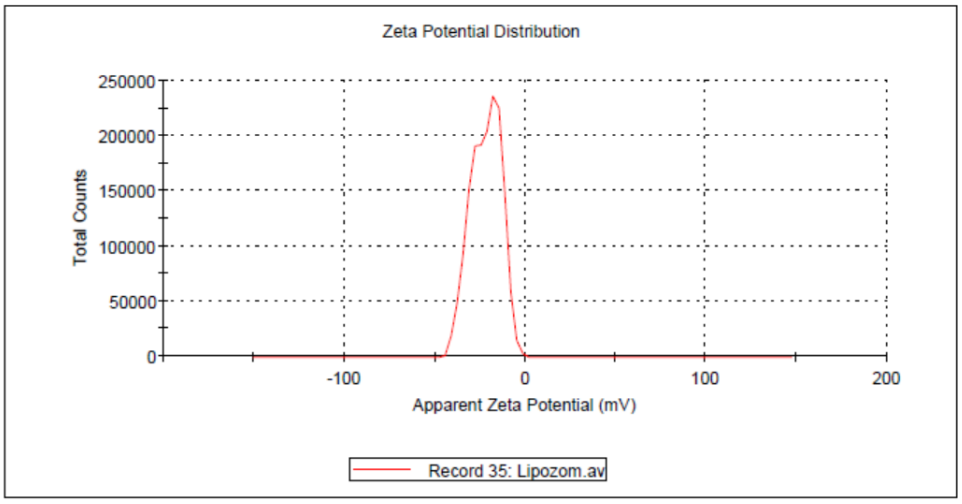
		Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 190,7	Peak 1:	76,70	33,8	34,17
PdI: 0,310	Peak 2:	377,9	21,0	173,8
Intercept: 0,930	Peak 3:	5110	45,2	811,5
Result quality Good				



Ek 4.2: Sentezlenen nanopartikül boyutunun yoğunluk ve hacim göre dağılım grafiği

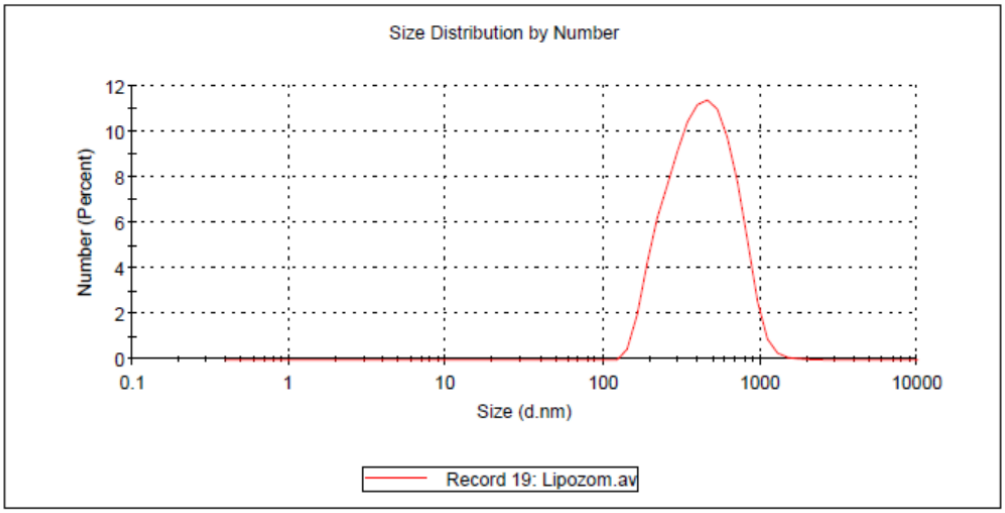
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -21,6	Peak 1:	-21,6	100,0	8,14
Zeta Deviation (mV): 8,14	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 3,00	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality Good



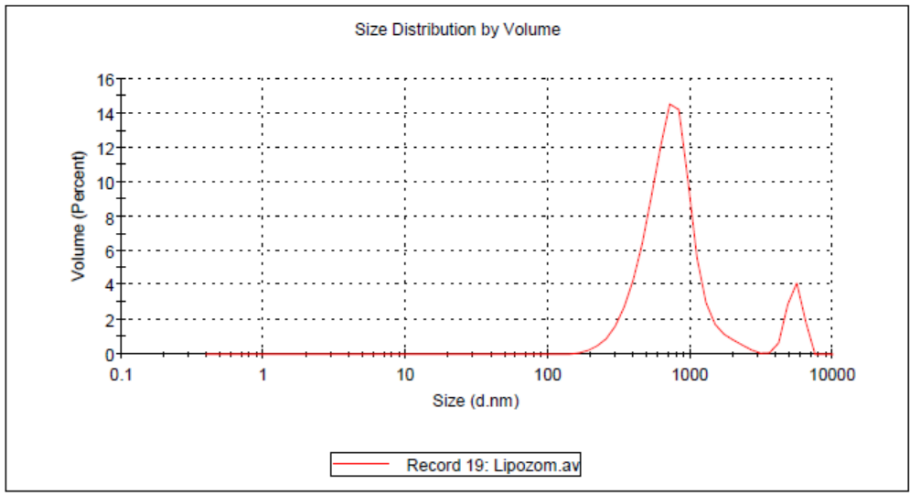
		Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 767,4	Peak 1:	461,0	100,0	214,8
PdI: 0,449	Peak 2:	5262	0,0	726,9
Intercept: 0,938	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality Good

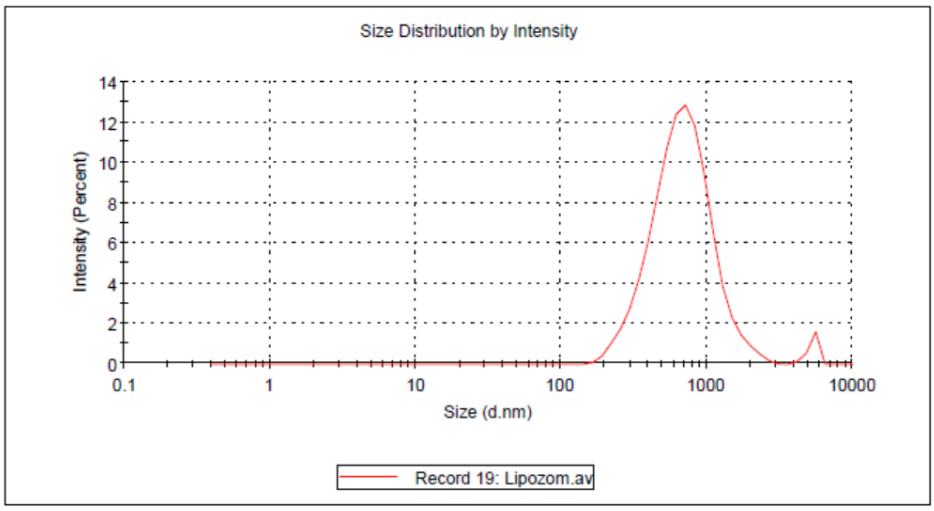


Ek 4.3: Sentezlenen lipozomun zeta potansiyeli ve boyutun sayıya göre dağılım grafiği

		Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 767,4	Peak 1:	764,8	90,3	350,4
PdI: 0,449	Peak 2:	5361	9,7	709,8
Intercept: 0,938	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality Good				



		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 767,4	Peak 1:	737,6	97,7	359,9
PdI: 0,449	Peak 2:	5287	2,3	436,2
Intercept: 0,938	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality Good				



Ek 4.4: Sentezlenen lipozom boyutunun yoğunluk ve hacime göre dağılım grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad	Çakmak, Feysel
Web sayfası (Research Gate, Academia, etc.)	

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle üniversitesi	2013
Lisans	Inönü üniversitesi	2010
Lise	Ziya Gökalp Lisesi	2003

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1.

2.

3.

4.

Özel İlgiler

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Feysel Çakmak		
Öğrenci No	13801511		
Ana Bilim Dalı	Biyoloji		
Program Türü	Proje ☐	Yüksek Lisans ☐	Doktora ☒
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Veysel Tolan		
Tez Başlığı	Kolon Kanserinde K-Ras Sirna Yüklü Manyetik Nanopartiküllerin Teranostik Kullanimi		

RAPOR BİLGİLERİ	
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası
Sayfa Sayısı	110
Raporlama Tarihi	16/05/2023
Benzerlik Oranı (%)	6

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 110 sayfalık kısmına ilişkin, 16/05/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *TURNİTİN* isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç
☒Kaynaklar hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Benzerlik oranım üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir,
gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Feysel Çakmak
Tarih: 16.05.2023
İmza:

Danışman Adı, Soyadı: Prof. Dr. Veysel Tolan Tarih: 17.05.2023	İmza:
Ana Bilim Dalı Başkanı Adı, Soyadı: Prof. Dr. Ahmet Kılıç Tarih: 17.05.2023	İmza: