

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANSER HÜCRE HATTINDA ALTINNANOPARTİKÜLLER İLE siRNA TAŞINIMI

Melis ÇOLAK

KASIM 2017

Biyomühendislik Anabilim Dalında Melis ÇOLAK tarafından hazırlanan KANSER HÜCRE HATTINDA ALTIN NANOPARTİKÜLLERİ İLE siRNA TAŞINIMI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr.Mustafa YİĞİTOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr.Mustafa TÜRK
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan (Danışman)	: Prof.Dr.Mustafa TÜRK	_____
Üye	: Prof.Dr.Siyami KARAHAN	_____
Üye	: Prof.Dr. Necdet SAĞLAM	_____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

CANIM AİLEME

ÖZET

Kanser Hücre Hattında Altın Nanopartikülleri İle siRNA Taşınımı

ÇOLAK, Melis

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KASIM 2017, sayfa 106

Kolon kanseri kadın ve erkekler bireyler arasında görülme sıklığı pek bir farklılık göstermemekte ve kanserlerin görülme sıklığında üçüncü sırada bulunmakta olup Bcl2 gen ifadesinin kolon kanserinde normal dokulara göre aktivasyonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. RNA interferans gen ifadesini düzenleyen bir mekanizma olup siRNA'lar aracılığıyla mRNA'nın yıkımının uyarılmasını sağlamaktadır. Kanser tedavisinde son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki biyouyumlu taşıyıcı altın nanopartiküller ile siRNA'yı taşıyarak kanser tedavisi için umut vadeden gelişmeler gerçekleştirilmiştir. Sunulan bu tez kapsamında farklı dozlardaki siRNA + altın nanopartikül komplekslerinin DLD kolon kanseri hücrelerine uygulanarak Bcl-2 gen ifadesinin baskılanması hedeflenmiş. Bunun için pH ve sıcaklığa duyarlı altın nanopartikülleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. siRNA'nın altın nanopartikül ile etkileşimleri hem karakterize edilmiş hem de agaroz jel elektroforezinde incelenmiş ve bir kompleks oluşturdıkları saptanmıştır. Hücre poliferasyon testi xCELLigence RTCA analiz yöntemiyle yapılmış ve apoptoz/nekroz etkisi ikili boyama ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DLD, Bcl-2, Altın Nanopartikül, siRNA uygulama

ABSTRACT

SI-RNA DELIVERY WITH GOLD NANOPARTICLES IN A CANCER CELL LINE

ÇOLAK, Melis

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KASIM 2017, sayfa 106

The incidence of colon cancer is not significantly different between women and men, and it is found that Bcl2 gene expression is increased in colon cancer compared to normal tissues. RNA interference is a mechanism for regulating gene expression, which stimulates the degradation of mRNA through siRNAs. Recent studies in cancer treatment have shown that biosynthetic carrier nanoparticles and siRNA have been carried forward to improve cancer care. In this thesis, it was aimed to suppress the expression of Bcl-2 gene by applying siRNA + nanoparticle complexes of different doses to DLD colon cancer cells. For this, pH and temperature sensitive gold nanoparticles were synthesized and characterized. The interaction of siRNA with nanoparticle was characterized both by characterization and by agarose gel electrophoresis and found to form a complex. Cellular proliferation assay was performed by xCELLIGENCE RTCA analysis method and apoptosis / necrosis effect was determined by double staining.

Keywords: DLD, Bcl-2, Gold Nanoparticle, siRNA application

TEŞEKKÜRLER

Biyomühendislik Anabilim Dalı ile tanışmamı sağlayan tez çalışmalarım için her türlü desteği sağlayan, tecrübesiyle bana yol gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e

Altın nanopartikül sentez aşamasında bana bilgi deneyimlerini açıp sentezlememe yardımcı olan Hakan ÇİFTÇİ hocama,

Tez çalışmam için her türlü desteği ve olanağı saylayan KÜBTUAM Müdürümüz Prof. Dr. Siyami KARAHAN hocamıza,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana her şekilde yardımcı olan arkadaşlarım Özlem ÖZDEMİR, Gizem İMRAK , Aytuna ÇERÇİ, Aslı AGAR, Damla OKATAN, Murat PARLAK, Canan ÇAKIR, Rümeysa AKÇAPINAR, Sema TUNCER'e; KÜBTUAM AİLESİ olarak benden desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve Azize BUDAK, Selda ÖZ, Gökben BAŞARAN hocalarıma,

Anlamadığım, çıkar yol bulamadığım ve her aradığımda uzaktan da olsa yardımcı olmak için uğraşan Seval BİRDANE ve Atakan TEVLEK arkadaşşıma,

Özellikle bize bir baba gibi yakınlık gösteren, her zaman motive eden, desteğini üzerimizden hiç eksik etmeyen ve bütün bilgi deneyimini bizimle paylaşan PROF. DR. Oğuz KUL hocama,

Her şekilde yanımda olan Tuğba GAYAKER ve Ailesine,

En çokta beni bu yaşa getiren, her ümitsizliğe kapıldığımda bana güç vererek tekrar kendimi iyi hissetmemi sağlayan, her şekilde ve koşulda yanımda olan hakkını ne yaparsam yapayım ödeyemeyeceğim CANIM AİLEM kahramanlarım,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum .

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

SAYFA

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KANSER BİLGİSİ.....	3
2.1.1.Kanser ve Oluşum Mekanizması.....	3
2.2.KOLON BİYOLOJİSİ.....	5
2.2.1.Kolon Kanseri Nedir? Sebepleri Nelerdir?	6
2.2.2.Kolon Kanseri Çeşitleri.....	7
2.2.3.Kolon Kanseri Semptomları.....	9
2.2.4.Koloraktal Kanser Tanı, Muayene ve Laboratuvar Testleri.....	10
2.2.5.Kolorektal Kanser Evreleri.....	12
2.2.6.Kolorektal Kanser Tedavi Yöntemleri Ve Yan Etkileri.....	13
2.3 RNA Mekanizması.....	17

2.3.1.RNA İnterferans (RNAi)	17
2.3.1.1.-mikroRNA(miRNA)	18
2.3.1.2.Small İnterfering RNA (siRNA)	19
2.4.Nanopartiküller.....	21
2.4.1.Altın -Nanopartikülleri.....	21
2.4.1.1.AuNP İle İşaretleme Yöntemi.....	22
2.4.1.2.AuNP Işığ Absorbans Özelliği.....	23
2.4.1.3.AuNP İle Kontrollü İlaç Salınım.....	23
2.4.1.4.AuNP'nin Kanser Tedavisinde Uygulanma Şekilleri ve Biyosensör Yapımında Kullanımı.....	24
2.5.Teronastik Yöntem.....	25
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	27
3.1.Kimyasallar Ve Cihazlar.....	27
3.2.AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu.....	28
3.2.1.AuNP Sentezi.....	28
3.2.2.Karakterizasyon.....	29
3.2.2.1.Zeta Potansiyel Analizi.....	29
3.2.3.siRNA'nın AuNP İle Etkileşimi.....	29
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle AuNP ve siRNA Örneklerinin Etkileşimlerinin Belirlenmesi.....	29
3.4. İn Vitro Nanopartiküllerin Hazırlanışı ve siRNA'nın Hücre İle Etkileşimi.....	30
3.4.1. Hücrelerin Hazırlanışı.....	30

3.4.2. Hücre Hattının Pasajlanması.....	31
3.4.3. siRNA/Nanopartiküllerin Hücre Proliferasyonlarına Antiproliferatif etkilerinin xCELLigence RTCA İle Belirlenmesi.....	31
3.4.4. İkili Boyama Methodu İle Apoptoz-Nekrozun Belirlenmesi.....	33
3.4.5. İkili Boyama Metodu.....	35
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	37
4.1.1. Zeta (ζ) potansiyel Analiz Yöntemi.....	37
4.2. siRNA İle Nanopartiküllerin Etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemiyle Belirlenmesi.....	41
4.3. Hücre poliferasyonunun xCELLigence RTCA İle Belirlenmesi.....	43
4.3.1. Nanopartiküllerin Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	43
4.3.2. Nanopartikül + siRNA kompleksinin Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	44
4.3.3. Nanopartikül + siRNA kompleksi, Serbest Haldeki AuNP ve siRNAların Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	49
4.4. İkili Boyama İle Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi.....	55
5.SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	74
KAYNAKLAR.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

SAYFA

3.1.	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (xCELLigence)	33
3.2.	İkili boyama ile hücrelerin canlılık oranlarının saptanması (Sarı renklerdeki değişim hücrelerdeki canlılık oranlarına göre azalmakta. Koyu sarı olarak görünenler canlılıkları yüksek olan kolon kanseri hücreleri iken beyaza yakın görünenler ise canlılıkları daha düşük olanlar da kolon kanseri hücreleri.)	35
4.1.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 1µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği	37
4.2.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 2µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği	38
4.3.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 4µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği	38
4.4.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 8µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği	39
4.5.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 16µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği.....	39
4.6.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 32µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği	40
4.7.	Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği.....	41

4.8. Agaroz jel elektorforezinde yürütülen yalnızca AuNP, yalnızca siRNA ve AuNP+siRNA kompleksinin görüntüsü (A=1µL siRNA +1µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, B=1µL siRNA +2µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, C=1µL siRNA +4µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, D=1µL siRNA +8µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, E= 1µL siRNA +16µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, F=1µL siRNA +32µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, G= Yalnızca 1µL AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, H= Yalnızca 1µL siRNA konulan kuyucuktaki ilerme gözlemlenmiştir.)	42
4.9. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak 1µL AuNP'e karşı DLD ve L929 hücrelerindeki proliferasyon değişiminin gösterilmesi	43
4.10. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD hücrelerine uygulanan farklı derişimlerdeki AuNP'lerin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	44
4.11. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 1µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	45
4.12. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 2µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	45
4.13. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 4µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	46
4.14. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 8µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	47

4.15. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 μ L + AuNP 16 μ L kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	47
4.16. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi	48
4.17. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 μ L hücre proliferatif etkisinin gösterilmesi	49
4.18. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1 μ L, sadece AuNP 1 μ L ve siRNA 1 μ L + AuNP 1 μ L kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	50
4.19. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1 μ L, sadece AuNP 2 μ L ve siRNA 1 μ L + AuNP 2 μ L kompleksi uygulandığındaki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	51
4.20. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1 μ L, sadece AuNP 4 μ L ve siRNA 1 μ L + AuNP 4 μ L kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	52
4.21. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1 μ L, sadece AuNP 8 μ L ve siRNA 1 μ L + AuNP 8 μ L kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	53
4.22. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1 μ L,sadece AuNP 16 μ L ve siRNA 1 μ L + AuNP 16 μ L kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	54

4.23. Gerçek zamanlı xCELLigence’de DLD Hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP 32µL ve siRNA 1µL + AuNP 32µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi	54
4.24. siRNA 1µL + AuNP 1µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide); BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	58
4.25. siRNA 1µL + AuNP 2µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	58
4.26. siRNA 1µL + AuNP 4µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	59
4.27. siRNA 1µL + AuNP 8µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	59
4.28. siRNA 1µL + AuNP 16µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	60

4.29. siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.60

4.30 DLD hücrelerinde hiçbir uygulama yapılmadan 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.61

4.31. AuNP 1 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.61

4.32. AuNP 2 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.62

4.33. AuNP 4 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.62

4.34. AuNP 8µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	63
4.35. AuNP 16µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	63
4.36. AuNP 32µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	64
4.37. siRNA 1µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	64
4.38. siRNA 1µL + AuNP 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	66

4.39. siRNA 1µL + AuNP 2µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	66
4.40. siRNA 4µL + AuNP 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	67
4.41. siRNA 1µL + AuNP 8µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	67
4.42. siRNA 1µL + AuNP 16µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	68
4.43. siRNA 1µL + AuNP 32µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	68
4.44. L929 hücrelerinde hiçbir uygulama yapılmadan 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.	69

- 4.45. AuNP 1 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.69
- 4.46. AuNP 2 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.70
- 4.47. AuNP 4 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.70
- 4.48. AuNP 8 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.71
- 4.49. AuNP 16 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.71

4.50. AuNP 32µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.72

4.51. siRNA 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.72

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

SAYFA

3.1. 96 Well-Plate Ekilen Hücelere Ait Deney Grupları.....	32
4.2. DLD hücrelerindeki apoptotik hücre yüzde oranları.....	57
4.3. DLD hücrelerindeki nekrotik hücre yüzde oranları.....	65

KISALTMALAR

PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
FBS	Fetal Bovine Serum
HAuCl ₄	Hydrogen tetrachloroaurate(III)
DMSO	Dimetilsülfoksit
DLD	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
L929	Fibroblast Hücre Hattı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
siRNA	Small İnterfering RNA
EDTA	Etiendiamin Tetraasetik Asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
miRNA	mikro RNA
TEM	Geçişli Elektron Mikroskobu
CD52	Cluster of Differentiation 52
CD20	Cluster of Differentiation Antigen20
UV	Ultraviyole ışını
VEGF	Endotelyal büyüme faktörü
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
mRNA	Mitokondrial ribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü

RNA	Ribonükleik asit
SPECT- PET	Nükleer Tıp yöntemleri ile görüntüleme
MIT	Alnylam Inc. ve Massachusetts Teknoloji Enstitüsü
AuNP	Altınnanopartik�l
HGC	Human gonadropic hormone
DYE	Bromfenol mavisi
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
RISC	RNA indüklenmiş susturma kompleksi
dsRNA	çift sarmal RNA
Dicer-RDE-1	RNAi deficient-1
US	Ultrasonografi
FIT	Dışkı Numunesinin İmmünokimyasal Testi
BT	Bilgisayarlı tomografi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NIR	Optik tomografi
6�Loading DYE	Bromfenol mavisi
FOBT	Dışkıda Gizli Kan Testi
CO ₂	Karbondioksit
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
PI	Propidium Iodide

1.GİRİŞ

Dünyada ölüm nedenleri arasında en sık rastlanan rahatsızlık olarak kanser gelmektedir. Kanser insan hücrelerinin fizyolojik işlevlerini bozan ve hastalıklara bağlı ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer alan çözümlenememiş bir sağlık problemidir.[1] Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer almakta olan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından hemen sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Sebebi bilinen hastalıklarda ikinci sırada olmasına rağmen görülme sıklığı konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Modern çağın en büyük sorunlarından biri olan kanser, son yüzyılda çevre şartlarının değişmesi, yaşam temposunun değişmesi ve paralelinde gelen yeme-içme alışkanlıklarının değişmesi kanseri insan hayatının en büyük problemlerinden biri haline getirmiştir.[1-3] Günümüzde bir çok tedavi yönteminin uygulandığı bu rahatsızlıkta genellikle tercih edilen cerrahi yöntemler ile tümörlü olan doku veya organın vücuttan uzaklaştırılması yöntemi olsa da ne yazık ki kemoterapi ve radyoterapi gibi bir çok vücut direncini düşürecek uygulamaya da hastalar maruz kalmaktadır.[1-3] Kanser hücreleri çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı direnç kazanabilmekte ve kemoterapi 'Çoklu İlaç Dirençliliği' mekanizması sebebi ile başarısız olabilmektedir. Tedavi sırasında ilaca dirençli hücre popülasyonunun fazlalığı tedavideki başarının önündeki en büyük engellerden birini oluşturmaktadır. Bu direnç; tümörlü hücrelere gönderilen ilacın etkisinin kaybolmasına, çoğu anti kanser ilaçlarının aktivasyonunu sağladığı apoptozun, DNA tamirinin, hücre döngüsündeki değişikliklerin oluşmasının engelleyerek ilacın etkisini azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki kanser direncini oluşturan bu durumun apoptoz önleyici faktörlerden dolayı ortaya çıktığı ve apoptoz önleyici faktörlerin ortadan kaldırılması ile kanser tedavisinin daha kolay ve rahat bir şekilde yapılabilecek oluşu büyük umutlar vadetmektedir. [54]

Kolon kanseri kadın ve erkekler arasında görülme sıklığında pek bir farklılık göstermemekle birlikte kanserlerin görülme sıklığında üçüncü sırada bulunmakta olup Bcl2 geninin kolon kanserinde normal dokulara göre aktivasyonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. RNA interferaz (RNAi) genin ifadesini düzenlemektedir.Bu düzenleme, siRNA'lar aracılığı ile mRNA'nın

yıkımının uyarılması ile gerçekleşir. Tümör biyolojisinde son yıllarda yapılan araştırmalar nanopartiküllerin biyoyumluluğu ve biyoyumlu olan taşıyıcı sistemlerin siRNA'yı taşıyarak kanser tedavisi için büyük umut vadettiğini göstermektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada siRNA+ altınnanopartikül kombinasyonlarının DLD kolon kanseri ve L929 fibroblast hücreleri üzerine uygulanarak bu kombinasyonun kanser üzerinde olan etkisi ve Bcl-2 gen ifadesinin baskılanması ile antikanser tedavisinde kullanmayı hedeflemekteyiz. Bunun için siRNA'nın pH ve sıcaklığa duyarlı altınnanopartiküller sentezlendi ve karakterize edildi. siRNA'nın altınnanopartikül ile olan etkileşimini gözlemleyebilmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Hücre proliferasyonları xCELLingence RTCA ile bakılırken apoptotik ve nekrotik etkiler de ikili boyama tekniği ile bakıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER BİYOLOJİSİ

2.1.1. Kanser ve Oluşum Mekanizması

Kanser Yunanca yengeç anlamına gelen “karkinos” veya “karkinoma” sözcüklerinden türemiştir. Yengecin avını kısırdıktan sonra uzun ve dişli kollarıyla tutup yavaş yavaş kemirerek yemesi kanserli hücrelerin tedavisinin yapılmadığı takdirde insanın vücut direncini düşürerek zayıflaması, halsiz düşmesi ve en sonunda da öldürerek canlının yaşamını yitirmesiyle sonuçlandığı için bu isim verilmiştir. Kanser, hücrelerde DNA’nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyüme ve çoğalması olarak tanımlanmaktadır ve bu durum belli bir hücre DNA’sını mutasyona uğratacak bir sinyal almasıyla ortaya çıkar. Normal vücut hücreleri bir hata algıladığında hücreyi savunma mekanizması yardımıyla veya hücre kendisini imha ederek ortadan kaldırırken bazı durumlarda bu durum tespit edilemez (mutasyon gibi). Ortadan kaldırılamayan hücre sürekli çoğalmaya gider ve tümör oluşumuna sebep olur. Kişiden kişiye değişkenlik gösteren karmaşık bir hastalık olarak bilinen tümörün 200’den fazla türe sahip olduğu bilinmektedir. [1,4–52]

Kanser hücreleri, normal vücut hücrelerinden farklılık göstermektedir ve kanser hücrelerinin metabolizması normal hücre metabolizmasından 8 kat daha büyüktür. Eğer yeni vücut hücreleri gerekmiyor ise normal hücrelerdeki mevcut olan mekanizma hücreye bölünmeyi durdurmasını söyler. Kanser hücrelerinde bu mekanizmanın baskılanması sebebi ile kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde büyür, bölünür ve çoğalırlar. Buda vücudun diğer bölgelerine yayılarak, birikerek tümörün oluşmasını sağlar. Oluşan tümörler yalnızca bulundukları doku ve organa zarar vermekle kalmaz diğer vücut hücre ve dokularını sıkıştırabilir onların içerisine sızabilir ve onları da tahrip edebilirler. Kanserli hücrelerin doku dışında doğrudan veya kan ya da lenf yoluyla sıçramalarına ‘ metastaz ’ adı verilmektedir. Metastaz Yunanca bir kelime olup yer değiştirme anlamına gelmektedir. Kanser erken teşhis edilemez ve başladığı hücre veya doku dışında bir yere sıçramış ise başladığı yerdeki

hücre tipiyle aynı hücre ismini alırlar. Örneğin; akciğerde oluşan tümör eğer bağırsakta yayılım gösterir ise bu oluşan tümöre “bağırsak kanseri” değil “metastatik akciğer kanseri” olarak adlandırılmaktadır. [2,3–4]

Ülkemizde 1970’li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer almakta olan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından hemen sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Sebebi bilinen hastalıklarda ikinci sırada olmasına rağmen görülme sıklığı konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Modern çağın en büyük sorunlarından biri olan kanser, son yüzyılda çevre şartlarının değişmesi, yaşam temposunun değişmesi ve paralelinde gelen yeme-içme alışkanlıklarının değişmesi kanseri insan hayatının en büyük problemlerinden biri haline getirmiştir. Kanser hücrelerinin birbirinden farklılık göstermesi nedeniyle onkogenleri aktif hale getiren, tümör supresör genleri sessizleştiren veya fonksiyonunu önleyen mutasyonlar keşfedilmiştir. Kanser hücrelerinin bulunduğu doku ve organa bağlı olarak kendine özel moleküler ve biyokimyasal özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Onkogenler kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genlerdir ve gen ekspresyonunu hızlandırarak neoplastik hücre birikimine neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genler hücrenin normal bir şekilde bölünme, büyüme ve çoğalmasını sağlayarak tümör oluşumunu baskılamaktadırlar. Çoğu tümör hücresinde ise bu genin hasarı veya aktivasyonunun kaybolması hücrenin anormal çoğalmasına neden olmaktadır.

Apoptozis genetik olarak düzenlenen ve hücrenin kontrollü bir şekilde ölümüne yol açan biyolojik bir olaydır ve anormal hücrelerin apoptozise uğrayamaması hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına bu nedenle de tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Apoptozisi düzenleyen genlerin başında BCL-2 ailesi gelmektedir. Kanser hücresi ve tümör oluşumunun moleküler temelinde genotipini yansıttığı kabul edilen normal hücre poliferasyonunda ki bozulmalara bağlı olarak kontrolsüz hücre büyüme ve çoğalmasının yanı sıra uyarı iletiminde de değişikliklere bağlı olarak çoğalmayı inhibe eden sinyallere duyarsızlık, apoptotik hücre ölümünden kaçabilme, apoptozun görülmemesi, büyüme sinyallerine onkogenik uyarı iletimi gibi özellikler görülmektedir. Bunun gibi hücre ölümünü riske eden sebeplerden dolayı hücrenin büyüme ve çoğalma kontrolü ortadan kalkar. Çeşitli kanser türlerinde hücre yapıları ve buna bağlı olarak mekanizmaları farklı olsa da karakteristik özelliklerinin temel işleyişleri aynıdır. Buna bağlı olarak kanserin

moleküler temelinin bilinmesi büyük bir avantaj sağlarken erken tanı ve tedavide bir o kadar önem teşkil etmektedir.[4,41-57]

2012 senesi verilerine göre dünyada 14.1 milyon yeni kanser olgusu, 8.2 milyon kanser kaynaklı ölüm teşhis edilmiştir. Teşhisten sonraki 5 sene içerisinde kanser ile yaşayan 32.6 milyon insan mevcuttur. Yeni kanser olgularının yüzde %57'si (8 milyon), kanser kaynaklı ölümlerin %65'i (5,3 milyon) ve 5 yıl boyunca süregelen kanser olgularının %48'i (15,6 milyon) göreceli olarak az gelişmiş bölgelerde saptanmaktadır. [36]

Teşhis, tedavi ve önleme seçeneklerindeki ilerlemeye rağmen kanserde sağ kalım oranları halen düşüktür. Bu nedenle yeni tedavi seçeneklerinin bulunmasına gereksinim duyulmaktadır. [37]

2.2. KOLON BİYOLOJİSİ

'Kolon' sindirim sistemimizin bir parçası olan 'kalın bağırsak' teriminin latince genel adıdır. Çekumdan başlar ve rektuma kadar uzanan bağırsak kısmıdır. Asıl görevi dışkıdan suyu ayırmak olan bağırsak memelilerde çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır. Çekumdan transvers kolonun ortasına kadar olan kısma 'sağ kolon' kalan kısma ise 'sol kolon' adı verilmektedir. Çekum kısmı ince bağırsağın sonlanıp kalın bağırsağın başladığı bölüm olarak bilinmektedir. Çekum bir kapakçık vazifesi görerek sindirilen gıdaların tek yönlü akışını sağlamaktadır. [21] Rektum ise memelilerde kalın bağırsağın son bölümü olup anüse açılan kısmıdır. Dışkının atılmadan hemen önceki tutulduğu yer olacaktaki bilinir. İnsanlarda rektum uzunluğu 12 cm dir ve rektumun son birkaç santimetrelik kısmı deriye benzer bir doku ile kaplıdır. [22]

Kalın bağırsak duvarı 3 tabakadan oluşur;

1. Kalın bağırsağın içini kaplayan örtü tabakasıdır ve buna mukoza denir. Bu tabaka besin maddelerinin sindirimden görevli olup kana emilmesini sağlamaktadır.

2. Orta kısımda bulunan ise kas tabakası bulunur. Bu tabaka besin maddelerinin ileri doğru hareket etmesini sağlamaktadır.

3. Bağırsak duvarının en dış kısmında ise seroza tabakası bulunmaktadır. Seroza tabakasının yüzeyi düzgün olup bağırsağın karın boşluğu içerisinde birbirine

yapışmasını engellemektedir.

Sindirim sistemi anatomisinde kalın bağırsak, ince bağırsak ile anüs arasındaki kısım olarak bilinir ve 1,5 - 2 metre arasında uzunluğa sahip olup sindirim sisteminin beşte birini oluşturmaktadır. Kalın bağırsağı ince bağırsaktan ayıran şeyler çapının büyüklüğü, nispeten sabit konumu, keseli görünümü ve dışında yer alan peritonla örtülü 'yağ parçacıkları'dır (*appendices epiploicae*). Kolon ve rektum vücudumuzun sindirim sisteminin parçaları olup özofagustan mideye inen besinler sindirilerek ince bağırsağa gönderilir. Burada vücut gıdalarda bulunan besin öğelerini absorban eder ve besin maddelerini gıdalardan ayırarak vücuttan atılacak olan atıkların depolanması için kalın bağırsağa geçer. Dışkı vücuttan uzaklaştırılana kadar rektumda depolanır. Kalın bağırsak ve rektum 'büyük bağırsak' adında uzun kaslı bir tüp oluşturmaktadır. [13] Kalın bağırsağın 150-180 cm'lik kısmına 'kolon', 15-18 cm'lik kısmına da 'rektum' denilmektedir.

2.2.1. Kolon Kanseri nedir? Sebepleri Nelerdir?

ABD'de her yıl 150.000'den fazla kişi kalın bağırsak kanseri olduğunu öğreniyor. Türkiye'de ise çok sağlıklı kanser kayıtlarının olmamasına rağmen orantısız olarak yaklaşık 30.000 kişinin kolorektal kansere yakalandığı tahmin edilmektedir. [1] Kolon kanseri erişkin bireylerde en çok üçüncü sıklıkla görülen kanser türü olup erkek ve kadın bireylerde ise kansere bağlı ölüm nedenlerinin arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserin %80'i seyrek olarak oluşurken geriye kalan %20lik kısmı ise kalıtsaldır.

Kolon kanserinin iki tipi vardır.

1. Polip zemininde gelişenler(Adenoma)

2. Kalıtsal kolorektal kanserler

Familyal adenomatöz polipozis (FAP) zemininde gelişenler

Zayıf FAP (Attenuated FAP) zemininde gelişenler

Familial kolorektal kanser (Lynch I Sendromu)

Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser (Lynch II Sendromu)

Kolon kanseri olgusunun çoğu bağırsak içerisine bir elin parmaklarına benzer oluşumlar oluşarak iyi huylu polip gelişmesi ile başlar. Elli yaş ve üzeri

kişilerde iyi huylu polipler oldukça sıklık ile görülmektedir ve vakaların %90 'ı 50 yaş ve üzeridir. Normal riske sahip hastalarda da tarama yaşının elli olma sebebi budur. Erken teşhis ve tedavi ile (Örneğin; ameliyat ile polip 'in alınımı) iyi huylu poliplere bir müdahale edilmelidir. Poliplerin kanserleşme ve normal olan kolon veya vücut hücrelerine metastaz yapma kabiliyeti kazanabilmeleri göz önünde bulundurulmalıdır. Metastaz kanser hücrelerinin köken aldığı doku veya organdan, lenf veya kan dolaşımı ile vücuttaki diğer doku ve organlara yayılmasıdır. Kan yolu ile yayılmada kanser hücreleri yakında bulunan oluşmakta olan veya yeni oluşmuş kan damarlarına girerek dolaşım sistemi ile vücudun diğer bölgelerine taşınır. Diğer bir taşınma sistemi olan lenfatik yayılmada ise kanser hücreleri lenfatik sisteme girer ve bu sistem ile farklı lenf nodlarına taşınması sağlanır. Lenf yoluyla kanser hücrelerinin bu şekilde taşınması sonucu ikincil tümörler meydana gelmektedir. [62]

Tümör (halk dilinde ' ur ') bağırsağı tıkararak dışkı atımını engelleyebilir. Bu kanser tipinin tam olarak nedenleri bilinmemekle beraber risk taşıyan hastaların yaşam tarzı, beslenme veya genetik gibi faktörlerle ilişkili olduğu görülmektedir. Ailesinde kalın bağırsak kanseri hikayesi, kişi bağırsağında polip olması, bazı iltihabik bağırsak hastalıkları (Örneğin; ülseratif kolit, Crohn vb.) veya bağışıklığı düşük olanlar daha yüksek risk taşımaktadırlar. Risk yaş ile ve vücudun herhangi bir yerinde bulunan kanser oluşumuyla birlikte artmaktadır. Fazlasıyla bağırsağı yoran yani lifli, yağlı, işlenmiş besinler (Kırmızı et, salam, sosis, mangal vb.), az oranda sebze ve meyve tüketimi beslenmeyle ilişkili faktörlerdir. Yaşam tarzı faktörleri ise; hareketsiz yaşam tarzı, fazla kilo alımı, sigara ve alkol kullanımını içermektedir. [14-53]

2.2.2. Kolon Kanseri Çeşitleri

Bağırsak kanserinin çok çeşitli tipleri vardır ki bunlar meydana geldikleri hücrelerin isimleriyle anılırlar.

- A. *Adenokarsinomlar*: Kolorektal kanserlerin %95 'i bu tip kanserlerdir. Bezsiz dokularda ortaya çıkmakta ve beze ait olması gerekmez, salgılayıcı özelliklere sahip olmaları yeterlidir. Yani, bağırsak zarındaki bez hücrelerinde başlamaktadır (İyicil bir bezsel tümör). Alınan örnekler mikroskop altında incelenerek müsinöz tümör veya taşlı yüzük tümörü olarak

gözlemlenir. [16]

B. *Skvamöz (yassı) Hücreli Kanserler (SCC)* : Adenokarsinom hücreleriyle aynı şekilde tedavi edilen bu hücre tipi cilt kanserleri içerisinde ‘bazal hücreli karsinom’ dan sonra gelen ikinci en yaygın cilt kanseri tipidir. [16] Bağırsakta da yassı hücreli bez hücreleri ile beraber bağırsak zarını oluşturan cilt tipinin hücreleridir.

C. *Diğer Bağırsak Tümörleri:*

c.1 Karsinoidler: Bu tümör ilk olarak 1888 yılında Lubarsch tarafından tanımlanmakta fakat; 1907 yılında Oberndorfer, Maling potansiyeli olmadığı ve karsinomlara olan benzerliğinden dolayı ‘KARSİNOİD’ terimini kullanmıştır. Son yıllarda sıklıkla ‘Nöroendokrin Tümörü’ de denilen ve yavaş gelişen nadir bir tümör tipidir. Nöroendokrin sistemin Enterokromatin veya Kulchitsky hücrelerinden gelişmektedirler. Nöroendokrin tümörler (NET) yüz binde 1 - 2 sıklıkta ve 50 - 60 yaş aralığında görülmektedir. [17,18-20] Bu tümörler hormon üreten dokularda gelişmekle beraber kolorektal tümörlere göre tedavi şekilleri farklılık göstermektedir.

c.2 Sarkomlar: Vücudumuzun herhangi bir yerinden köken alan mezenkimal tümörlerdir ve tüm kanserlerin yaklaşık olarak %1’ ini oluşturmaktadırlar. Kolon ya da rektumda bulunan sarkomların çoğu ‘Leiomyosarkom’ dur ve yumuşak doku kökenli düz kas hücrelerinden gelişebilen saldırgan bir sarkomdur. Daha çok yetişkinler de görülmektedir. Küçük kan damarlarını döşeyen düz kas hücrelerinden köken alan Leiomyosarkomu tüm yumuşak doku sarkomlarının neredeyse % 5 – 10 unu oluşturmaktadır. [16]

c.3 Lenfomalar: Bağışıklık sistemi urları olarak bilinirler. Lenf düğümlerinden çıkan, lenfositlerden oluşan tümörlerin tümüne ‘Lenfoma’ denilmektedir. 1832 yılında Thomas Hodgkin ‘Lenfoma’ nın ilk tanımını yapmış hatta kendi adını verdiği ‘Hodgkin Lenfoması’ hastalığı da açıklanmıştır. [19] 100 kolorektal kanserden yalnızca 1 tanesi bu lenfatik sistemin kanserlerindendir ve diğer kolorektal kanser tiplerine göre tedavi

yöntemi çok farklıdır.

2.2.3. Kolon Kanseri Semptomları

Bağırsak alışkanlığında değişme

İshal (Gaitalarının fazla mukuslu oluşu)

Daha çok kabızlık (Hatta kalem gibi ince gaita yapma)

Hasta hiç gaz ve gaita çıkaramayacak duruma gelebilir.

Rektal kanama

Aşikâr rektal kanama (Hemoroit gibi benin peri anal hastalıklara bağlı olmayan kanamalarda yani açıklanamayan kanamalarda kolonoskopi ile tüm kolon değerlendirilir.)

Karın ağrısı ve kramplar

Şişkinlik

Tenesmus (kişi gaita yapma ihtiyacıyla tualete gider fakat yapamaz. Çünkü rektum kitleyle doludur.)

Demir eksikliği anemisi buna bağlı olarak sürekli yorgunluk hissi (Anemi araştırması sırasında gaitada gizli kan testi ile belli olur ve pozitif olan hastalarda kolonoskopi gereklidir.)

Aşırı kilo kaybı ve iştahsızlık

Başka birçok anormallik veya kanserde bu belirti ve bulguları gösterebilir. Bu bulgulardan herhangi birine sahip olan hastaların klinik destek almaları ve kontrollerini yaptırmaları iyi olacaktır. Her hastalıkta olduğu gibi bu hastalıkta da erken tanı ve tedavi çok büyük önem taşımaktadır. Kansere yol açan poliplerin teşhisi ve çıkarılması ile kolon kanseri engellenebilirken, erken belirleme ile %90 ‘ a varan oranlar da tedavi de edilebilmektedir. [15]

2.2.4. Kolorektal Kanseri Tanı, Muayene ve Laboratuvar Testleri

Erişkin bireylerde 50 yaş ve üzeri düzenli olarak kolon kanseri tarama testleri yaptırması önerilir. Kişinin bireysel kolon kanseri riskine göre tarama testlerinin belirli aralıklarla yaptırması gereklidir. Birinci derece akrabalarında kolon kanseri geçmişi var ise akrabaya konulan kanser tanısının konulduğu yaştan 10 yıl önce taramalara başlanmalıdır veya kişide önceki muayeneler de tespit edilen polip geçmişi varsa düzenli olarak taramalar yapılmalıdır. American Cancer Society (Amerikan Kanser Derneği), US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer (ABD Dernekler Federasyonu Kolorektal Kanser Görev Gücü) ve American College of Radiology (Amerikan Radyoloji Derneği) 2008 Martında ortaklaşa kanser öncülü polipler ve kolon kanserinin erken tanı kılavuzlarını yayınlamıştır. Bu kılavuzlara göre iki kategoride tarama yapılmaktadır. [14,51-52]

- A. Kolonu inceleyen, hem kanser öncülü polip hem de kanser saptayabilen tamamen veya kısmi incelemeler.
- B. Dışkı numunesi üzerindeki mevcut olasılıklı kanserin neden olduğu kan izleri veya dışkıyla atılmış kanser hücrelerini belirlemek için yapılan laboratuvar testleri.

Bu Tetkikler Kolonu Görüntülemekte Ve Varsa Mevcut Polip Veya Kanseri Göstermektedir;

1. Kolonoskopi: Muayenenin önerilen sıklığı 10 yılda bir olmaktadır. Rektum ve kolonun tamamının ışıklı bir alet ile muayenesi gerçekleştirilir.[14]

Olumlu etkileri kolonu tamamen inceleyebilme ve poliplerden patoloji testleri için biyopsi alabilmekte veya polip 'i çıkarabilmekteyiz.

Olumsuz etkileri ise bağırsak yaralanması, enfeksiyon veya kanama riski teşkil etmektedir. İşlemler için bağırsağın önceden kapsamlı bir şekilde hazırlanması ve sonrasında hastanın toparlanabilmesi için bir iki gün geçmektedir. Uygulama için hastaya sedasyon (sakinleştirici) gereklidir. Kişi bir gece öncesinden aç kalır ve işlem yaklaşık 30 dakika sürmektedir. Hastada karın ağrısı ile bulantı ve kusmaya neden olabilir. [14]

2. Sigmoidoskopi: Muayene önerilen sıklığı 5 yılda bir olmaktadır. Rektum ve kolonun alt kısmının incelenmesi sert veya bükülebilir ışıklı bir alet ile muayenesi gerçekleştirilir.

Olumlu etkileri genellikle sedasyona (sakinleştiriciye) gerek duyulmaz. Oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntemdir ve öncesinde minimal düzeyde bir hazırlık gerektirir. [14]

Olumsuz etkileri ise kolonun yalnızca %30'luk gibi bir kısmı incelenebilir. Poliplerin belli bir kısmı çıkartılabilir ve bulgulara anormallik görülürse kolonoskopiye ihtiyaç duyulur. Küçük bir kanama, enfeksiyon veya bağırsakta yırtık olabilir. Birkaç gün öncesinde sulu gıdalar içeren diyetlere başlanır ve işlem 15-20 dakika sürer. İçeri verilen hava yüzünden bağırsakta kramp tarzında hafif ağrılar görülebilir.

3. Sanal Kolonoskopi (Bilgisayarlı Tomografik Kolonoskopi) : Muayene için önerilen sıklık 5 yılda bir olmaktadır. X Işınları kullanılarak bilgisayar yardımı ile rektum, kolonun tümü incebağırsağa kadar incelenebilir. Bağırsak içerisine sokulan bir tüp yardımı ile bağırsak tamamen havayla şişirilerek bakılır. [14]

Olumlu etkileri kolonun tamamını inceleyebiliriz ve sedasyona (sakinleştiriciye) gerek duyulmaz. Göreceli bir güvenliğe sahip olan bu yöntemde minimal düzeyde kolon yırtığı olabilir. [14]

Olumsuz etkileri ise polip temizlenemez ve bulgulara anormallik gözlemlenir ise kolonoskopiye ihtiyaç duyulur. Tam bir bağırsak hazırlığı yapılması gerekmektedir.

4. Çift Kontrastlı Baryum Lavmanı: muayene için önerilen sıklık 5 yılda bir olmaktadır. Kolon ve rektumun tamamının bir dizi görüntüsü alınır. Hastaya beyaz tebeşirimsi bir lavman çözeltisi verilerek röntgen filmlerinde kolon ve rektuma ait ana hatlar belli edilir. Rektumdan sokulan bir tüp yardımı ile bağırsak tamamen havayla şişirilir. [14]

Olumlu etkileri kolonun tamamını inceleyebiliriz ve sedasyona (sakinleştiriciye) gerek duyulmaz. Göreceli bir güvenliğe sahip olan bu yöntemde minimal düzeyde kolon yırtığı olabilir. [14]

Olumsuz etkileri ise polip temizlenemez ve bulgulara anormallik gözlemlenir ise kolonoskopiye ihtiyaç duyulur. Tam bir bağırsak hazırlığı yapılması gerekmektedir.

Var Olan Kanseri Saptayabilmek İçin Gereken Testler;

1. Dışkıda Gizli Kan Testi (FOBT) : Muayene sıklığı yılda bir kezdir ve dışkı da bulunan gizli kanı saptamak için kullanılır. Hazır kit halindedir. [14]

Olumlu etkileri bağırsak hazırlığına ihtiyaç duyulmaz ve evde bile numune toplanabilir. Bağırsakta doğrudan hiçbir risk teşkil etmez. [14]

Olumsuz etkileri ise kanser öncülü değişiklikleri saptayamaz. Sadece kolon içerisinde kansere özgü kanamayı değil besinler ve dişsel girişimlerden kaynaklanan her türlü kanama gözlemlenir. Test öncesinde hastaya diyet kısıtlaması gerektirir. (Testten 3 gün önce C vitamini, narenciye, meyve, meyve suyu ve kırmızı et bırakılır.) Test üç kez farklı zamanlarda yapılan gaitalar ile tekrarlanır. [14]

2. Dışkı Numunesinin İmmünokimyasal Testi (FIT) : Muayene sıklığı yılda bir kezdir. Dışkıda gizli kana göre farklı bir numune toplama tekniğiyle gizli kanı saptamak için kullanılmaktadır. Eritrositlerde bulunan hemoglobin tespitine dayanan bir yöntemdir. [14]

Olumlu etkileri diyet, ilaç vb. kısıtlamalara gerek duyulmaksızın bağırsak hazırlığı yapılmaz. Evde numune alınabilir ve bağırsakta doğrudan risk teşkil etmez.

Olumsuz etkileri ise kanser öncülü değişiklikleri saptayamaz ve bazı kanser tiplerini atlayabilir. Test farklı zaman aralıkları ile bir kaç kez yapılmalıdır. [14]

3. DNA Testi: Halen tam olarak tanımlanamamış bu test için çok daha fazla bilimsel kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu test dışkı numunesinden izole edilen DNA 'da bulunan kolon kanseriyle veya polip ile ilişkili spesifik bir gendeki mutasyonları saptamada yardımcı olur. [14]

Olumlu etkileri diyet, ilaç vb. kısıtlamalara gerek duyulmaksızın bağırsak hazırlığı yapılmaz. Evde numune alınabilir ve herhangi bir bağırsak yırtılması riski teşkil etmez. [14]

Olumsuz etkileri ise kanser öncülü değişiklikleri saptayamaz. Yeterli miktarda dışkı numunesi elde edilmelidir ve özel işlemler gerektirir. [14]

2.2.5. Kolorektal Kanser Evreleri

Testler sonucunda tanı kanser ise tedavi planı yapabilmek için hastalığın kaçınıcı evrede olduğu saptanmalıdır. Kalın bağırsak kanserlerinde 3 ayrı sınıflandırma kullanılmaktadır.

1. Dukes Sınıflandırması
2. Astler-Coller Sınıflandırması

3. Tnm Sınıflandırması

Tümör evreleri;

- a. Karsinoma in situ: Bu tümörün ilk evresidir ve tümör rektum veya kolonun kanal sınırları içerisindedir.
- b. Dukes A Evresi I: Submukozaya invaze etmiş haldedir. Bu evrede tümör hücreleri kolon veya rektumun daha iç duvarlarında gelişme gösterirken daha dış duvarlara ulaşamaz ve kolon dışına yayılma gösteremez.
- c. Dukes B Evresi: Tümör muskularis propriaya invaze etmiş haldedir. Yani tümör hücreleri kolon ve rektumun daha derin duvarına yayılmış haldedir. Ancak hücreleri lenf nodlarına yayılım göstermemiştir.
- d. Dukes C Evresi: Tümör peritonla kaplı kısımlarda subserozaya ulaşmış haldedir. Peritonla kaplı olmayan kolon ve rektum kısımlarında ise perikolik ve periretral dokudadır. Vücudun diğer bölgelerine yayılma göstermemiştir.
- e. Dukes D Evresi: Tümör direk olarak diğer organları (Akciğer ve Karaciğer gibi) invaze etmiştir veya peritonu delmiştir.

Lenf Nodu (N) Evreleri;

- a. N0 Evresi: Lenf nodu metastazı yani yayılması yoktur.
- b. N1 Evresi: 1-3 Periraktal ya da perikolik lenf noduna yayılmıştır.
- c. N2 Evresi: 4 ve fazla perirektal ya da perikolik lenf noduna yayılmıştır.
- d. N3Evresi: Ana vasküler yapıların çevresindeki lenf nodullarına yayılmıştır.

Uzak Metastaz (M) Evreleri;

- a. M0 Evresi: Uzak bölgelere yayılmamıştır.
- b. M1 Evresi: Uzak bölgelere yayılmıştır.

2.2.6. Kolorektal Kanser Tedavi Yöntemleri Ve Yan Etkileri

Kalın bağırsak kanseri tedavi yöntemlerin de cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapi başlıca yöntemlerdir. Tedavi kanserin yerleşim yeri (lokalizasyonu), hastanın yaşı, genel sağlık durumu, eşlik eden başka bir hastalık bulunup bulunmaması, bireysel tercihler ve evresine göre değişiklik göstermektedir. Tedavi öncesinde hastalar tedavi yöntemleri, maliyeti, hastalığın evresi, tedavinin yan etkileri ve yaşam standartlarına etkisini ayrıca kendilerine tedavi yönteminin

bulunduğu aşamada uygun olup olmayacağını sorgulayabilirler. Cerrahi tedavi kanserin tedavisinde ana basamağı oluştururken kanserin organlara yayılımı da büyük önem taşımaktadır. Kanser polip aşamasında ise lenf nodlarına sıçrama olmamış ise tek başına tümörün çıkarılması yeterli olurken hastanın beş yıllık sağkalımı %80-90'dır. Kanser birinci evrede ise kemoterapi kullanılmaz. Kemoterapi daha çok metastaz yapan ve lenf nodu tulumu bulunan hastalarda kullanılmaktadır. İleri safha da bulunan yani dördüncü evredeki tümörlerde kemoterapi sadece hastanın yaşam süresini uzatmak, tümörü küçülterek belirtileri azaltmak için geçici olarak kullanılır. Fakat nüksetmiş tümörlerde kemoterapi kullanılmaktadır. Cerrahi müdahalede kanserli kısım çevresindeki sağlam dokularla beraber çıkartılırken bağırsağı bağlayan mezenter doku ve lenf bezleri de alınır. Rektum kanserinde tümörün evresine göre cerrahi müdahale öncesi radyoterapi ve kemoterapi kullanılır. Yoksa radyoterapi kolon kanserlerinde çok tercih edilen bir tedavi yöntemi değildir. Rektum kanserlerinde tümör anüse çok yakın veya anüsün içerisinde ise kalın bağırsağın sol tarafının bir kısmı ile beraber alınması ve iki ucun birbirine bağlanması gerekir. [23,24-25]

Anastomozlu kolon kanseri cerrahisinde kolonun bir bölümü ile etrafındaki bir bölüm sağlıklı bölge çıkarılır ve geriye kalan sağlıklı parçalar birleştirilerek kolon bir araya getirilir. [26]

Birleşmenin mümkün olmadığı durumlar ise sağlam olan bağırsağın uç kısmı karın duvarına doğru ağızlaştırılarak diğer ucu kapatılır (kolostomi). Bu işlemden sonra özel kolostomi torbası ile dışkı dışarı atılır. Çoğu hastada bu durum geçici olarak rektum ve kolonun iyileşmesine bağlı olarak çıkarılırken rektumun alt bölgesine yakın kısımda bulunan tümörlü hastalarda bu durum kalıcı olabilir. Son yıllarda da akciğer veya karaciğere yayılan tümörlerde çıkarılmakta ve cerrahi tedavi uygulanmaktadır.[24,25-26]

Kolonun kanserli olan bölümü ve etrafındaki sağlıklı bölüm çıkarılır, bağırsağın üst ucu karın ön duvarına ağızlaştırılır ve kolostomi torbası yerleştirilir. [26]

Kemoterapik yöntemlerde tümörü yok edebilmek için antikanser ilaçları kullanılmaktadır. Sistemik tedavi olarak adlandırılan bu yöntemde verilen ilaç kan yoluyla bütün vücudu dolaşmakta ve kanserli olan vücut hücrelerini öldürmektedir. Kolon kanserinin bazı evreleri ve başka organlara sıçradığı durumlarda kanserli

hücreleri yok etmek için kullanılır. Antikanser ilaçları ağız ya da damar yolu ile verilir ve hasta nadiren de olsa bu ilaçları yatarak alır. Hastalar cerrahi işlem öncesi (Neoadjuvant) veya cerrahi işlem sonrası (Adjuvant) bu işlemi görmelerinin yanı sıra radyoterapi ile birlikte de alabilirler. Cerrahi işlem öncesi yapılan kemoterapi tümörün küçülmesine yönelik iken cerrahi işlem sonrası kemoterapi daha çok kalabilecek olan kanserli hücreleri ortadan kaldırmak veya kanserin tekrarlamasını engellemek için uygulanır.[24]

Radyoterapi kolon kanserinde çok fazla tercih edilmese de bazı evrelerinde kullanılmaktadır. İyonize radyasyon ile kanser hücrelerinin tahribatını sağlayan lokal bir yöntemdir. Alanda bulunan tümör hücrelerinin yüksek enerjili ışınlar ile ortadan kaldırmayı hedefler. Ameliyat öncesi tümörün küçülmesini hedeflerken ameliyat sonrası tümörlü hücrelerin nüksetmelerini engellemek için kemoterapi ile verilebilir.[24]

Bu işlemler kanserin tedavisini yaparken bağışıklık sistemini çöktürme, ağrı ve rahatsızlık hissi, halsizlik ve yorgunluk, kabızlık ya da ishal, kanama riski, enfeksiyon gibi acil müdahale gerektiren durumlar, kolostomi sonrası ciltte irritasyon ve en önemli yan etkisi olan sağlıklı hücre tahribi gibi hasta üzerinde bir çok yan etki göstermektedir. [49]

Kemoterapinin yan etkileri uygulanacak doza ve ilaca göre değişiklik göstermektedir. Kemoterapi için çeşitli ilaçlar kullanılmakta iken bu ilaçların bir kısmı doğrudan tümöre etki eden kemoterapik ilaçlar biyolojik ajanlar veya hormonlardır. Kemoterapi büyüyen ve bölünen hücrelerin ortadan kaldırılması için kullanılırken ilaçlar sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Genellikle anti kanser ilaçları hızla çoğalan hücrelere etki ederken en çok etkilenen hücreler bunların vücutta taşınmasına yardımcı olan kan hücreleridir. Kan hücreleri pıhtılaşma, doku ve organlara oksijen taşıma, enfeksiyonla savaşma gibi bir çok işlevi yaparken ilaçların hücreleri etkilemesi üzerine hastada yorgunluk halsizlik hissi, kanama ve enfeksiyon eğilimleri artar. Kemoterapiden en çok etkilenen hücreler mide-bağırsak sistemi, kemik iliği, saç kökü hücreleri gibi hızlı çoğalma gösteren hücrelerdir. Saç kökü etkilendiği için saçlarda tedavi sürecinde dökülme görülmektedir. Kolostomi sonrası görülen ağız ve dudak yaraları gibi yan etkileri de olmaktadır. Kemoterapiye her hastanın bağışıklık sistemi ve vücut lokasyonu farklı olduğu için hastalarda farklı zaman aralıklarında farklı yan etkileri olmaktadır. Bir kemoterapide hastanın görmüş

olduğu yan etkiyi hasta diğer seferlerde görmeyebilir ya da birkaç kemoterapi sırasında yan etki gözlenmezken sonraki kemoterapilerde yan etki görülebilmektedir. Kemoterapinin yan etkilerinin de değerlendirilebilmesi için farklı tetkik ve testler vardır. Bunlar kan sayımı ve biyokimyasal testlerdir. Bu testler kemoterapi alan hastalara belli aralıklarla yapılarak hastaların hemoglobin, trombosit, lökosit sayıları, karaciğer ve böbrek fonksiyonları kontrol edilir. [28-29]

Kemoterapi de en çok görülen yan etkiler bulantı, kusma, saçlarda dökülme, iştahsızlık, ağız ve diş eti problemleri, cilt problemleri (kuruma gibi), kaslarda ve eklemlerde ağrı, cinsel problemler, kanama, enfeksiyona karşı duyarlılık artışı, yorgunluk, halsizlik, kansızlık ve ishal ya da kusma gibi. Bu yan etkiler kemoterapi alımının bitmesiyle birlikte vücudun kendini toparlama sürecinde ortadan kaybolur. Tabi yan etkilerin kaybolması kişinin yaşıyla, hastalık geçmişiyle ve vücut direnciyle doğru orantılı olarak değişiklik göstermektedir. [28-29]

Radyoterapinin yan etkilerini azaltmak ve sağlıklı hücrelerin kendilerini toparlayabilmeleri için hafta sonu 2 gün ara verilir. Ayrıca yan etkileri en aza indirmek için uygulanacak bölgenin çevresinde kalan doku ve organları korumak amacı ile ışının etki etmesini engellemek amacı ile kurşun koruma bloklar konulur. Yan etkileri ilk günlerde değil genellikle doz arttıkça ilerleyen günlerde görülmektedir. Yan etki ve doz hasta yaşına, hastalık geçmişi ve hastanın direncine bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde değişmektedir. Günlük ve toplam doz ne kadar yüksek ise hastadaki yan etkide o kadar yüksek olmaktadır. Her doku ve organın radyasyona karşı direnci farklılık gösterir. Özellikle radyasyona karşı toleransı düşük olan doku ve organların (karaciğer, böbrek gibi) bulunduğu bölgelerde çok daha dikkatli yapılmalıdır ki kolorektal kanserlerinde fazla tercih edilmeme sebeplerinden birisi de budur. Bazen kan yapıcı hücreleri de etkileyebilir. Mideye yakın bölgelerde uygulanan radyoterapiler de hastada ishal, kusma ve bulantı, idrar yaparken ağrı, iştah azalması buna bağlı olarak kilo kaybı, ciltte kızarma ve kuruma, halsizlik yorgunluk hatta dışkı kaçırma gibi genel yaşamını etkileyen yan etkiler görülmektedir.[27-49]

Bu durumlar hastanın genel yaşam standartlarını etkilediği için hastanın psikolojik olaraksa kendini kötü hissetmesi hastanın düzelme sürecini uzatabilir.

2.3. RNA Mekanizması

Son yıllarda yapılan araştırmalar, DNA'daki kontrol sisteminin düşünüldüğünden çok daha kompleks yapıda olduğudur.

2.3.1. RNA İnterferans (RNAi)

RNA interferans, gen fonksiyonu araştırmalarında üzerinde yoğun araştırmalar yapılmakta olan yeni bir alandır. RNAi, Science dergisi tarafından 2001 de 'Yılın Molekülü' ve '2002 Yılıın En Önemli Bilimsel Hamlesi' olarak seçilmiştir. M.I.T.' den Nobel ödüllü Prof. Dr. Phillip Sharp, 'RNA interferans, son 10 yılın en heyecan verici keşfidir.' demiştir. RNA interferans genetik çalışmalar esnasında ortaya çıkan önemli bir buluştur. RNAi mekanizması mayalardan memelilere kadar olan tüm ökaryotlar da, benzer hücre bileşenlerinin katılımıyla oluşmuştur. RNAi canlı hücreler içinde yer alan, hangi genlerin nasıl aktivite göstereceğini belirleyen ve kontrol eden sistemdir. Transkripsiyon sonrası sessizleşme, bastırılma veya bir genin diğerine üstün gelmesi gibi birçok olay RNA interferans ile gerçekleşmektedir. İki tip küçük RNA vardır. Bunlar gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNA interferans yolakları, small interfering RNA (siRNA) ve mikro RNA (miRNA) adı verilen küçük RNA parçacıklarıdır. Bu küçük RNA parçaları protein kodlayamaz. Gen ifadelerinin negatif düzenleyici ajanları olarak görev alırlar. Bu küçük RNA tipleri, genlerin faaliyetlerini azaltmada ya da arttırmada örneğin bir mesajcı RNA 'nın protein üretmesini engelleyerek diğer özel RNA'lar (mRNA) ile bağlanabilirler. Apoptozis, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve gelişim gibi birçok biyolojik rolü üstlenmişlerdir. RNAi'nin küçük parçaları olan bu iki tür aynı sentez ve olgunlaşma süreçlerinden geçmelerine rağmen aralarında önemli farklılıklar bulunmaktadır. [30,31-66]

RNA interferansın mekanizması beş temel işlem halinde özetlenebilir. Bunlar:

1. dsRNA tanıma ve tarama prosesi
2. RNAi deficient-1 (Dicer-RDE-1) yani bir RNase III familyası enzim eşliğinde çift zincirli dsRNA'nın tanınması ve kesilmesi

3. siRNA üretimi: 21-23 nukleotid uzunluğunda RNAların oluşması
4. siRNA-RISC kompleksi ikilisinin spesifik komplementer mRNA bölgesi ile bileşmesi
5. RISC içindeki exonukleazlar tarafından hedef mRNA'nın tahrip edilmesi ve RISC kompleksinin yeni bir işlem için başa dönmesi.[30]

2.3.1.1. –mikroRNA (miRNA)

-mikroRNA yani miRNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülü türüdür ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. -mikroRNA'lar kodlanmayan RNA'lardandır. Yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama çevirisi olmayan, yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Olgun miRNA moleküller bir veya daha çok mesajcı RNA (mRNA) ile kısmi tamamlayıcılardır. Başlıca işlevleri gen ifadesini aşağı ayarlamaktır. 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmişlerdir. Ancak –mikroRNA yani miRNA terimi ancak 2001 yılında kullanılmıştır. [33] Protein üretiminde ve üretimin kontrolünde sayısız protein görevlidir. miRNA'lar kök hücreleri, embriyo, beyin, kalp, karaciğer de dâhil olmak üzere tüm hayvan dokularının normal gelişiminden sorumludur. Bunlarda en ufak bir eksiklik veya hata canlının ölümüne yol açmaktadır veya canlıda hastalık yapıcı etkindir. Örneğin miRNA'nın az veya çok üretilmesinin farklı kanser türlerine sebep olduğu bulunmuştur.

-mikroRNA'ların esas etki mekanizması translasyonun baskılanmasıdır. Normal bir translasyon işlemi için öncelikle başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmaları ve bu yolla mRNA'nın ribozoma yerleştirilmesi gerekir. RISC kompleksinin mRNA'nın 3'translasyonu olmayan bölgeye yerleşerek miRNA + mRNA etkileşimini gerçekleştirmesi gerekir. Daha sonra başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmasını bozarak translasyonu baskılar. Bu esas mekanizmaya ek olarak, RISC kompleksi translasyonun başlamasından sonra da mRNA'ya bağlanabilir. Bu durumda da ribozomların ayrılmasıyla translasyon erken sonlanır. [32,33-34]

2.3.1.2. Small İnterfering RNA (siRNA)

1998 yılında Nobel Ödülü kazanan Yang ve Mello tarafından yayınlanan sentetik uzun çift sarmallı RNA moleküllerinin neden olduğu solucanlardaki RNA etkileşimini tanımladı. Sentetik siRNA ilk olarak Zamore ve diğerleri tarafından 2000 yılında tanımlanmıştır. Gen sessizliği için en yaygın olarak kullanılan RNAi şeklidir. Sentetik olarak RNA alınarak uygulanacak yere özgü sentezlenebilirler. Bu sayede uygulanacak bölgede susturulmak istenen gen hedef alınır.

Small interfering RNA (siRNA) küçük RNA parçaları olarak adlandırılırlar. Boyları yaklaşık olarak 20-25 nükleotiddir. Genlerin düzenlenmesinde görev alırlar. Susturulması gereken genlerle bağlanarak baskılama işlemini yaparlar. Kontrol molekülü olan siRNA molekülleri mRNA'lara bağlanarak onları keserler ya da etkisiz hale getirirler. Böylelikle protein sentezi durdurulur. Ökaryotik canlılarda bulunurlar ve genellikle yüksek yapılı bitkilerde vardır. Çift sarmal RNA (dsRNA) moleküllerini siRNA denilen ve 20 nükleotidden oluşan küçük fragman parçalarına ayıran DİCER isimli bir enzim tarafından başlatılırlar (RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC)). [35,65,66-69]

Small interfering RNA (siRNA) poliferasyon, invazyon, anjiyogenez, metastaz, inhibisyon, sağkalım ve apoptoz ile ilişkili olan onkogeni hedeflemeye ve susturma potansiyeli ile terapötik uygulamalarda çok fazla ilgi görmektedir. Terapötik uygulamalarda siRNA'yı minimum hedef dışı etkilere, aktif olarak ise hedefe spesifik bir şekilde tasarlamak gerekirken siRNA'nın in vivo olarak hedef hücrelere etkili bir şekilde verilmesini sağlamak en zor adım olarak kabul edilmektedir. Genel olarak gen taşıyıcılar viral ve non-viral taşıyıcı olmak üzere ikiye ayrılabilir. [65-69]

Geçmişten beri, siRNA aracılı gen sessizleştirme, klinik öncesi araştırmalarda, genine özgü sessizleştirilmesi bakımından başka bir tedavi yöntemi olarak önemli bir garanti vermeye başlamıştır. Çok uzun zaman öncelerde in vivo siRNA verilmesi onarıcı bir yöntem olarak kullanılmada önemli bir engel olarak görülmekteydi. [68]

Bir memeli hücresi siRNA gibi çift sarmallı bir RNA ile karşı karşıya kaldığında onu bir viral yan ürün olarak algılayabilir ve bir bağışıklık cevabı başlatabilir. siRNA'nın hücreye girmesi diğer tehdit altında olmayan proteinin de

saldırıya uğraması ve elenmesi durumunu ortaya çıkarabilir ve hedeflenmemiş hedeflemeye neden olabilir. Vücutta çok fazla siRNA'nın bulunması doğal bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu nedeniyle spesifik olmayan olaylara neden olabilir. Ancak herhangi bir geni yenme kabiliyeti göz önüne alındığında siRNA'lar birçok terapötik kullanım için potansiyele sahiptir. [35]

Memelilerdeki ilk terapötik uygulama siRNA ile Fas aracılı karaciğer fibrozlu bir farede Fas'ın aşağı düzenlenmesi ile gösterildi. Fas'a karşı siRNA ile tedavi edilen farelerin % 82'sinin, kontrol grubu 4 için 3 gün ile karşılaştırıldığında 10 gün boyunca hayatta kalabildikleri gözlemlendi. Hücre türüne spesifik sevkıyat için ilk örneklerden biri, siRNA'nın protamin / antikor ile konjuge edildiği zaman gösterildi. [67]

Aplylam Inc. ve Massachusetts Teknoloji Enstitüsü (MIT) iş birliği ile binlerce farklı lipid benzeri moleküllerden oluşan bir kütüphaneyi sentezlemek için bir proje üzerinde işbirliği yaptı. Daha sonrasında ise siRNA'yı sunma verimliliği için onları taradı. Solunum hastalığını tedavi etmek için farelerde bu iletim sistemlerini test ettiler. Moleküllerinin bir kısmının mevcut olmayan kapsüllenmemiş siRNA verme ile karşılaştırıldığında siRNA vermede on kat daha etkili olduğunu buldular. [67]

Yakın zamanda kanserler ve enfeksiyonlar dâhil olmak üzere geniş bir yelpazedeki bozuklukların tedavisi için yeni terapötik sınıflar olarak araştırılmıştır. Gerçekten de siRNA'ların kanserde dâhil olmak üzere birçok farklı hastalığın ve enfeksiyonun tedavisinde terapötik potansiyelinin olduğu görülmüştür. Örneğin; enzimatik bir fonksiyon eksikliğinde, ilaç molekülleri için erişimin sağlanamadığı proteinler gibi hedefe yönelik etki etmeyi mümkün kılmaktadır. [65-66]

siRNA'ları terapötik özelliklerini geliştirmek üzere kimyasal olarak modifiye ederek kullanabiliriz. [35-65]

Modifiye ederek kullanılma şekilleri;

- Geliştirilmiş etkinlik
- Artmış serum stabilitesi ve daha az hedef dışı
- Azalmış immünolojik aktivasyon [35]

2.4. Nanopartiküller

Nanopartiküller boyutları 100 nm altında olan hacimsel olarak yapıları malzemelerden çok daha farklı özelliklere sahiptirler. Bu özellikler sayesinde elektrik-elektronik, biyomedikal, otomotiv ve kimya sektörleri başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadırlar. Morfolojik ve kimyasal özelliklerinin hassas ve kullanılacak olan malzemeyle etkileşimi sayesinde farklı alanlarda farklı üretim yöntemleri geliştirilmiştir.[59]

2.4.1. Altın Nanopartikülleri

Altın nanoparçacıkları geçmişten beri kullanılmaktadır. İnsanlık tarihine bakıldığında da yaşamımızın en ortasında yer almaktadır. Süsleme sanatında, kral mezarlarında hatta Osmanlı saraylarındaki yemek masalarında kullanılmıştır. Altın nanoparçacıklar Antik Roma’da cam süsleme sanatında, büyüklüklerine ve yoğunluklarına bağlı olarak renk değiştirdikleri için kullanılmıştır. Altının günlük hayatımızın bu kadar içine girme sebebi iyi elektrik iletkenliği, düşük maliyeti, alerjik etkisinin bulunmaması ve bağışıklık sisteminde herhangi bir uyarıya neden olmamasıdır. Son yıllarda altın nanoparçacıklar taşıdıkları özellikler sayesinde birçok alanda kullanılmıştır. Elektronikte, optikte, katalizör olarak ve biyosensör uygulamalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmış ve kısaca AuNP olarak gösterilmektedir. [5,50-56] Biyolojik moleküllerin pek çok şekilde olabilmektedir. Biyolojik molekülde altın yüzey ile direkt bağlanabilecek olan bir fonksiyonel grup var ise (tiyol grubu gibi) istenen biyomolekül ile nanopartikül bir araya getirilebilir.[56]

AuNP ile yapılan çalışmalar; sensörler, işaretleme ve görüntüleme, taşıyıcı ve ısı kaynağı gibi uygulama alanları bulunmaktadır. [6]

2.4.1.1. AuNP ile İşaretleme Yöntemleri

AuNP ışığın görünür bölgesindeki plazmon rezonanslarından dolayı ışınları çok iyi emer veya saçılmalarını sağlar. Bu sayede AuNP optik olarak kullanılırlar.

AuNP'nin kararlı sinyal şiddetleri, floresans özelliklerini kaybetmemelerinde önemli rol oynar. (Floresans soğuk cisimlerde moleküler fotonun yutulmasının daha uzun bir dalga boyunda diğer bir fotonun yayılmasını tetiklemesiyle gerçekleşen ışık verme (ışırma) olayıdır. Yutulan ve yayılan fotonlar arasındaki enerji farkı moleküler titreşimler ya da ısı olarak ortaya çıkar.[56-50]

Nanoparçacıkların büyüklüğü azaldıkça parçacıkların renkleri de kırmızıya kayar. Bunun en bilinen örneklerinden biri evde yapılan gebelik testleridir. Büyüklükleri 50 nm altında olan AuNP gebe kadınların salgıladığı bir hormonun içindeki antikorlara bağlanır. Böylece eğer testi yapan kişi hamile ise AuNP antikorlara bağlandığı için bir renk değişimi gözlenir.

Çoğu kanser hücresi, hücre membranının dış yüzeyine genişçe yayılmış olan EGFR (Epidermal gelişme faktörlü reseptör) olarak bilinen bir proteine sahiptir. [20]

Sağlıklı hücreler bu proteini üretemezler. Bu EGFR ye karşı antikorlara 'anti-EGFR' li AuNP ler kanserli hücrelere saplanırlar ve parlak hale getirirler. Bu sayede kanserli hücreler kolaylıkla saptanabilmektedir.

Kanser tedavisinde immün sistemin uygun metodlar ile aktivite edilerek kullanılmasına 'kanser immün terapi' denir. İmmün sistemdeki hücrelerin kanserli hücreleri hedef alarak yok etmesini amaçlayan bir yöntemdir.

Kanser immün terapi de kullanılan monoklonal antikorlar, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi kanser hücre proliferasyonundaki büyümeyi destekleyen destekleyen büyüme faktörlerini veya Cluster of Differentiation 52 (CD52) ve Cluster of Differentiation Antigen20 (CD20) gibi kanser hücrelerinde spesifik olarak üretilen farklılaşma antijenlerini hedef alır. [20]

2.4.1.2. AuNP Işığı Absorbans Özelliği

AuNP ışığı emme özelliğine sahiptir ve bu sayede serbest elektronların uyarılmasını sağlar. Plazmon rezonans frekansındaki bu uyarılma serbest elektronların toplu olarak titreşmesine neden olur. Bu da parçacığın çevresine termal enerji aktarılmasına yol açar.[55] Kanserli hücrelerin tedavisinde, bu özelliklerinden yola çıkarak AuNP kullanılması düşünöldüğü için son yıllarda bu konu üzerinde yapılan araştırmaları arttırmıştır. Hücreler küçük ısı değişimlerine fazlasıyla duyarlıdır. Vücut sıcaklığının bir kaç derece üzerinde, 42°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hipotermi (hücre ölümleri) görölmeye başlar. İlaç taşıma sistemlerinde olduğu gibi, kanserli hücrelere eşlenik moleküllerin ya da parçacıkların yüzeyine tutunması sağlanarak hastalıklı hücrelerin bulunması sağlanır. Parçacıkları dışarıdan uyararak bölgesel hücre ölümlerine neden olmak ve bu sayede hasarlı hücrelerin ölümleri sağlanarak tedaviyi gerçekleştirmek amaçlanır. [60]

Görünür ışık ile kullanılabilmelerinin yanı sıra, AuNP X-ışınları ve elektron dalgaları ile görüntüleme işlemlerinde de kullanılır. Yüksek moleköl ağırlıkları sayesinde kontrast farkı oluşturarak Geçişli Elektron Mikroskobu'nda (TEM) görüntüleme yapılmasına da olanak sağlarlar. [60-63]

AuNP bağışıklık sisteminde de işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Bu parçacıklarla belirli moleküller veya hücrelerin belirli bölgelerini işaretlemek mümkündür.

AuNP ile antikorlar molekülleri arasındaki ilgi nedeniyle eşlenirler. Böylece antikorla kaplanmış AuNP antijenlere ya da antijen içeren hücrelere gidip bağlanabilir. Bu bağlanma sonucunda görüntüleme işlemi kolaylıkla sağlanmaktadır.[60,63-64]

2.4.1.3. AuNP İle Kontrollü İlaç Salınımı

AuNP taşıyıcı olarak genelde kontrollü ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmaktadır. Kontrollü ilaç taşıma sistemi yine son yıllarda sıklıkla adı geçen bir yöntemdir. Bu sayede ilaç, vücudun istenilen bölgesine ve istenilen miktarda ulaştırılabilmektedir. Böylelikle sağlıklı dokuların zarar görme riski en aza indirilmiş

olur.

Kanser tedavilerinde de kemoterapinin vereceği hasarları gidermek amacıyla bu alanda çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli ilaçların, DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerin, parçacıkların yüzeyine tutunarak taşınması sağlanabilmektedir. Kan damarlarında yüzerek ilaçları doku ve organlara doz aşımı olmadan dağılmasını sağlanacak bu sayede insan vücudundaki yan etkilerini azaltacaktır. Düşük dozlarda yararlı olan ilaçlar yüksek dozlarda zararlı olabilmektedir. [58-64]

Parçacıkların üzerine, kanserli hücrelere duyarlı ancak sağlıklı hücrelere duyarlı olmayan alıcılar emdirilebilir. Bu parçacıklar kapsül görevini gören zarların içine yerleştirilir ve istenilen bölgede dışarıdan verilen çeşitli uyarılar (örneğin UV ışınları) ile ilaç salımı gerçekleşir. Diğer bir yol da hastalıklı hücrelerdeki moleküllere eşlenik moleküller ile bu hücrelerin tedavisinde kullanılacak olan moleküllerin doğrudan parçacıklara emdirilerek istenilen bölgeye taşınmasıdır.

Diğer bir örnek ise parçacıkların DNA tespitinde kullanılmasıdır. Bu testte daha büyük, maviye kayan AuNP kullanılır. Eğer ortamda DNA varsa, DNA'lar birbirlerine değil de parçacıklara bağlanır ve bu şekilde birikerek AuNP çözeltinin içine dağılırlar, renkleri de koyu kırmızıya (şarap rengine) doğru kayar. [60]

2.4.1.4. AuNP'nin Kanser Tedavisinde Uygulanma Şekilleri Ve Biyosensör Yapımında Kullanımı

AuNP çalışmalarından başlıcaları kanser tedavisi ve biyosensör çalışmalarıdır.

BIYOSENSÖR: Biyosensör çalışmalarında iyi bir iletken ve yüzey alanı tutumu veya nanokapsülleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Evde uygulanan gebelik testi, metal nanomalzemelerin nano özelliklerinin normal yaşantımızdaki sorunlara karşı pratik bir çözüm sunmakta olan iyi bir örnektir. Altın nanopartikülleri ile HGC muamele edilerek yapılan bir testtir ve çizgiler altın nanopartiküllerine bağlanmış olan HGC(human gonadropic hormone) ile idrardaki bu hormona ait tamamlayıcı bir çift dizi DNA sarmalında belli proteinin önemli miktardaki fazlalığı ile alakalıdır. . AuNP'lerin biyomoleküllerin immobilizasyonu için kararlı ortamlar sağlama kabiliyeti, enzim biyosensörlerinin, DNA sensörlerinin ve

immünoansörlerin tasarımında birçok gelişmeye yol açmıştır. [50,55-60]

KANSER: Kanser tedavisinde ise iyi ısı iletimi, ilaç kapsülleme, dokuların direkt tümörlü hücrelerini hedef alması veya kan yoluyla taşınarak molekül boyutunun büyüklüğü ve alerjik özellik taşınamaması avantajlarıyla uygun koşullar sağlanarak kullanılmaktadır. [40-60]

2.5. Teranostik Yöntem

Therapy ve Diagnosties / Diagnosis sözcüklerinin birleşmesi ile oluşmuştur. Bu yöntemde tedavi ve tanısal yöntemler birleştirilmiştir. Yani teropötik ile aynı ya da benzer kimyasal yapıdaki tanısal ajanlar ile moleküler görüntüleme veya inceleme yapılarak tedaviye yanıt konusunda bir öngöründe bulunmayı mümkün kılar. Bu bilim alanını geliştirmek amacıyla ‘European Society of Pharmacogenomics and Theranostics’ kurulmuştur. Ayrıca 2011 yılından bu yana Theranostics adlı bir dergi yayınlanmaya başlamıştır. Kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında kullanılabilmesi söz konusu iken nükleer tıpta yapılan birçok tanının ve tedavisinde teranostik kapsamına girdiğini bilmekteyiz.[37-39]

Bu yöntem hastalıkların:

1. Moleküler fenotipe göre sınıflandırılması
2. Molekölün biyo dağılımının gözlemlenmesi
3. Tedaviye cevabın izlenmesini mümkün kılar.

1940’lı yıllardan bu yana tiroit hastalıkları ve kanserinde tanı ve tedavi amacıyla kullanılmakta olan I-131’in ilk teranostik ajan olduğu söylenebilir. I-131, tiroit kanserinde tedavi amacıyla verilir ve aynı anda da yapılan sintigrafi ile biyo dağılımı gözlenir. Tedavi etkisini yaydığı beta parçacığı yaparken, görüntüleme ise yaydığı gamma ışını ile yapılır. Bu kullanım, teranostik kullanımın en iyi örneğidir.[61]

Tedavi edici etkisini belirlemek için ajanın tanısal test ile genel popülasyon üzerindeki etkisine bakılır. Eğer genel popülasyona etkisi pozitif ise bu grup ayrılır ve tedavi edici etkiyi sağlayan ajan bu grup hastalara verilerek tedavideki olumlu sonuç büyük ölçüde garantilenmiş olur. [61]

Yakın geçmişte ilaç iletim stratejisi için, kanser tedavisi ve teşhis alanında

bu problemleri çözebilecek nano ölçekli partiküller geliştirilmiştir. Nanoparçacık Teknolojisi hem terapötik, hem de tanısal yöntemlerin gelişimine büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. Tedavi ve tanı arasındaki o yol ayrımında, ikisini de tek bir verimli formüle çevirme fikrine olan ilgi gittikçe artmaktadır. Adına 2002’de Funkhouser tarafından ‘ teranostik ’ (hem teşhis, hem tedavi için kullanılan) olarak adlandırılan bu konsept, hastalığın moleküler biyomarkırlarını hedefleyebilmek ve kişiselleştirilmiş tedaviye katkı sağlamak konusunda büyük beklentilerin olduğu bir alandır.[38]

Kişiselleştirilmiş tedavi, tedavinin istenmeyen yan etkilerini azaltabilir ve potansiyel olarak daha iyi sonuçlar verebilir. Bu çoklu fonksiyonelliğe erişmek için dört tipik bileşen konseptte dâhil edilmelidir;

1. Nanoparçacık,
2. Tanısal görüntüleme alanı,
3. Ligand hedefleme,
4. Terapötik

Böylece, verimli teranostik partiküllerin geliştirilmesi aşamasında daha sensitif tanısal görüntüleme, liganda daha spesifik bağlanma ve kontrollü ilaç salınımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçlara ulaşmak için pek çok deneysel yol araştırılmaktadır. Şu anda teranostik partikül görüntüleme için kullanılan yöntemler arasında gama kamera, optik tomografi (NIR), manyetik rezonans görüntüleme (MRG), Nükleer Tıp yöntemleri ile görüntüleme (SPECT, PET), bilgisayarlı tomografi (BT) ve ultrasonografi (US) mevcuttur.[38]

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca dört aşamada toplanabilmektedir.

Birinci aşamada, sıcaklığa duyarlı ve pH 'ya duyarlı altın nanopartikülün sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

İkinci aşamada hücreler çoğaltıldı ve hücrelerin agaroz jel elektroforezindeki yürümeleri incelendi.

Üçüncü aşamada farklı konsantrasyonlarda belirlenen toksik olmayan altın nanopartikül derişimleri ile siRNA'lar, DLD ve L929 hücreleri üzerindeki etkisini gözlemlemek amacı ile gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak zamana bağlı hücre proliferasyonlarına bakıldı.

Dördüncü aşamada apoptoz\nekroz ikili boyaması yapılarak, altın nanopartikül ve siRNA'nın, DLD ve L929 hücreleri üzerindeki tekli ve kombine etkilerini görmek ve buna bağlı olarak hücrelerin nasıl bir tepki verdiğini görmek ve bu tepkiyi nasıl gösterdiğini incelemek için hücrelerin ölüm yollarından hangisini seçtiği morfolojik olarak değerlendirildi.

3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

Nanopartikülün sentezi için Hydrogen tetrachloroaurate(III) (HAuCl₄) Riedel de Hean (ABD) firmasından temin edilmiştir. RNA interferans çalışmalarında, siRNA'ya ait sens 5' CCG GGA GAU AGU GAU GAA GdTdT 3' ve antisens 5' CUU CAU CAC UAU CUC CCG GdTdT 3' primerleri Qiagen (Almanya)firmasından temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için; insan kolon kanseri hücre hattı (DLD) ve fibroblast hücre hattı (L929) Kırıkkale Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Prof.Dr. Mustafa Türk'ün Hücre Kültür Laboratuvarından sağlanmıştır. RPMI-1640 ve DMEM (Roswell ParkMemorial Institute-1640; ATCC) Lonza'dan (Belçika), fetal bovine serum(FBT) Scientific'ten (ABD), Dimetilsülfoksit (DMSO), fosfat tamponu (PBS), Tripsin-

EDTA(Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), Tripan mavisi,, Biological Industries'den (İsrail) temin edilmiştir. Propidium iodide, Hoechst 33342 ve Ribonükleaz A Serva'dan (İsrail) alındı. Tüm çalışmalar süresince kullanılan bu kimyasallar analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır. Hücre kültür çalışması, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plaklarda (Corning, ABD) yapılmıştır.

Class II Bichazard Safety Cabinet'te hücreler hazırlandı ve BINDER'da hücreler uygun şartlarda saklanması ve çoğaltılması sağlandı. Introgen Contess ile hücre sayımları gerçekleştirildi. Hazırlanan altın nanopartikül ve siRNA'lar Bio-Rad, Power Pac Basic'te agaroz jel elektroforez yürütmesi yapıldı ve Gel Logic 2200 PRO ile yürüme görüntülendi. Çoğaltılan hücreler gerçek zamanlı hücre proliferasyonunu incelemek için Roche xCELLigence RTCA'da bakıldı. Altın nanopartikül ve siRNA'ların tekli ve kombine halleri Lecia DMI 6000B mikroskobu ile yapılan ikili boyama görüntüleri elde edildi.

3.2. AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu

3.2.1. AuNP Sentezi

HAuCl₄ (Gold III chloride solution) çözeltisinden 5 mL 10⁻² M Au⁺³ çözeltisi hazırlandı. (Stok altın çözeltisi).

Temiz bir vial içerisine %1' lik 2 mL chitosan çözeltisi konuldu. Üzerine 7mL saf su eklenerek 80°C sıcak su banyosunda kaynama sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Kaynama sıcaklığında 1 mL stok altın çözeltisinden eklenerek 15 dk bekletildi sarı renkli altın-kitosan çözeltisinin rengi bekleme süresi sonunda kırmızı oldu.

3.2.2. Karakterizasyon

3.2.2.1. Zeta Potansiyel Analizi

Zeta potansiyeli kolloitlerin kararlılığını, parçacıklar arasındaki itme ve çekme kuvvetinin ölçümüdür. Bu potansiyelin analizinde, elektrostatik dağılma mekanizmalarıyla ilgili detaylı bilgi elde edilir. Hazırlamış olduğumuz kolloidal çözeltilerdeki partiküllerin zeta potansiyelini ve boy dağılımını belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Dinamik ışık saçılması (DLS) ve mikroeletroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyelini ölçmektedir. Partikülü çevreleyen sıvı tabakası iki parçadan oluşur: İyonların tanecik yüzeyine sıkıca tutunduğu 'İç bölge (Stern tabakası)' ve iyonların daha gevşek olarak tutunduğu 'Dış bölge (Dağılmış tabaka)'. Bu dağılmış tabaka içerisinde, kayma (Slipping) düzlemi olarak bilinen soyut bir sınır vardır ve bu sınırdan itibaren tanecik tek bir nesne olarak davranır. Bu sınırdaki potansiyel ise 'Zeta potansiyeli' olarak bilinir. [4-6]

3.2.3. siRNA'nın AuNP İle Etkileşimi

Hazırlanan nanopartiküllerin optimizasyonları sağlandıktan sonra siRNA ile etkileşimlerinin belirlenebilmesi için agaroz jel elektroforez yönteminden yararlanılmıştır.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle AuNP ve siRNA Örneklerinin Etkileşimlerinin Belirlenmesi

siRNA'nın negatif, nanopartikülün ise pozitif yükünden yararlanılarak oluşturulan komplekste siRNA ve nanopartikül etkileşimi agaroz jel tekniği ile incelendi. Bunun için ilk olarak altın nanopartiküller hazırlandı ve sabit miktarda siRNA (1µL) ilave edilerek vortekslendi. siRNA'ların nanopartikül ile etkileşime girebilmesi için yarım saat oda sıcaklığında beklendi. Bekleme süresinde ise %2'lik

agaroz jel hazırlandı. siRNA, nanopartikül ve siRNA+nanopartikül kompleksi 6×Loading DYE (bromfenol mavisi) ile birlikte kuyucuklara yüklendi. Kontrol grubu olan siRNA ve AuNP'leri son kuyucuklara yüklendi. 120V akımda 15 dakika yürütülen jel görüntüleme sisteminde incelendi.

3.3. İn Vitro Nanopartiküllerin Hazırlanışı ve siRNA'nın Hücre İle Etkileşimi

3.3.1. Hücrelerin Hazırlanışı

Özel krio tüpler içinde bulunan (-190°C) DLD ve L929 hücreleri sıvı nitrojen takından alınarak hızlı bir şekilde 37 °C ye düşürülerek çözüldü. Çözünmüş durumdaki DLD ve L929 hücreleri steril ortamda (Laminar kabin içerisinde) 15'ml'lik falkon tüplere konularak üzerine DLD için %10 luk FBS RPMI-1640 ve L929 için %10 luk FBS'li DMEM besiyerinden 5ml konuldu. 2500rpm'de 2dk santrifüj edildi. Santrifügasyondan sonra süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde hücrelerden uzaklaştırıldı. DLD ve L929 hücre hatları 25 cm² lik flasklar içinde %10 fetal bovine serum (FBS), %1 antibiyotik içeren RPMI-1640 ve DMEM besiyeri bulunacak şekilde flask kapağı hafifçe gevşetilerek 37°C de ve %95 nem. %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca kadar 2gün arayla hücrelerin besiyerleri değiştirildi. Böylece DLD ve L929 hücre hatları hazırlandı. Hücrelerin pasajları takip işlemleri ve hücre polifersyonları Inverted mikroskop kullanarak izlendi. Hücreler belli bir sayıya ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırılarak, falkon tüplere aktarıldı ve 2500 rpm'de 2 dakika santrifüje edildi. Çöken pellete zarar vermeden üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve 1ml taze besiyeri üzerine eklendi. Hücrelere zarar vermeden süspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı için hücreler Tripan Blue ile boyanıp otomatik hücre sayım cihazı ile sayıldı. Bu sayımda hücreler mavi ile boyanmış ise ölü, parlak ve boyanmamış halde iseler canlı olarak gözlemlendi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler daha sonrasında deneyler için kullanıldı. Eğer hücreler yeterli sayıda değil iseler pasajlama işlemi uygulandı. [8-40]

3.3.2. Hücre Hattının Pasajlanması

Pasajlanması gereken hücreler, inkübasyon sonrasında Laminar Kabine alındı ve büyüme ortamları otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Flaskın yüzeyine tutunmuş halde bulunan hücreler ölü hücrelerden ayrıştırılmak ve kalan serumu uzaklaştırmak için 1ml PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi yapılan hücreler 1ml Tripsin-EDTA ile 37°C de 4 dakika muamele edildi. Tripsinin aktivitesini durdurmak için 3ml FBS içeren besiyeri hücrelerin üzerine eklendi. Tripsin+besiyeri olan ortam içerisinde bulunan hücreler falkon tüplere konularak santrifüje edildi. Santrifügasyondan sonra hücrelere zarar vermeden süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücrelerin büyüme karakteristikleri ve çalışma amacına bağlı olarak kuyucuklu plaklara hücre ekimleri yapıldı(5000-10000 hücre/kuyucuk). Ekimi yapılan hücreler 37°C deki karbondioksit etüvüne konuldu ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında sitotoksik, apoptotik, nekrotik ve diğer aktivitelerinin belirlenebilmesi için kullanıldı. [8]

3.3.3. siRNA/Nanopartiküllerin Hücre Proliferasyonlarına Antiproliferatif etkilerinin xCELLigence RTCA İle Belirlenmesi

xCELLigence sistemi gerçek zamanlı hücre canlılığının izlenmesi için kullanılan mikro-elektrodlar sayesinde elektriksel empedansının ölçülmesiyle sonuç alınabilen bir cihazdır. Ölçülen empedans hücrelerin yaşlanmasını, toksisitesini (hücre ölümü) ve hücre döngüsünün durması gibi hücre yaşaya bilirliliğinin farklı dalgalarını ayırt ederek hücre hakkında kantitatif bilgi vermektedir.[8] Bu çalışmada hücreler altın mikroeletrodlarla entegre haldeki Well-Plate ekilir. Bu elektrotlar; kuyucukların içerisindeki ortamın iyonik çevresi ile etkileşimi halinde olduğu için hücrelerdeki değişiklikler görüntülenebilmektedir. Bu hücresel olaylar hücre indeksi olarak değerlendirilir. Bu yüzden elektroda ne kadar fazla hücre tutunursa hücre indeksi (CI) o kadar büyük olur.[7]

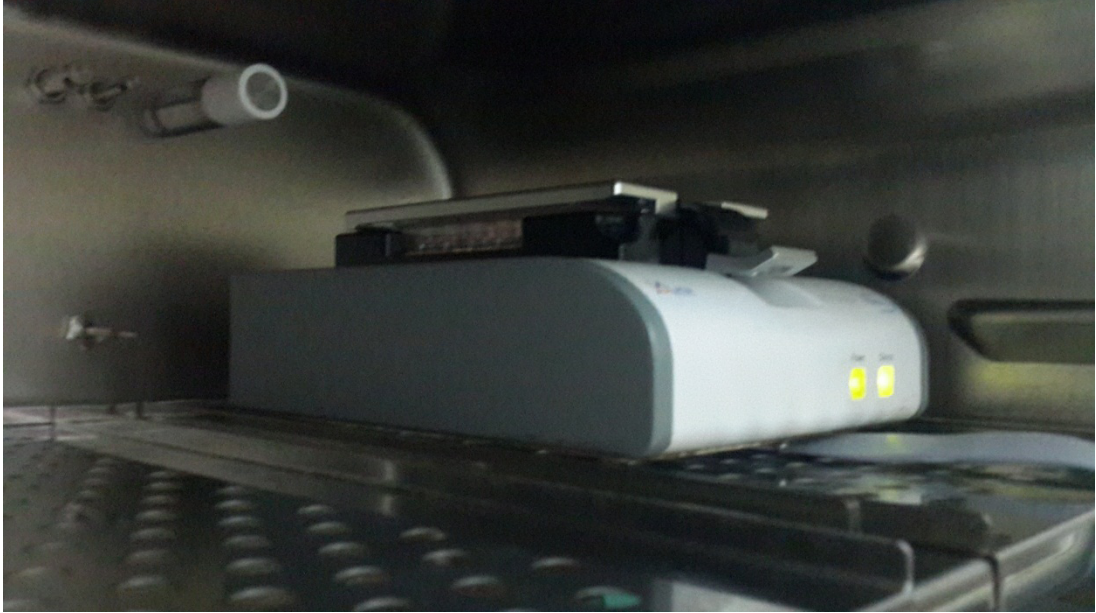
Çalışmamızın bu kısmında nanopartiküllerle birleştirilen siRNA'lar DLD ve L929 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı etkisini analiz etmek için (RTCA SP instrument, Rosch, Almanya) kullanıldı. Bunun için 96 kuyucuklu altın

mikroelektrotların bağlı olduğu Well-Plat içerisindeki her kuyucuğa 100µl besiyeri konulduktan sonra Well-Plate 37°C deki etüvde bulunan xCELLigence cihazına yerleştirildikten sonra plate ve cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 5dk bekletildi. Ölçüm tamamlandıktan sonra Well-Plate etüvden çıkarıldı ve her bir kuyuda 10×10^3 hücre olacak şekilde 100µl besiyerinin üzerine hücreler eklendi. Ekimi yapılan Well-Plate etüve yerleştirildi ve 5dk bekletilerek okuma başlatıldı. Hücrelerin Well-Plate tutunması ve çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyonda olan hücreler çıkarıldı ve üzerine hazırlanan farklı derişimlerdeki karışımlardan eklendi. [9]

Çizelge 3.1. 96 Well-Plate Ekilen Hücelere Ait Deney Grupları

GRUPLAR	KONSANTRASYONLAR
siRNA	1µL
AuNP	1µL
	2µL
	4µL
	8µL
	16µL
	32µL
siRNA + AuNP	1µL + 1µL
	1µL + 2µL
	1µL + 4µL
	1µL + 8µL
	1µL + 16µL
	1µL + 32µL

Plate xCELLigence RTCA cihazının içine yerleştirildi ve 24 saat süreyle 37°C 'de %5CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hazırlamış olduğumuz bileşiklerin hücre poliferasyonları üzerinde göstermiş oldukları değişiklikler bu sayede gerçek zamanlı olarak takip edildi.



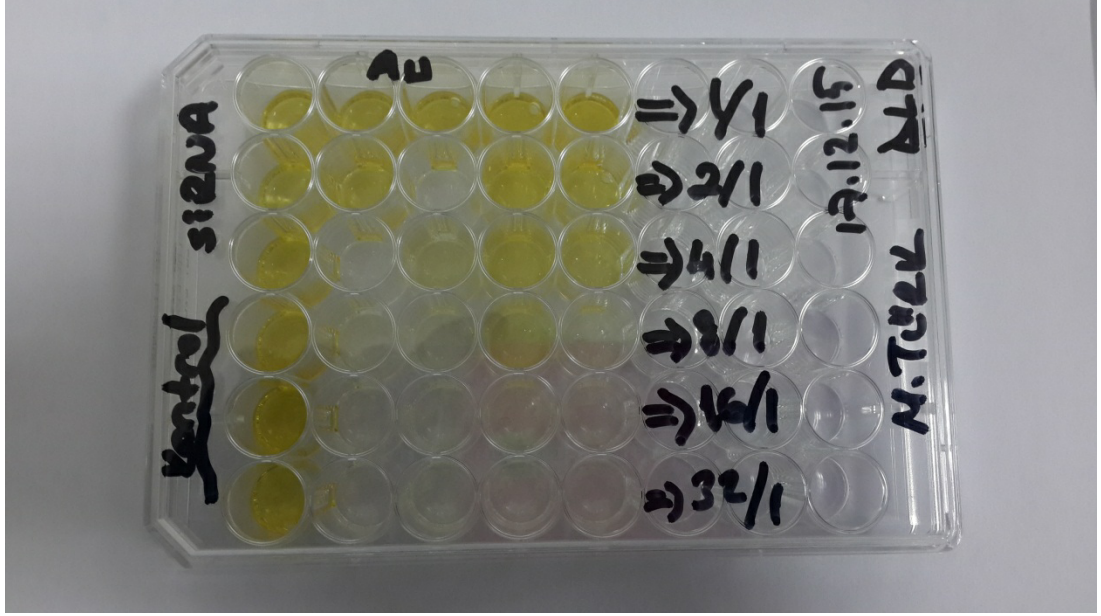
Şekil 3.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (xCELLigence)

3.3.4. İkili Boyama Methodu İle Apoptoz-Nekrozun Belirlenmesi

Kontrollü hücre ölümünden ilk defa 1972 yılında kanlanma eksikliğine maruz kalın dokunun etrafında nekrozdan farklı bir hücre ölümü meydana geldiği gözlemlenmiştir. Latince'de 'ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması' anlamına gelen apoptozis adı Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir. Apoptoz ile kanser arasındaki ilişki 1973 yılında yazılan ilk yazılarla birlikte belirtilmeye başlanmasına rağmen 1992 yılına kadar bu konu üzerine yoğun bir ilgi olmamıştır. Kanser ile uğraşan bilim adamlarının yoğun ilgisi ancak 1992 yılından sonra meydana gelmiş ve günümüzde oldukça dikkat çeken bir konu haline almıştır. [10]

Apoptotik hücre ölümü, herhangi bir enflamatuvar sonucu ortaya çıkan nekrotik hücre ölümünden farklı bir yol izlemektedir. Apoptozisin başında ölüm kararı vermiş olan hücreler normal hücrelere morfolojik olarak benzemektedir.

Apoptotik sinyali almış olan hücrelerde kromatinde yoğunlaşma başlar ve benzer bir şekilde sitoplazmada yoğunlaşma gözlemlenir. Hücrenin boyutu küçülmeye başlar ve bir süre sonra hücre parçalanır. Bu parçaların her birine ‘Apoptotik Cisimcik’ adı verilir. Ortaya çıkan apoptotik cisimciklerin yüzeylerinde yeni sinyal verici yapılar meydana gelir ve çevresinde bulunan hücrelere verdikleri sinyaller sayesinde (bunlar genellikle histiyositlerdir) fagosit edilerek ortadan kaldırılır. Buna hücrenin intiharıda denilmektedir. [11] Apoptotik hücre sayısı canlılığın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirler. Bu yüzden apoptoz hücrelerin denge unsurudur. Apoptoz olayının gerçekleşmesi esnasında genetik hasar almış hücreler, hem tümör supresör genler hemde onkoproteinlerin birlikte iş görmesi, virüs ile infekte olmuş hücrelerin hemde son derece toksik ilaçlara maruz kalmış hücrelerin ortadan kaldırılması bu yolla gerçekleştiği için apoptoz büyük öneme sahiptir. Kanseri hücreleri, yaşam döngüsünü tamamladıktan sonra apoptoza uğrayamaz ve sürekli olarak çoğalmaya devam eder. Nekroz uzun yıllar boyunca apoptoz karşıtı olan raslantısal olarak ortaya çıkan ve programsız patolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktaydı. Nekrotik hücre ölümü, çoğunlukla fiziksel hücre hasarı (travma, basınç değişikliği, ısı vb.), UV ışınları, enfeksiyon, toksinler gibi zararlı faktörlerden dolayı ortaya çıkar. Nekroza giren hücrelerin değişimi ilk olarak mitokondride başlar ve hasar gören hücreler ilk başta şişer sonrasında işe parçalanarak ortadan kaybolur. Nekrozda en temel değişiklik ise membran yapısının bütünlüğünü kaybederek seçici-geçirgen özelliğini kaybetmesidir. Sonucunda ise sitoplazmik içeriğin doku aralığına salınmasından dolayı bu bölgede inflamatuvar olaylar gözlemlenmektedir. [12]



Şekil 3.2. İkili boyama ile hücrelerin canlılık oranlarının saptanması (Sarı renklerdeki değişim hücrelerdeki canlılık oranlarına göre azalmakta. Koyu sarı olarak görünenler canlılıkları yüksek olan kolon kanseri hücreleri iken beyaza yakın görünenler ise canlılıkları daha düşük olanlar da kolon kanseri hücreleri.)

3.3.5. İkili Boyama Metodu

Çalışmanın bu kısmında birinci grup siRNA'nın, ikinci grup nanopartiküllerin ve üçüncü grup olan siRNA-Nanopartikül karışımının DLD ve L929 hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileşimlerine bakıldı.

DLD ve L929 hücreleri 5×10^3 hücre/mL derişiminde olacak şekilde 48 kuyucuklu Well-Platelere ekildi. Hücreler 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Well-Platedeki besiyeri atıldı ve serumsuz besiyeri eklendi. Birinci test grubuna ait kuyucuklara sadece siRNA 1 μ L, ikinci test grubuna ait kuyucuklara ise nanopartikül çözeltisinden belli dozlarda ve üçüncü test grubuna iste nanopartikül ve siRNA karışımından eklendi. Kuyucuklarda ki son hacim 200 μ L olacak şekilde tamamlandı. Kontrol grubuna ise sadece taze hazırlanmış besiyeri

eklendi. 24 saat etüvde inkübasyona bırakılan 48'lik Well-Plate sonrasında alındı ve üzerindeki vasat kısmı uzaklaştırıldı. Hücre üzerine 1mL'lik PBS konularak hücreler iyice yıkandı ve apoptoz-nekroz belirlenmesi için hücrelere ikili boyama metodu yapıldı. Bunun için yıkanan tüm kuyucuklara ikili boyama çözeltisinden 70µL (10 mL PBS, 100 µL Ribonükleaz A, 500 µL Hoechst 33342 ve 100 µl PI boyalarını içeren) pipetaj ile uygulandı ve 15 dakika etüvde bekletildi. 15 dakikanın sonunda çıkarılan hücreler floresan mikroskobunda (Leica DMI70, Almanya) DAPI filtresi kullanılarak apoptoz-FITC filtresi kullanılarak da nekroza uğramış hücrelerin değerlendirmeleri yapıldı. Değerlendirme floresan mikroskobu yardımı ile apoptotik indeks yüzde (%) hesaplanarak ifade edildi.

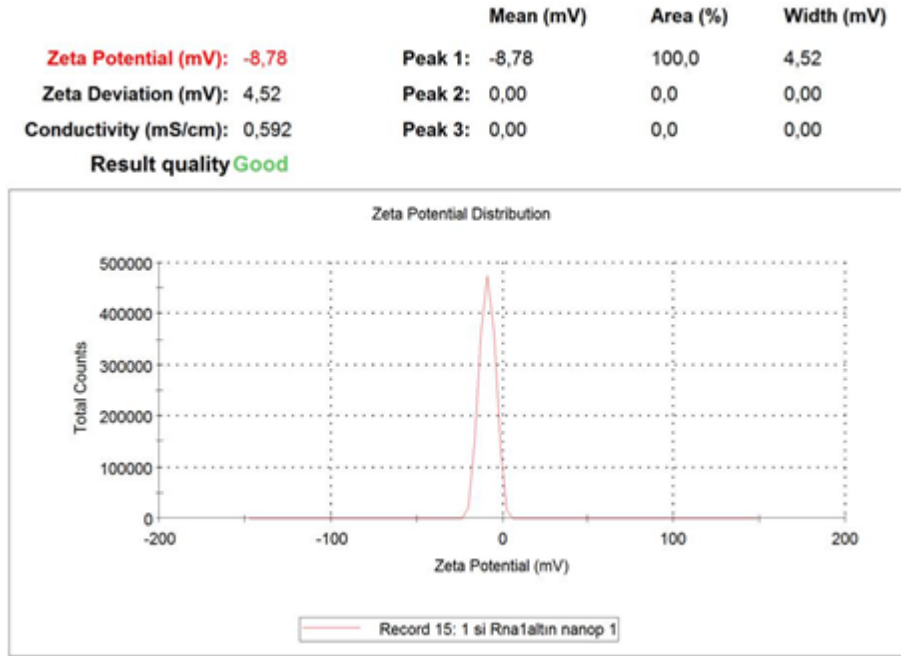
Boyama esnasında Hoechst hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamakta ve hazırlanan boya ile bütün hücreler boyanmakta iken apoptotik hücreler daha parlak ve çekirdek kısmı kaybolmuş yada parçalanmış olarak gözlemlenmektedir. Bu sayede apoptotik hücrelerin normal hücrelerden ayrımı gerçekleştirilir. İkili boyamada kullanılan diğer bir boya olan Propidium Iodide (PI) ise DNA'yı kırmızıya boyayarak nekrozlu hücrelerin belirlenmesi sağlamaktadır. Propidium Iodide normal hücrelerde hücre zarını geçemeyecek büyüklüğe sahiptir ve sadece hücre zarı zarar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçerek nekrozun belirlenmesini sağlamaktadır.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

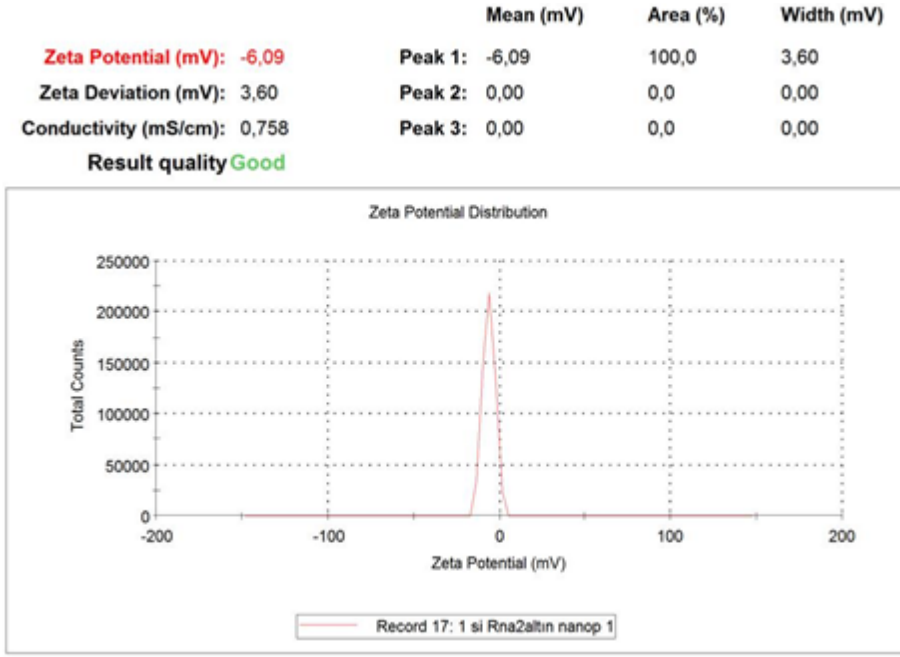
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Zeta (ζ) potansiyel Analiz Yöntemi

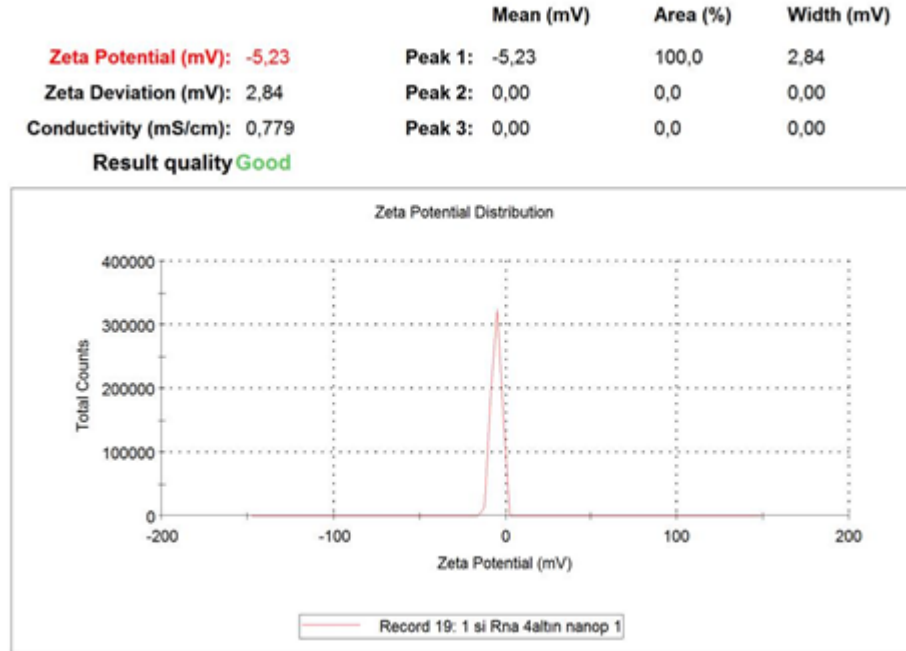
Altın nanopartikül hazırlandıktan sonra Zeta-Sizer cihazı (3000 HSA Modeli MALVERN) ile altın nanopartiküllerin ve kompleks hale getirilen altın nanopartikül + siRNA'ların yüzey yükü dağılımlarına ait sonuçlar elde edildi. Şekillerde nanopartikül ve nanopartikül + siRNA'ların Zeta-Sizer a ait ölçülen yüzey yükü grafikleri gösterilmiştir.



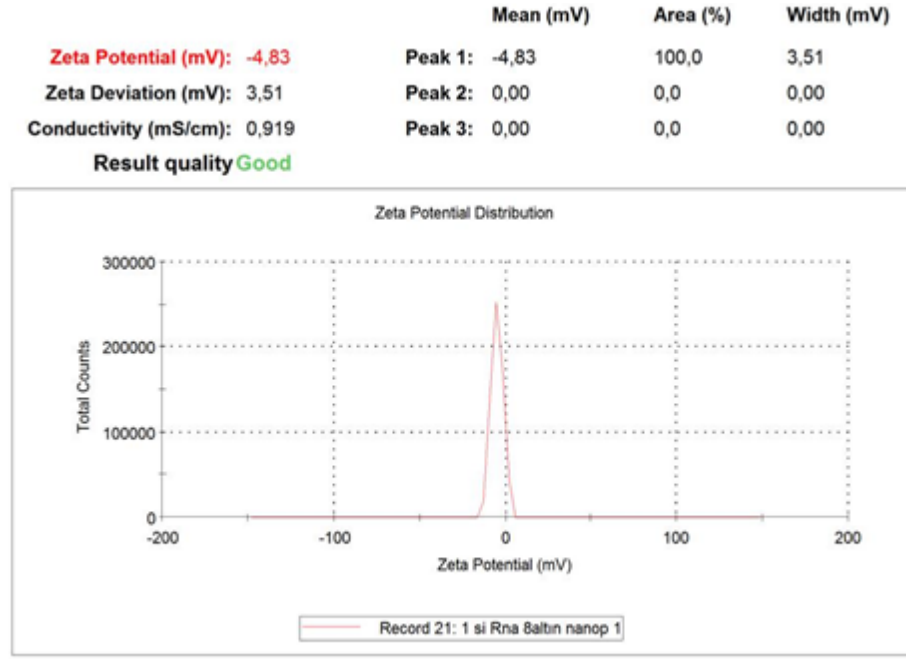
Şekil 4.1. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 1µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



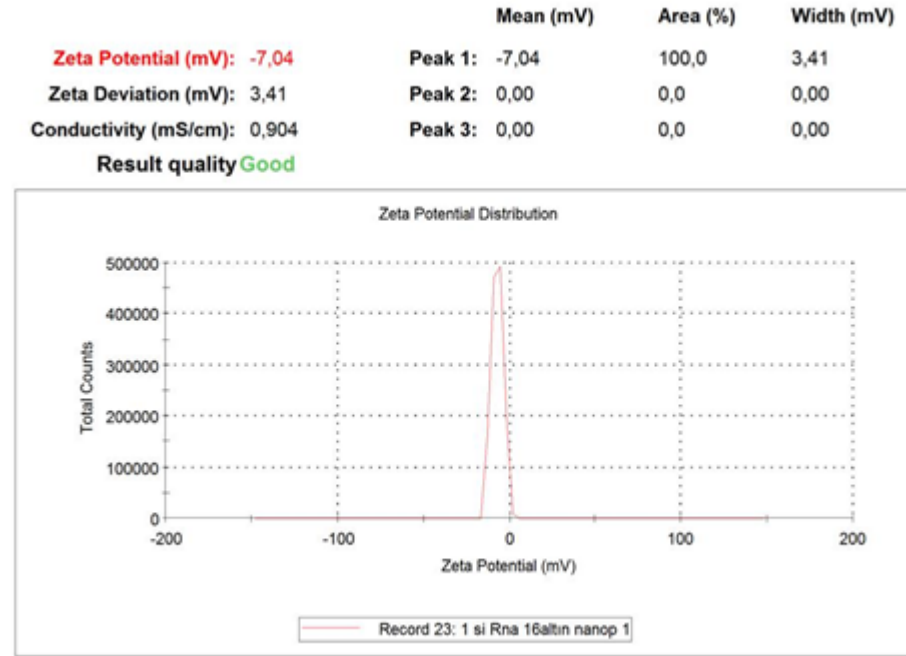
Şekil 4.2. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1 μ L siRNA + 2 μ L AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



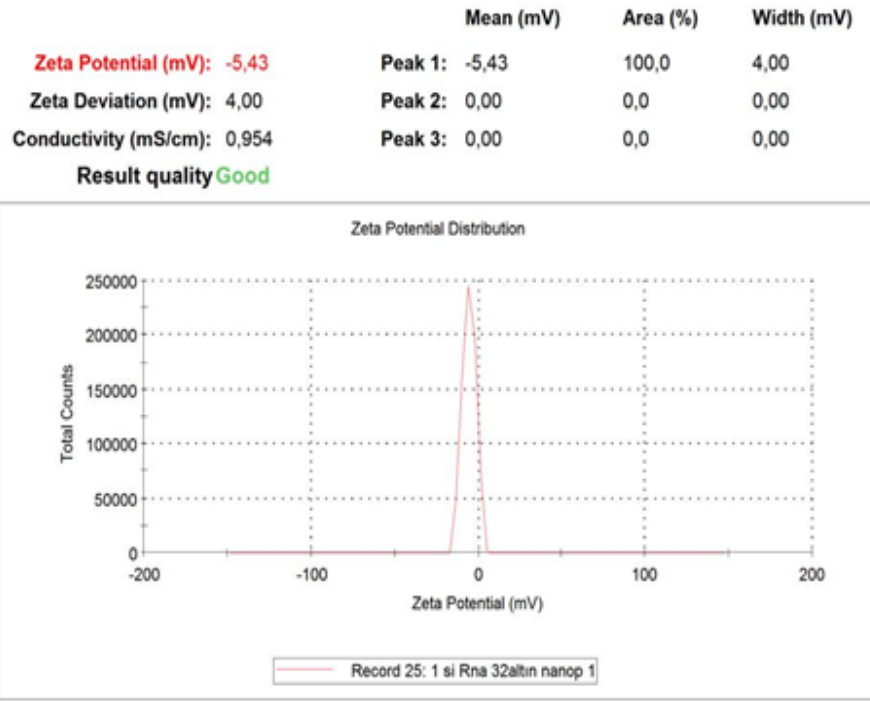
Şekil 4.3. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1 μ L siRNA + 4 μ L AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



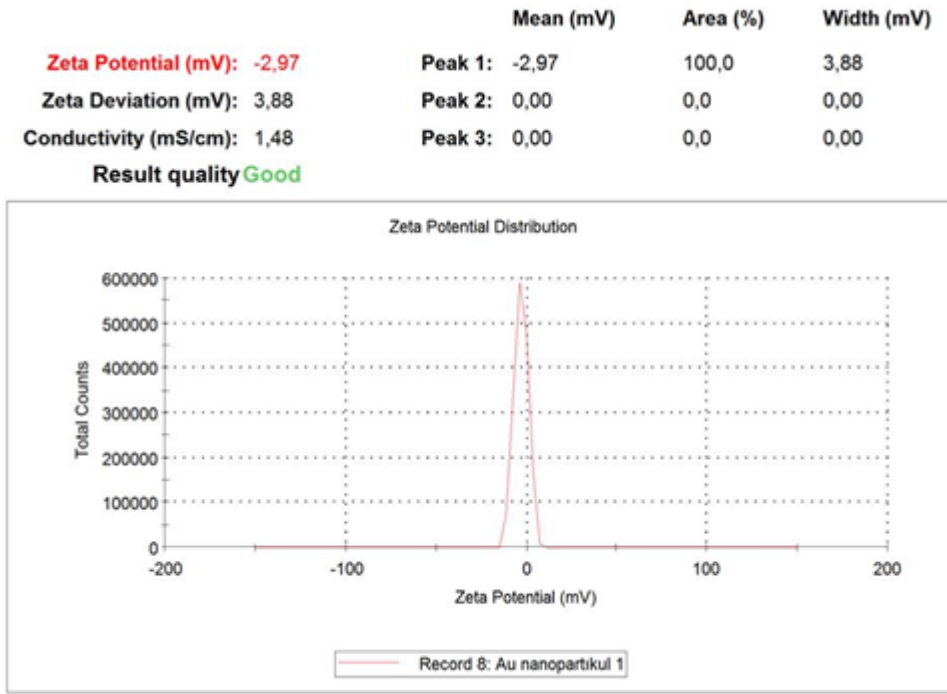
Şekil 4.4. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1 μ L siRNA + 8 μ L AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



Şekil 4.5. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1 μ L siRNA + 16 μ L AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



Şekil 4.6. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş 1µL siRNA + 32µL AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği



Şekil 4.7. Zeta Potansiyel analizi ile elde edilmiş AuNP'nin yüzey yükü dağılım grafiği

AuNP'nin zeta potansiyellerinin yani yüzey yükünün hesaplanması için zeta-sizer cihazından yararlanılmıştır.

Grafikler incelendiğinde ise sentezlenen AuNP'ün yüzey yükü analiz sonuçlarına bakıldığında -2.97mV'luk ve negatif yüzey yüklerine sahip oldukları görülmektedir.

Nanopartikül + siRNA'ların ise; 1µL siRNA +1µL AuNP'nin -8.78 mV'luk, 1µL siRNA + 2µL AuNP'nin -6,09 mV'luk, 1µL siRNA + 4µL AuNP'nin -5.23 mV'luk, 1µL siRNA + 8µL AuNP'nin -4.83 mV'luk, 1µL siRNA + 16µL AuNP'nin -7.04 mV'luk, 1µL siRNA + 32µL AuNP'nin -5.43 mV'luk gibi daha negatif bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir.

4.2. siRNA İle Nanopartiküllerin Etkileşimlerinin Agaroz Jel Elektrofrez Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu kısımda sentezlediğimiz nanopartiküller ile siRNA'ların etkileşime

girdiklerini belirlemek amacı ile agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. SiRNA'ların ve nanopartiküllerin negatif yüklerinden yararlanılarak, etkileşime sokulan bu iki grup kuyucuklara yüklendi ve elektroforez yöntemi başlatıldı. Başlatıldıktan sonra ilk altı kuyucuğa farklı dozlarda siRNA + Nanopartikül kompleksi, yedinci kuyucuğa sadece hazırlanan nanopartikül ve altta görülen sekizinci kuyucuğa ise sadece siRNA eklendi. Negatif yüke sahip olan karışımların hepsinin jelde ters yöne doğru yürüdüğü görüldü. Anyonik olan siRNA molekülü ile anyonik olan nanopartiküller etkileşime sokulduğu için onlarında elektriksel alanda hareket ettikleri gözlemlenebildi. Bu sayede Nanopartikül + siRNA kompleks oluşturma kapasitesi jel elektroforez yöntemi ile ölçülebildi.



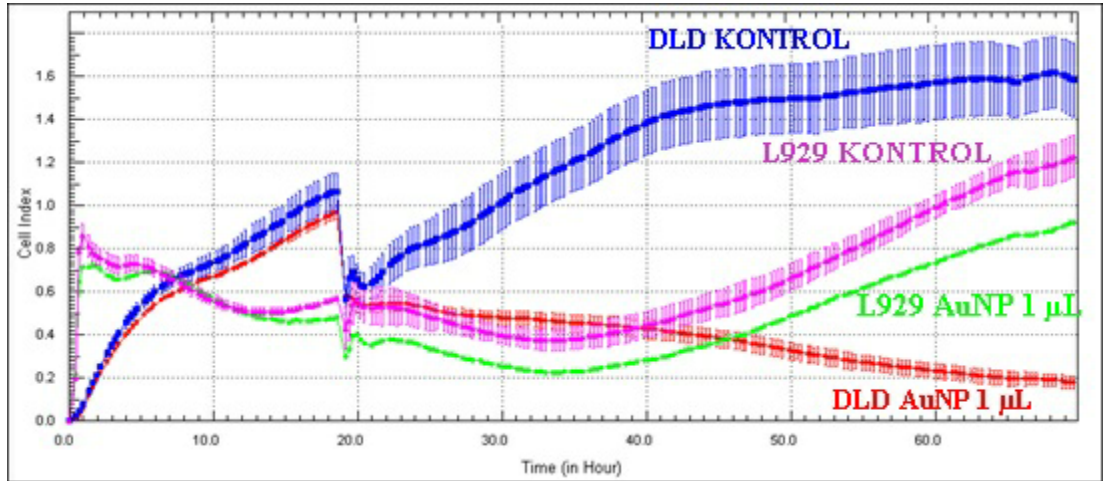
Şekil 4.8. Agaroz jel elektorforezinde yürütülen yalnızca AuNP, yalnızca siRNA ve AuNP+siRNA kompleksinin görüntüsü (A=1 μ L siRNA +1 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, B=1 μ L siRNA +2 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, C=1 μ L siRNA +4 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, D=1 μ L siRNA +8 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, E= 1 μ L siRNA +16 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilerme, F=1 μ L siRNA

+32 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilterme, G= Yalnızca 1 μ L AuNP konulan kuyucuktaki ilterme, H= Yalnızca 1 μ L siRNA konulan kuyucuktaki ilterme gözlemlenmiştir.)

4.3. Hücre poliferasyonunun xCELLigence RTCA İle Belirlenmesi

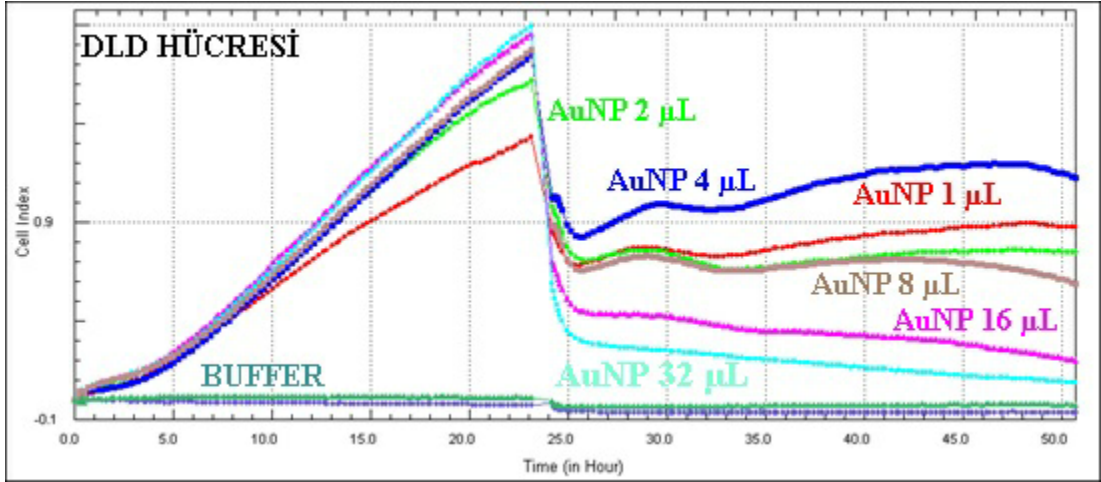
4.3.1. Nanopartiküllerin Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Hücrelerin zamana bağlı olarak çoğalmalarını kesintisiz bir şekilde izlemek ve hücre kültürlerine nanopartiküllerin etkisini gözlemleyebilmek için xCELLigence RTCA sisteminden yararlanılmıştır. Bu çalışmamızda sentezlenen nanopartiküllerin DLD ve L929 hücreleri üzerindeki etkileri 50 saat süreyle xCELLigence RTCA cihazı ile gerçek zamanlı empedans şeklinde ayarlanıp inceleme yapıldı. Bunun için farklı konsantrasyonlardaki AuNP'leri (1 μ L, 2 μ L, 4 μ L, 8 μ L, 16 μ L, 32 μ L) DLD ve L929 hücrelerine uygulandı. Hücrelerin 50 saat süreyle poliferasyonlarına bakıldı ve sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.9. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak 1 μ L AuNP'e karşı DLD ve L929 hücrelerindeki poliferasyon değişiminin gösterilmesi
DLD hücrelerine AuNP 1 μ L uygulandığında hücre yoğunluğunda büyük

bir azalma görülmektedir. DLD hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir. L929 hücresi poliferasyonuna AuNP 1 μ L uygulanmış halinde ve L929 hücrelerinin kontrolünde hücrelerde artış gözlemlenmiştir.

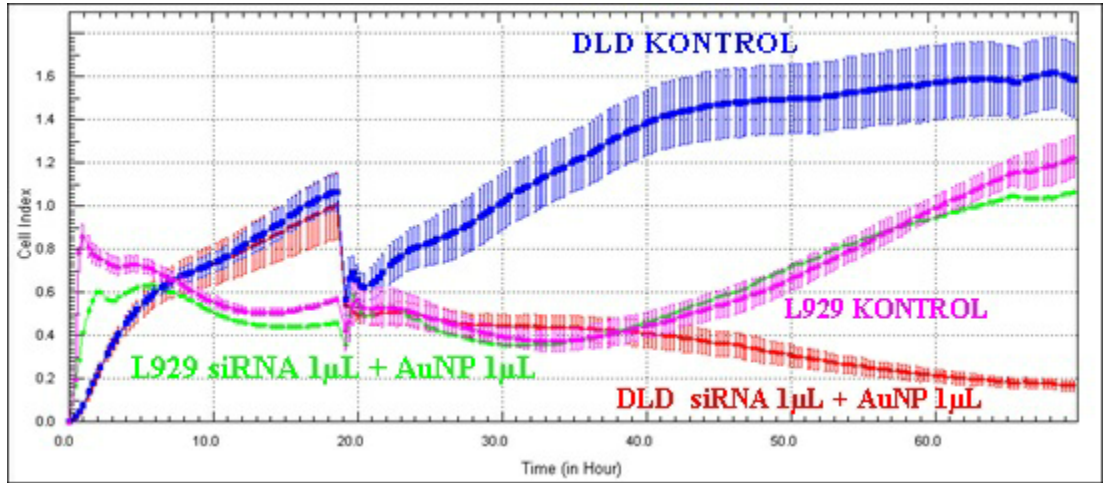


Şekil 4.10. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD hücrelerine uygulanan farklı derişimlerdeki AuNP'lerin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

AuNP 1 μ L, AuNP 2 μ L, AuNP 4 μ L, AuNP 8 μ L, AuNP 16 μ L, AuNP 32 μ L uygulanmış halleri DLD hücrelerinin indeks eğrisinde düşüşe yol açtığı görülmektedir. Doz arttırıldıkça hücre poliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir.

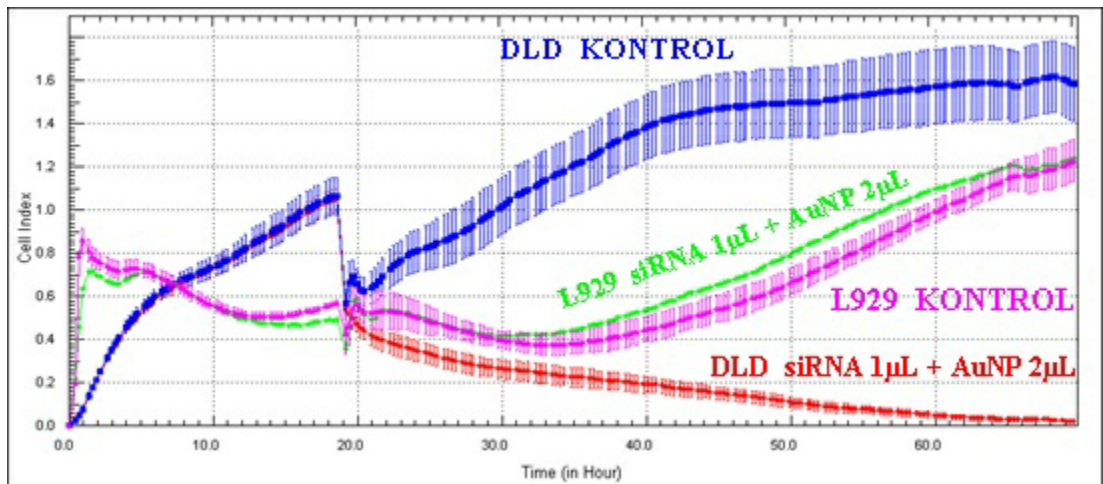
4.3.2. Nanopartikül + siRNA kompleksinin Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Bu kısımda DLD ve L929 hücre hatlarına nanopartikül + siRNA kompleksleri uygulanarak hücre poliferasyon eğrilerine bakıldı. İkili kombine hallerinin etkilerinin incelenmesi için xCELLigence RTCA sistemi kullanıldı.



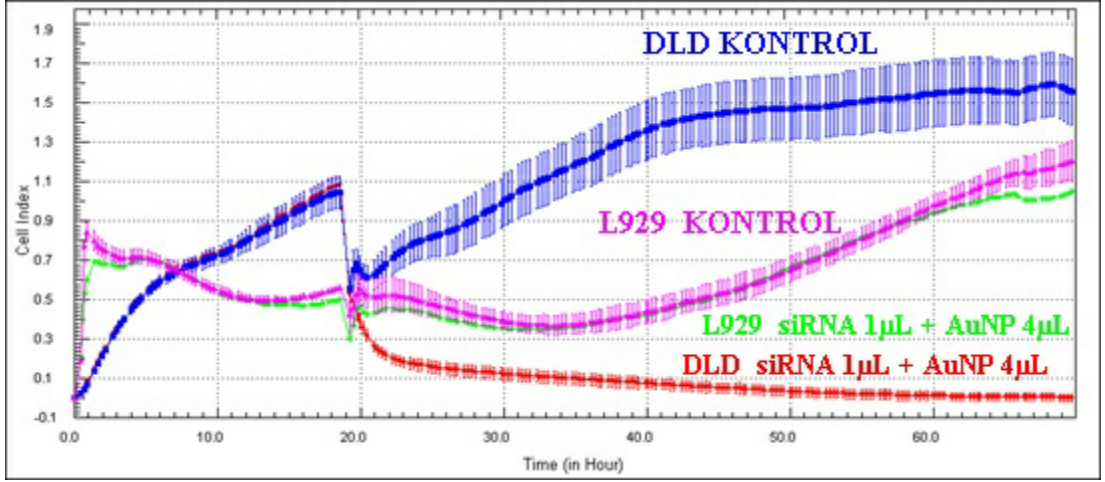
Şekil 4.11. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 1µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1µL + AuNP 1µL uygulandığında hücre yoğunluğunda azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.



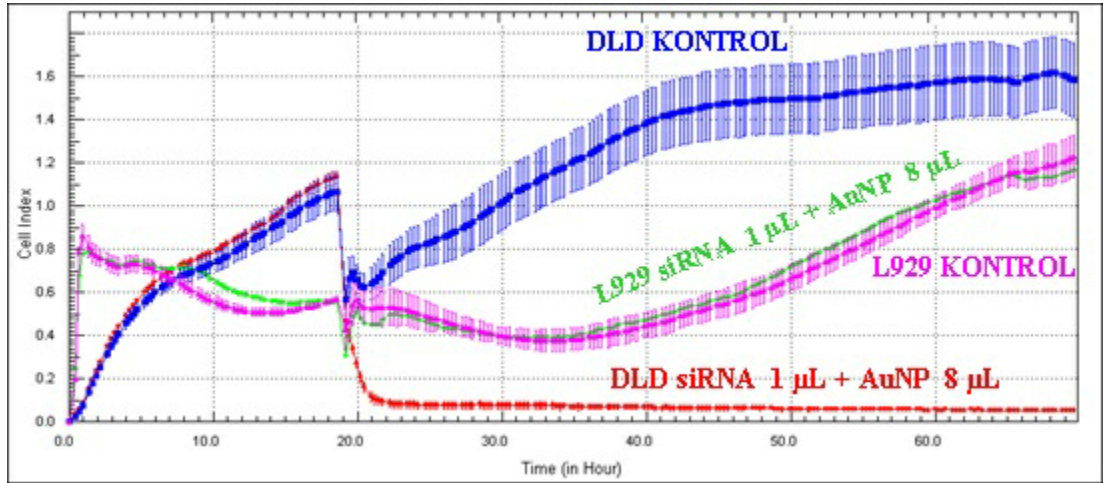
Şekil 4.12. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 2µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1 μ L + AuNP 2 μ L uygulandığında hücre yoğunluğunda azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.



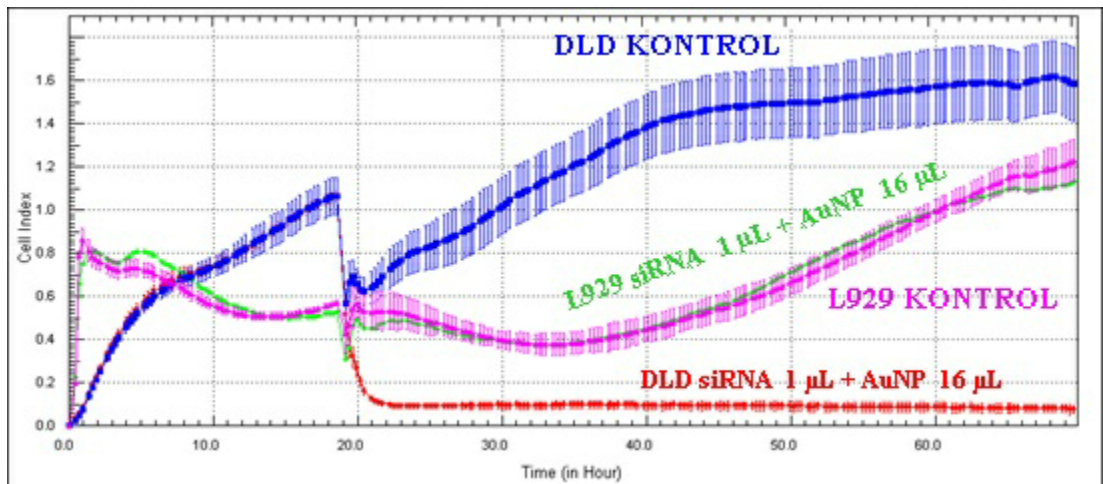
Şekil 4.13. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 μ L + AuNP 4 μ L kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1 μ L + AuNP 4 μ L uygulandığında hücre yoğunluğunda anlamlı azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.



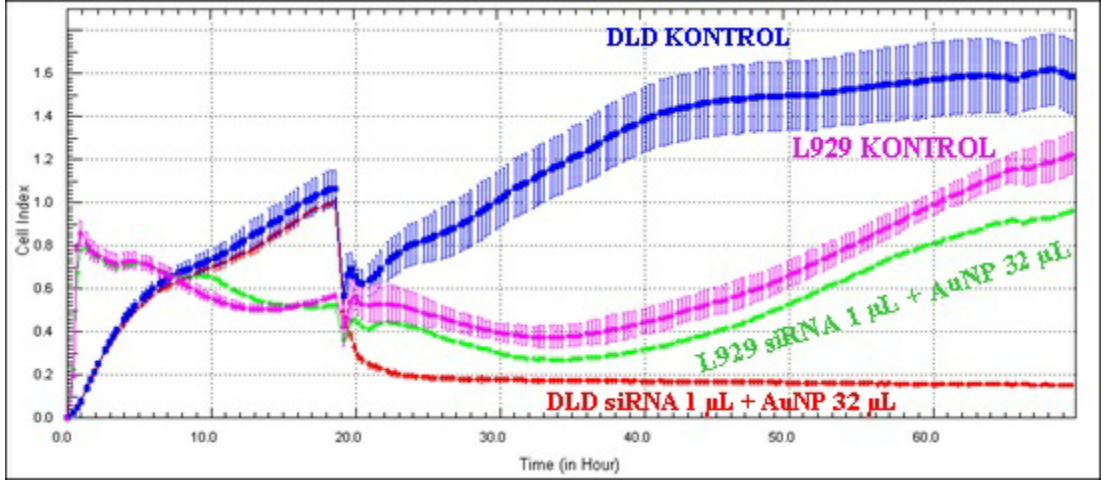
Şekil 4.14. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 8µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1µL + AuNP 8µL uygulandığında hücre yoğunluğunda fazla bir azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.



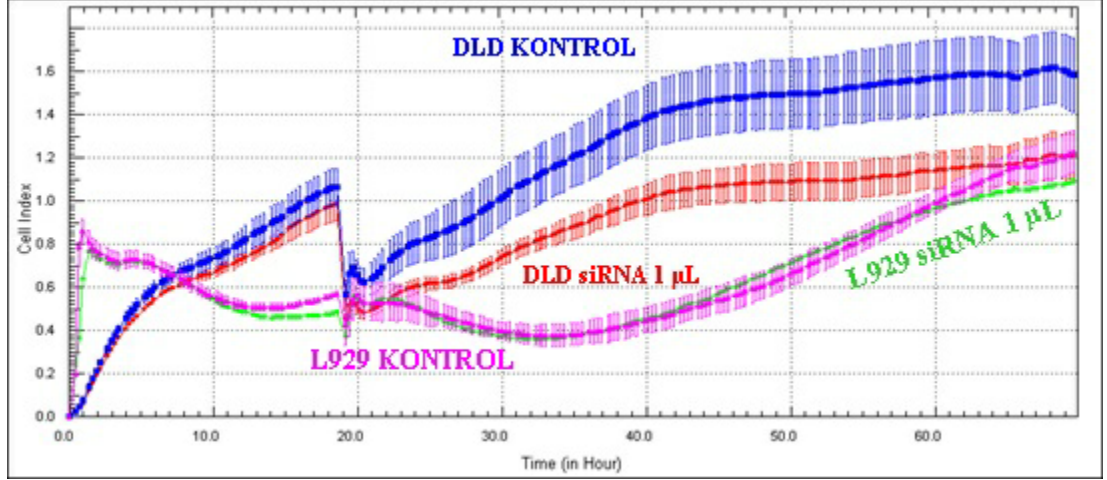
Şekil 4.15. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1µL + AuNP 16µL kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1 μ L + AuNP 16 μ L uygulandığında hücre yoğunluğunda fazla bir azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.



Şekil 4.16. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L kompleksinin hücrelerdeki proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hatlarına siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L uygulandığında hücre yoğunluğunda anlamlı azalma görülmektedir. Fakat; L929 hücre hattında anlamlı bir azalma görülmemiştir. DLD ve L929 hücrelerinin kontrolünde ise yoğun bir artış görülmektedir.

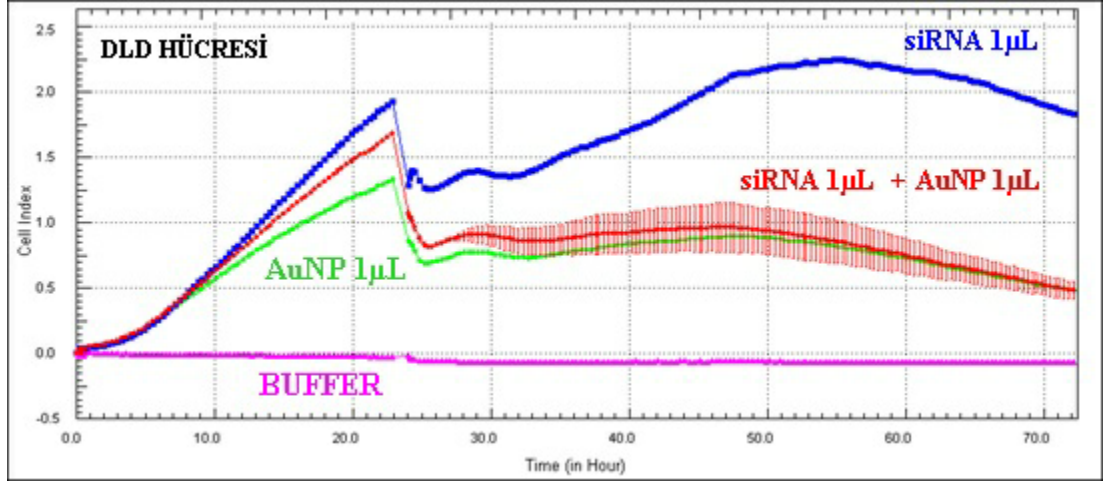


Şekil 4.17. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD ve L929 hücre hatlarına uygulanan siRNA 1 µL hücre proliferatif etkisinin gösterilmesi

DLD ve L929 hücrelerinin kontrol gruplarındaki proliferatif yükselmeyi gösterilmektedir. DLD hücrelerine uygulanan siRNA'nın 1µL'lik dozuna karşılık hücre poliferasyonunda azalma göstermektedir. Fakat L929 hücrelerine uygulanan siRNA'nın 1µL'lik dozuna karşılık hücre poliferasyonunda azalma gözlenmemiştir.

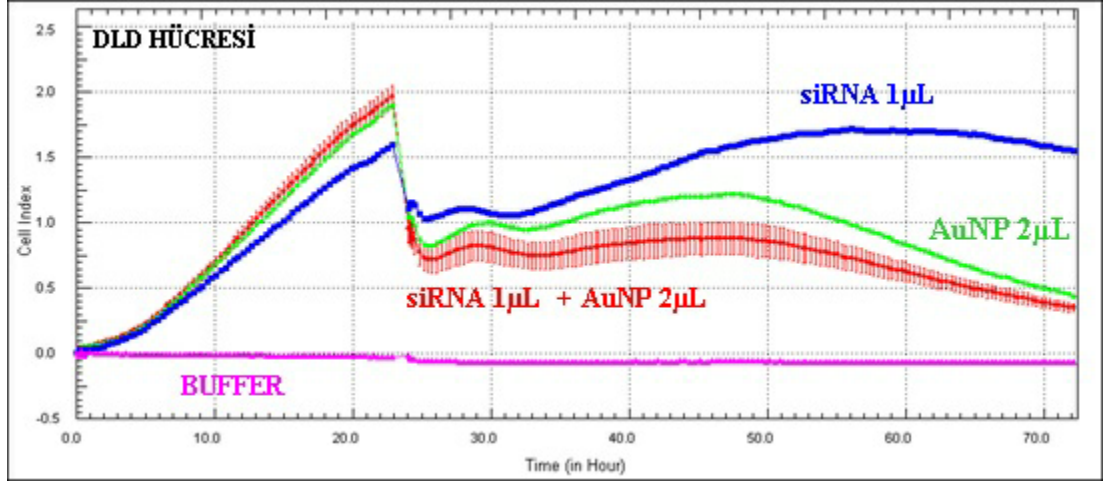
4.3.3. Nanopartikül + siRNA kompleksi, Serbest Haldeki AuNP ve siRNAların Hücreler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmamızın bu kısmında DLD ve L929 hücrelerine uygulanan serbest siRNA ve nanopartiküllerinin kompleks oluşturmuş hallerine göre hücre poliferasyonlarında küçük azalmalar olduğu gözlemlenmiştir.



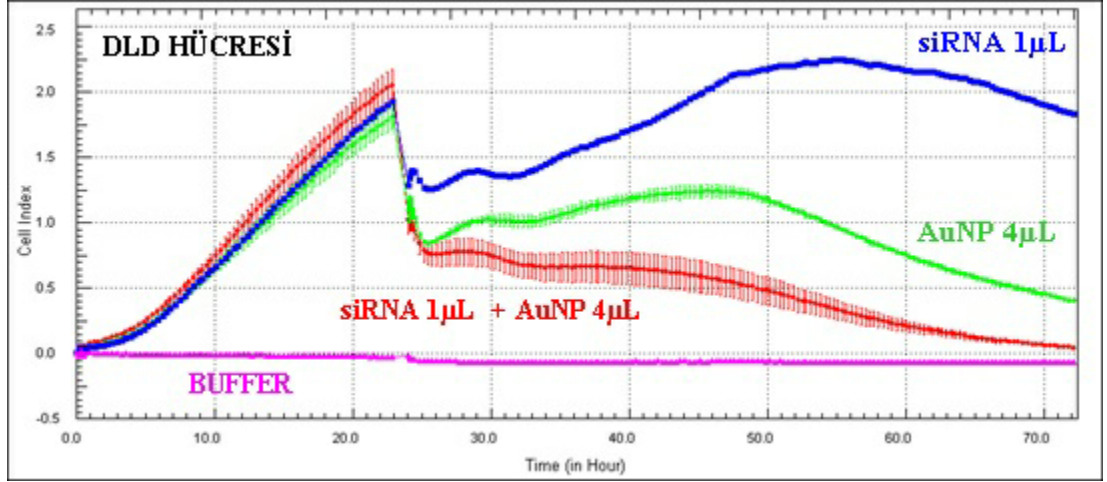
Şekil 4.18. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1µL, sadece AuNP 1µL ve siRNA 1µL + AuNP 1µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP1 µL ve siRNA 1µL + AuNP 1µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre poliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat siRNA 1µL + AuNP 1µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiş yani tümör hücre poliferasyonunu anlamlı oranda azaltmıştır



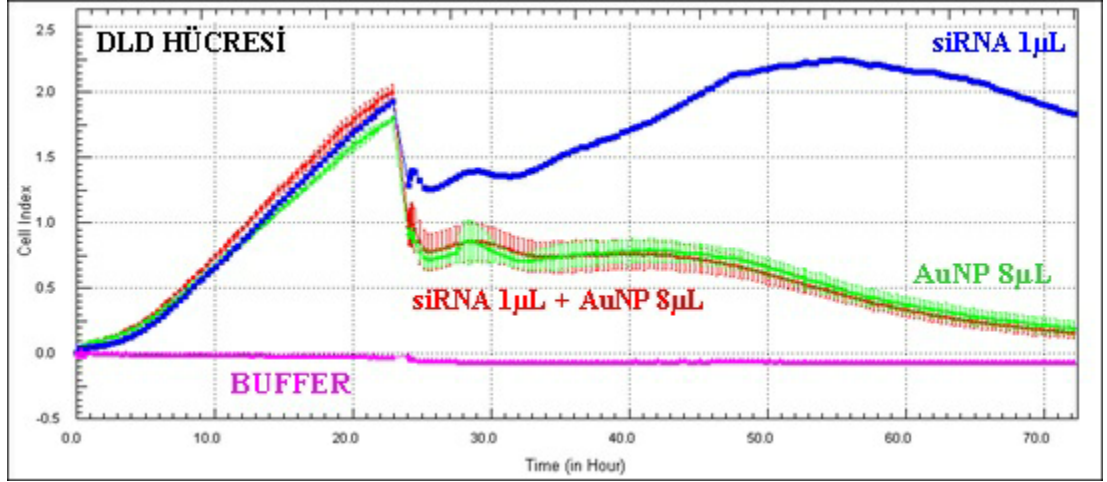
Şekil 4.19. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1µL, sadece AuNP 2µL ve siRNA 1µL + AuNP 2µL kompleksi uygulandığındaki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP1 µL ve siRNA 1µL + AuNP 2µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre poliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat siRNA 1µL + AuNP 2µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiş yani tümör hücre poliferasyonunu anlamlı oranda azaltmıştır.



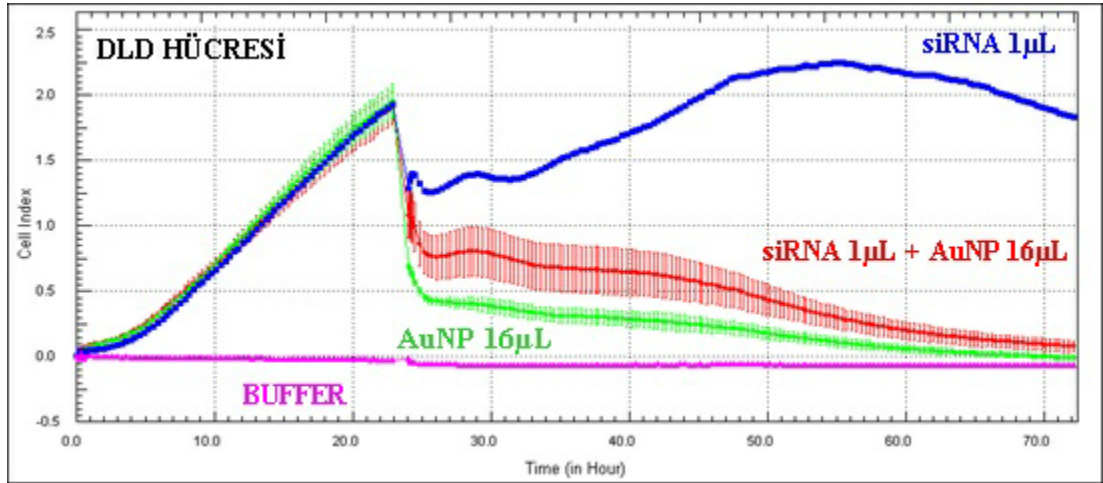
Şekil 4.20. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1µL, sadece AuNP 4µL ve siRNA 1µL + AuNP 4µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP1 µL ve siRNA 1µL + AuNP 4µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre poliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat siRNA 1µL + AuNP 4µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiş yani tümör hücre poliferasyonunu anlamlı oranda azaltmıştır.



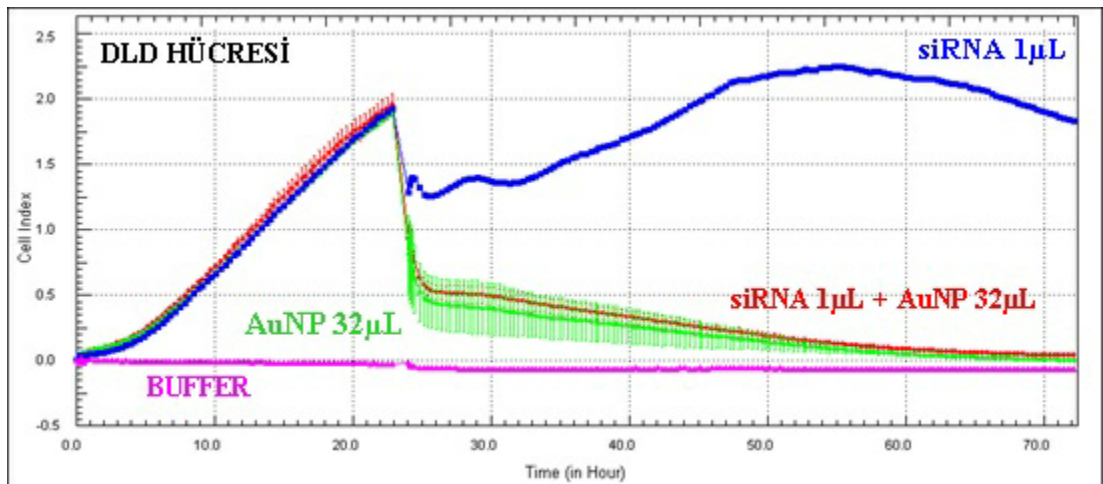
Şekil 4.21. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1µL, sadece AuNP 8µL ve siRNA 1µL + AuNP 8µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP1 µL ve siRNA 1µL + AuNP 8µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre poliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat siRNA 1µL + AuNP 8µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiş yani tümör hücre poliferasyonunu anlamlı oranda azaltmıştır.



Şekil 4.22. Gerçek zamanlı xCELLigence cihazı kullanılarak DLD Hücre hattına sadece siRNA 1µL, sadece AuNP 16µL ve siRNA 1µL + AuNP 16µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP 16µL ve siRNA 1µL + AuNP 16µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre poliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat siRNA 1µL + AuNP 16µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiştir.



Şekil 4.23. Gerçek zamanlı xCELLigence'de DLD Hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP 32µL ve siRNA 1µL + AuNP 32µL kompleksi uygulandığında ki proliferasyon etkisinin gösterilmesi

DLD hücre hattına ayrı ayrı siRNA 1µL, AuNP 32µL ve siRNA 1µL + AuNP 32µL uygulandığında hücre yoğunluğundaki azalma görülmektedir. 1µL siRNA'nın DLD hücre proliferasyonuna etkisi tek başına çok azdır. Fakat; siRNA 1µL + AuNP 32µL kompleksinin etkisi hepsine göre daha fazla azalma göstermiştir.

4.4. İkili Boyama İle Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

İkili boyama metodunda kullanılan Hoechst 33342 floresan boyası canlı hücrelerin zarlarından geçer ve bu boya ile apoptoza giren hücrelerin çekirdekleri normal hücrelere göre daha parlak, mavi renkte görülmektedir. Çekirdeğin homojenliği kaybolmuş ve kenarları düzgün olan yapısını kaybetmiştir. DNA sı parçalanmış haldedir. Floresans mikroskopunda DAPI filtresi ile bakılır. Normal hücrelerin çekirdekleri apoptoza uğrayan hücreler gibi parlak değildir ve hücrelerin DNA'ları çekirdeklerinde dağılmamış bir halde durmaktadır. Bu çalışmamızda 570 nm dalga boyunda inceleme yapılmıştır.

Çalışmamızın bu kısmında DLD ve L929 hücre hatlarına nanopartikül (1µL, 2µL, 4µL, 8µL, 16µL, 32µL) ve nanopartikül + siRNA kompleksinden de belirli oranda uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu 24 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerde olası apoptotik sonuçlar incelendi. Floresan inverted mikroskop ve DAPI filtresi ile görüntüler çekildi.

İkili boyamada kullanılan diğer bir boya olan Propodiyum iyodid (PI) floresan boyası olup DLD ve L929 hücrelerindeki nekrotik etkiyi tespit etmektedir. Bu boya plazma membranındaki hasarlardan veya ölü hücrelerin zarlarından geçerek nekrotik hücre çekirdeklerini boyar. PI floresan ışık altında FITC filtresi ile hücre çekirdeklerinin kırmızı görünmesini sağlar. Nekrotik olmayan hücrelerin hücre membranlarında bir hasar olmadığı için bu boya hücre zarından geçemez bu yüzden nekrotik olmayan hücrenin boyanması engellenmiş olur. Canlı ve apoptotik hücreler FITC floresan filtresinde yeşil olarak görünmektedir. Yaptığımız çalışmamızda 570 nm dalga boyunda inceleme yapılmıştır.

Çalışmamızın bu kısmında DLD ve L929 hücre hatlarına nanopartikül (1µL, 2µL, 4µL, 8µL, 16µL, 32µL) ve AuNP + siRNA kompleksinden de belirli oranda uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu 24 saatlik inkübasyon sonrası

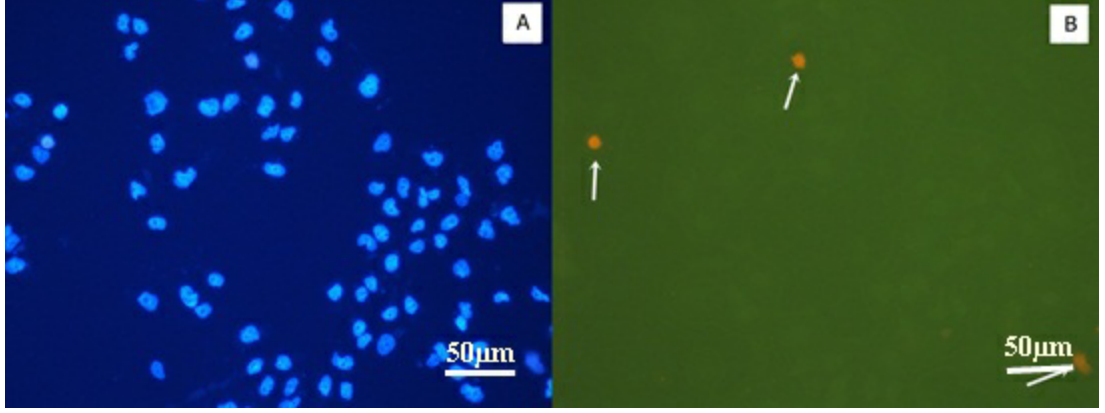
hücrelerde olası apoptotik ve nekrotik sonuçlar incelendi. Floresan inverted mikroskop ve FITC filtresi ile görüntüler çekildi.

DLD hücresine AuNP 1 L uygulandıktan sonraki apoptoz oranı 5,53 1,09 iken 8 L uygulandığında 58,2 5,780423 çıkmıştır. 32 L’de ise apoptotik hücre proliferasyonu  o almı tır. siRNA 1 L + AuNPs 1 L uygulandıktan sonraki apoptoz oranı 2,21 0,007 iken siRNA 1 L + AuNPs 8 L uygulandığında 13,34 2,414267 çıkmıştır. . siRNA 1 L + AuNPs 32 L ise apoptotik hücre proliferasyonunda oldukça artış görülmüştür.

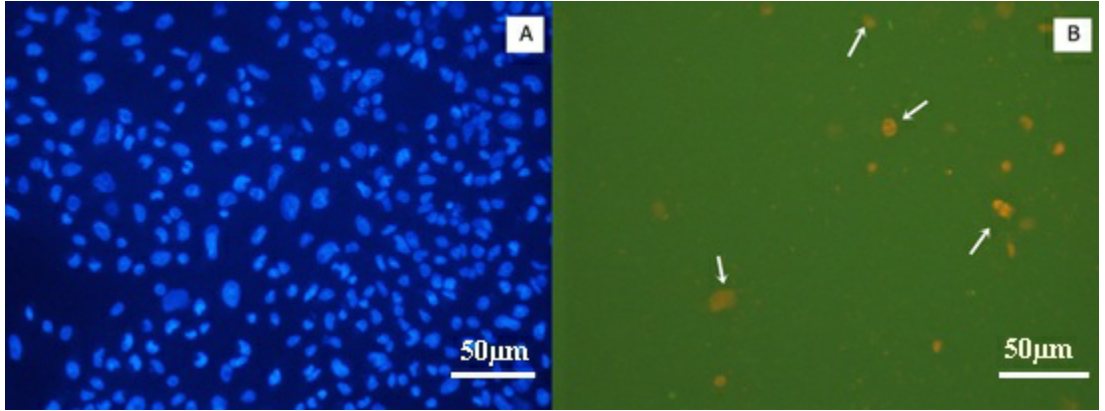
DLD hücresine AuNP 1 L uygulandıktan sonraki nekroz oranı 6,8 2,5 iken 8 L uygulandığında 94,4 25,45586 çıkmıştır. 16 L’de ise tamamen nekrotik hale gelmiştir. siRNA 1 L + AuNPs 1 L uygulandıktan sonraki nekroz oranı 4,1 3 iken siRNA 1 L + AuNPs 8 L uygulandığında 16,39 4,242641 çıkmıştır. siRNA 1 L + AuNPs 32 L ise tamamen nekrotik hale gelmiştir.

Çizelge 4.2. DLD hücrelerindeki apoptotik hücre yüzde oranları

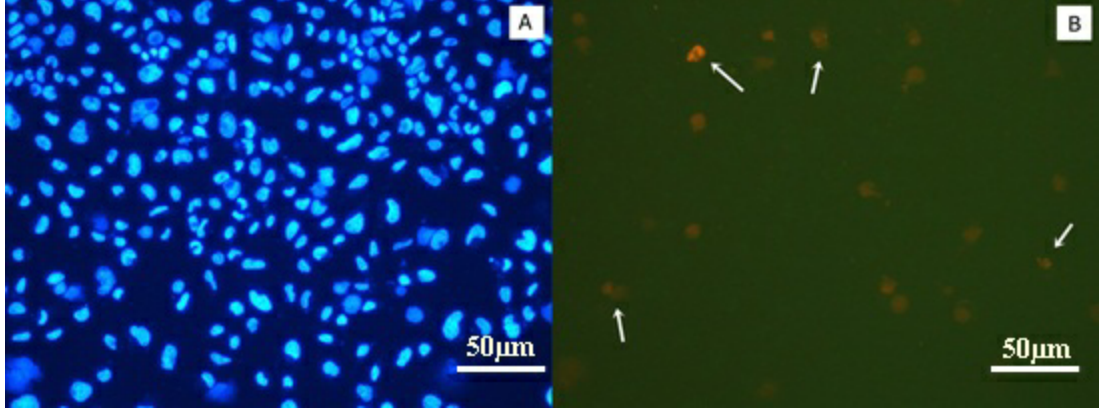
Kontrol		buffer				16,39±4,24	2641	
AuNPs		1µL				5,53±1,09		
		2µL				9,29±0,004		
		4µL				24,91±0,3976		
		8µL				58,2±5,78	0423	
		16µL				79,17±9,28	722	
		32µL				97,15±25,36	363	
siRNA		1µL				3,45±1,75		
AuNPs+siRNA		1µL + 1µL				2,21±0,007		
		1µL + 2µL				3,1±0,002	134	
		1µL + 4µL				8,69±1,36	3961	
		1µL + 8µL				13,34±2,41	4267	
		1µL + 16µL				49,31±0,36	6361	
		1µL + 32µL				77,93±3,58	2571	



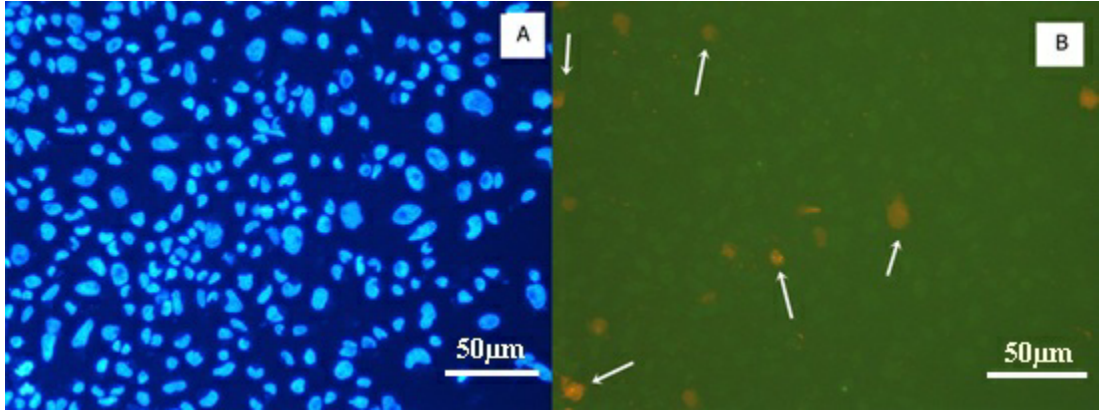
Şekil 4.24. siRNA 1 μ L + AuNP 1 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide); BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



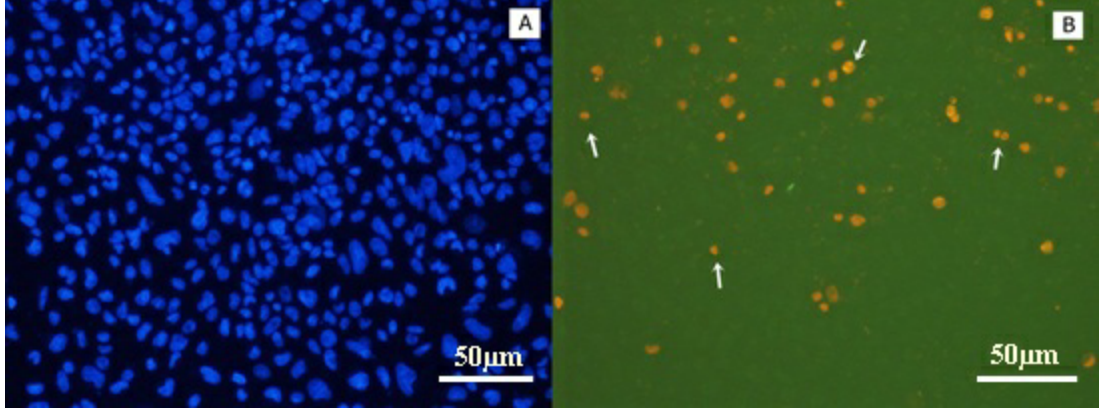
Şekil 4.25. siRNA 1 μ L + AuNP 2 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



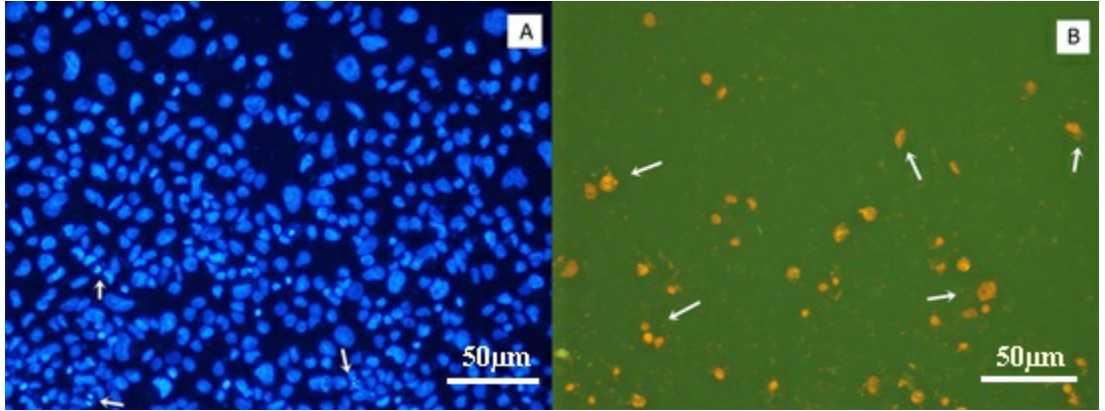
Şekil 4.26. siRNA 1µL + AuNP 4µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



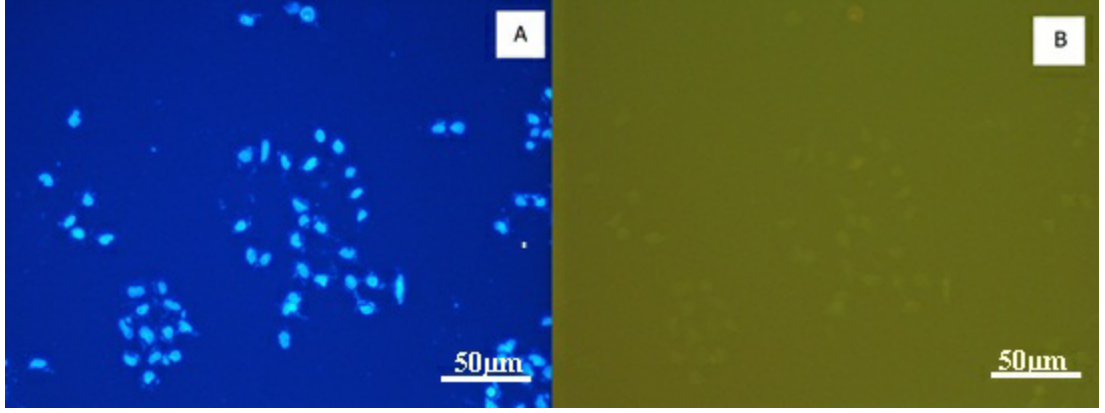
Şekil 4.27. siRNA 1µL + AuNP 8µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



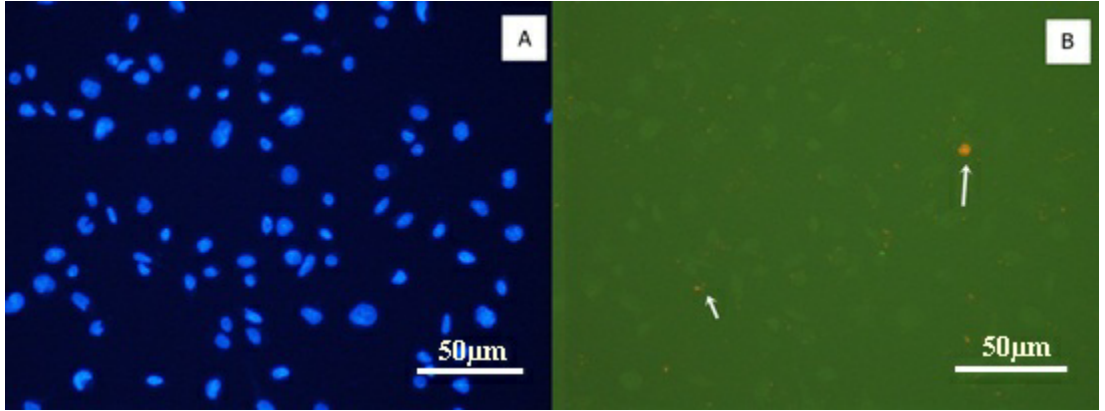
Şekil 4.28. siRNA 1 μ L + AuNP 16 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



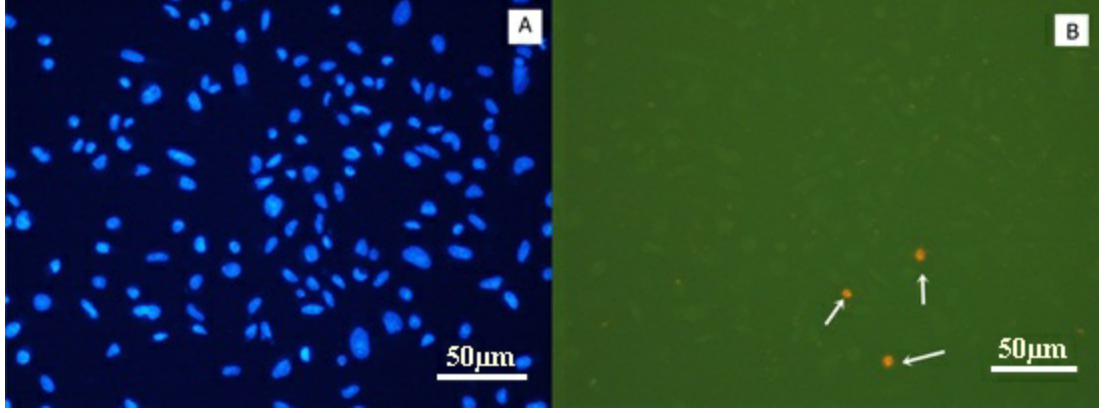
Şekil 4.29. siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



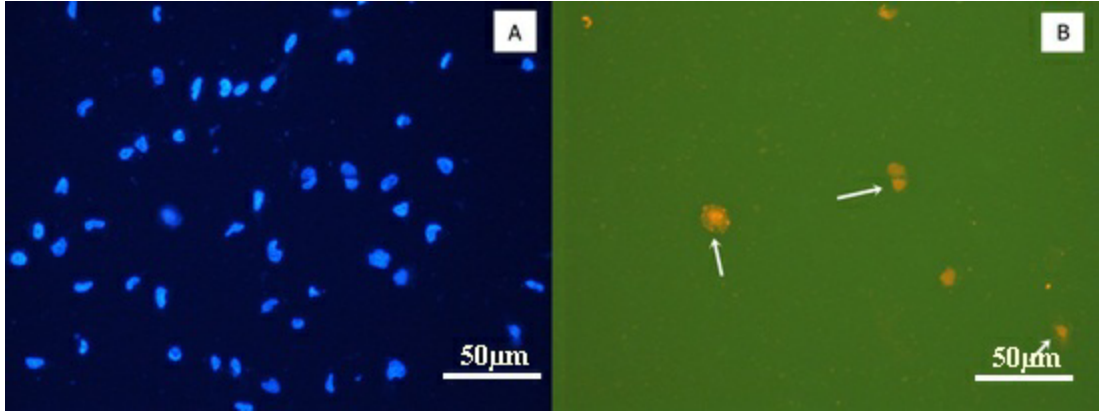
Şekil 4.30 DLD hücrelerinde hiçbir uygulama yapılmadan 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



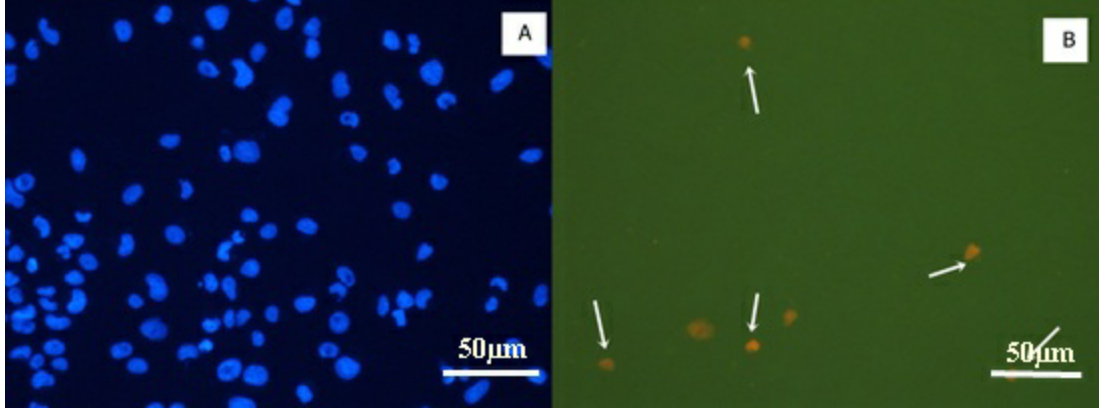
Şekil 4.31. AuNP 1µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



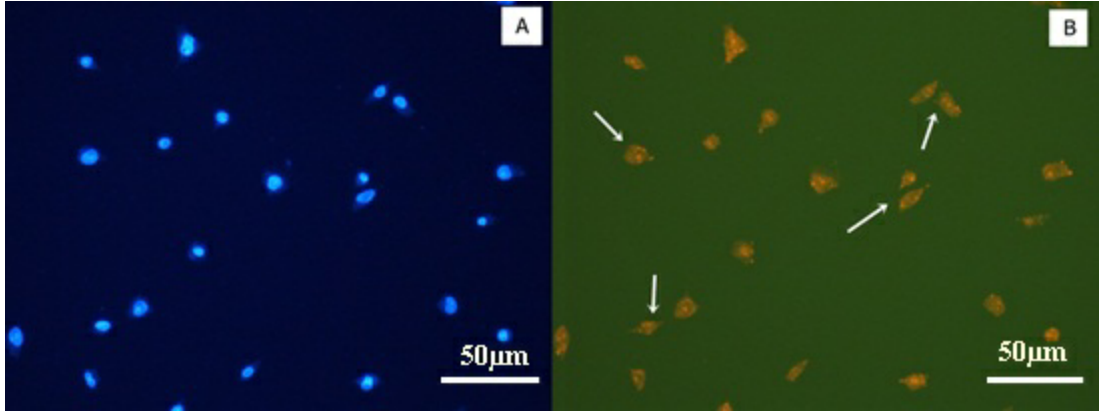
Şekil 4.32. AuNP 2µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



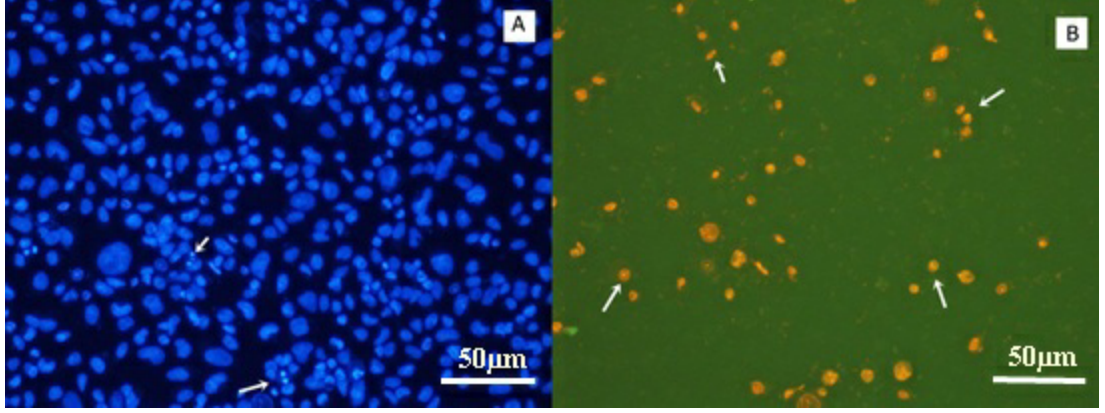
Şekil 4.33. AuNP 4µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



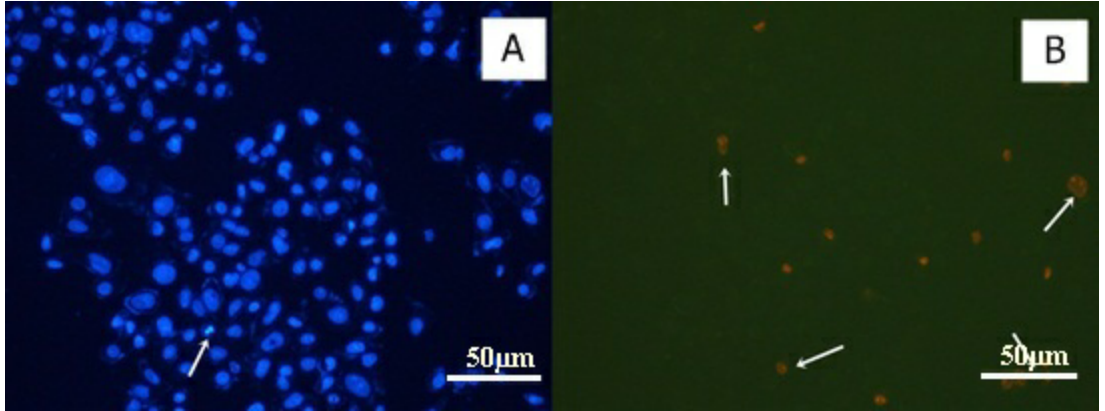
Şekil 4.34. AuNP 8µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.35. AuNP 16µL uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.36. AuNP 32 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



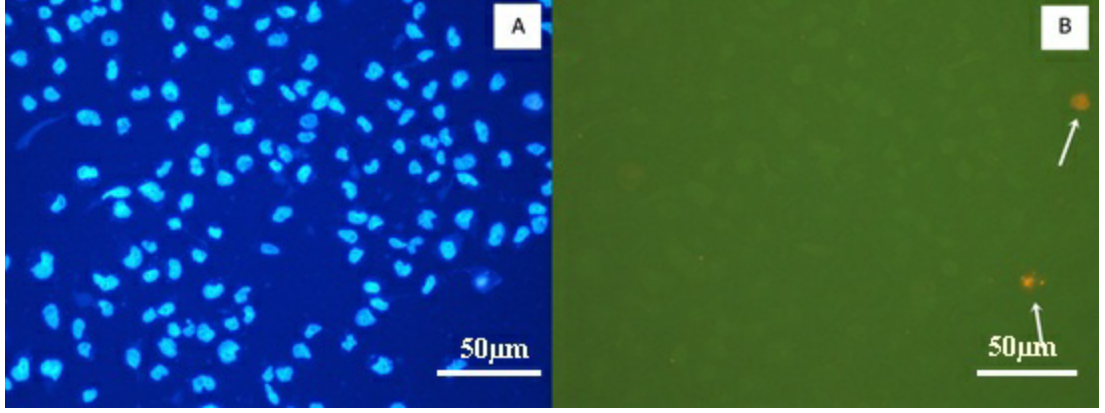
Şekil 4.37. siRNA 1 μ L uygulanan DLD hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.

Görüntüler Leica inverted floresan mikroskobunda 10X de büyütülerek görüntülenmiştir. Ölçek 50 μ m 'lık mesafeyi göstermektedir. Fotoğraflarda görülen siRNA ve AuNP kompleks yapılarının hücre üzerindeki nekrotik etkileri gözlemlenmektedir. Uygulanan kompleks yapı DLD hücrelerinde belli bir doza kadar

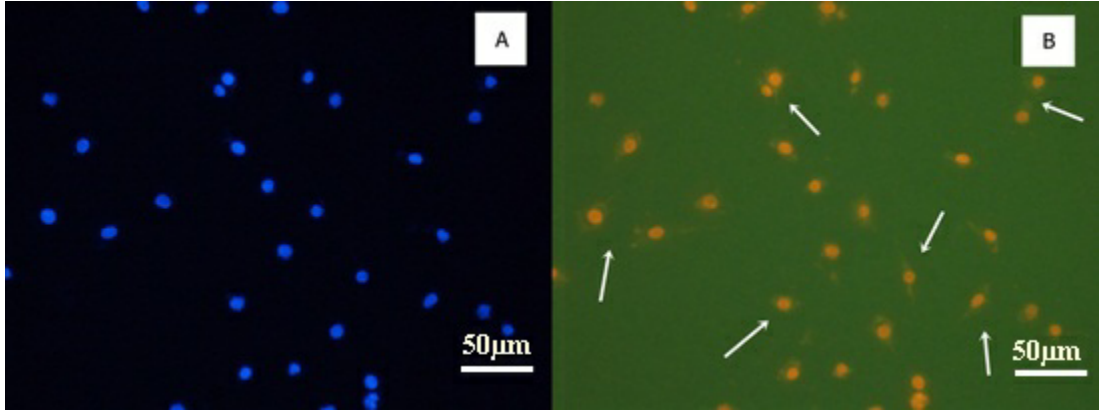
nekrozun arttığı yüksek olan kompleks derişimlerinde ise hedeflenmemiş hedeflenme yaptığı düşünölmektedir.

Çizelge 4.3. DLD hücrelerindeki nekrotik hücre yüzde oranları

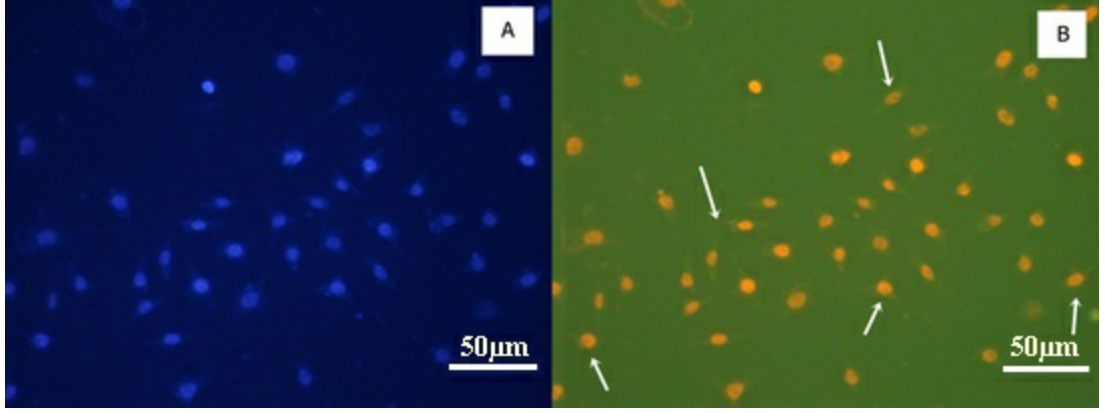
Kontrol	buffer	31,28±38,18377
AuNPs	1µL	6,8±2,5
	2µL	17±0.707107
	4µL	18±4,242641
	8µL	94,4±25,45586
	16µL	100±9,192788
	32µL	100±2,12132
siRNA	1µl	7,2±2,5
siRNA+ AuNPs	1µL + 1µL	4,1±3
	1µL + 2µL	5,9±6,363961
	1µL + 4µL	6,6±1,414214
	1µL + 8µL	16,39±4,242641
	1µL + 16µL	52,94±2,828427
	1µL + 32µL	100±3,535534



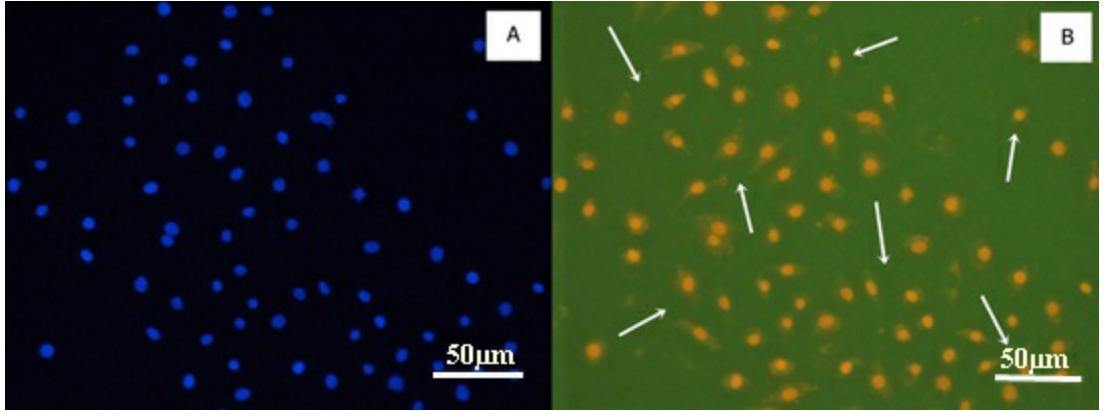
Şekil 4.38. siRNA 1µL + AuNP 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



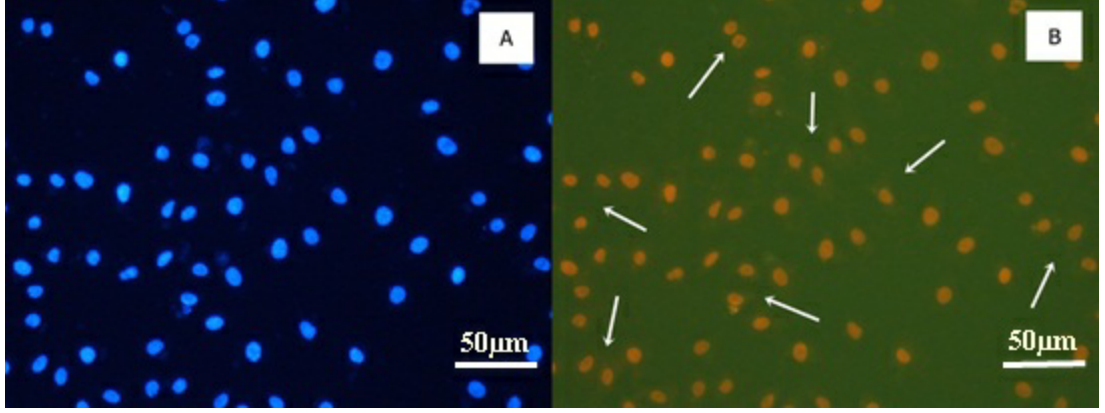
Şekil 4.39. siRNA 1µL + AuNP 2µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



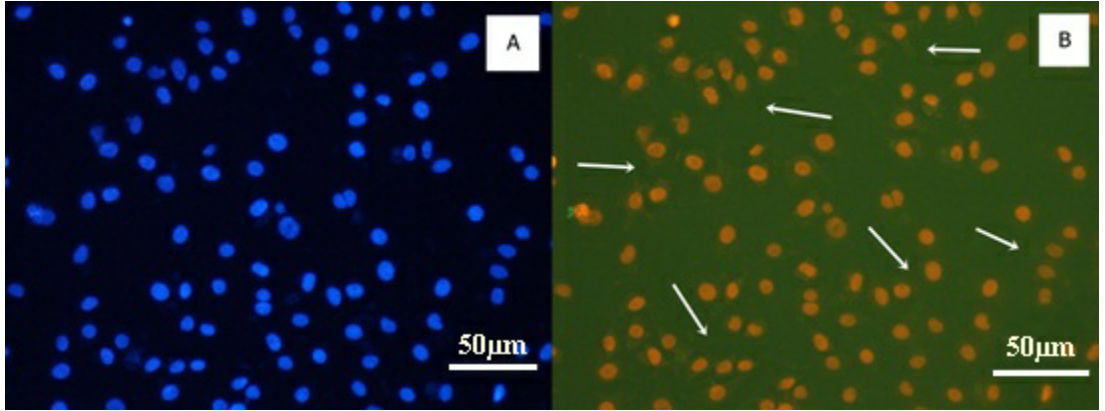
Şekil 4.40. siRNA 4 μ L + AuNP 1 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



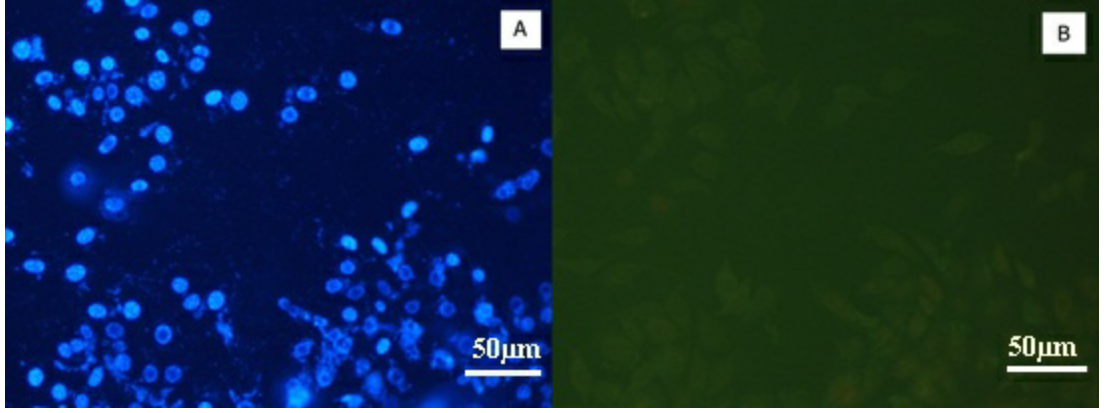
Şekil 4.41. siRNA 1 μ L + AuNP 8 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



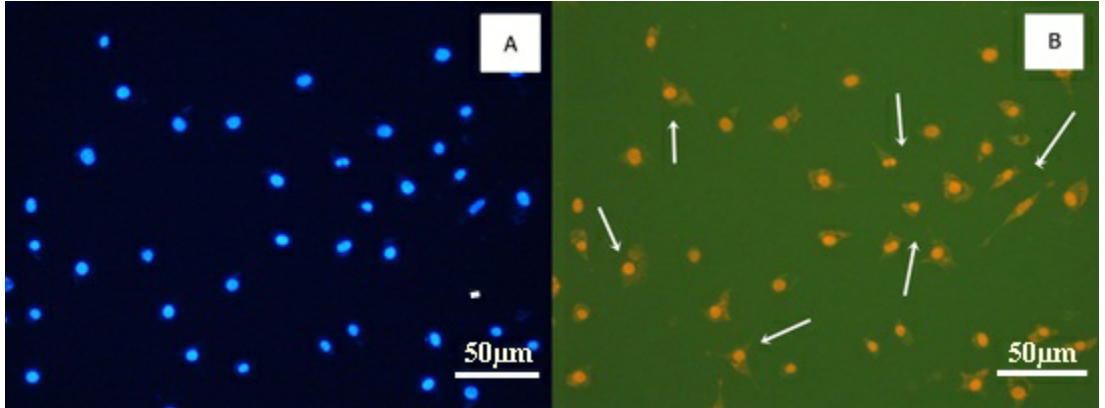
Şekil 4.42. siRNA 1 μ L + AuNP 16 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



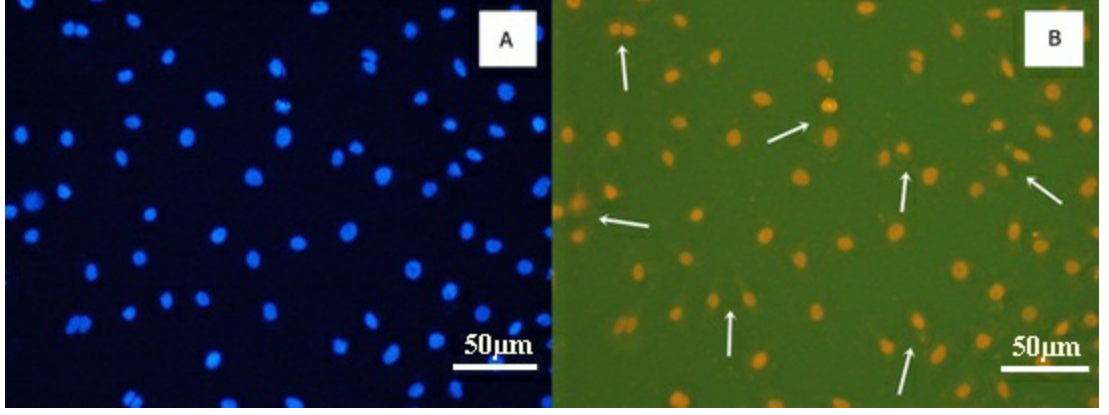
Şekil 4.43. siRNA 1 μ L + AuNP 32 μ L uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50 μ m Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



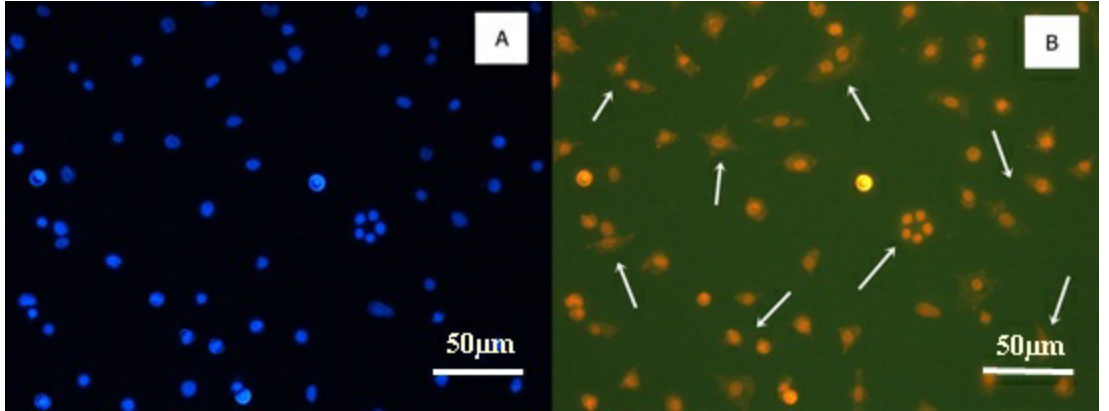
Şekil 4.44. L929 hücrelerinde hiçbir uygulama yapılmadan 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



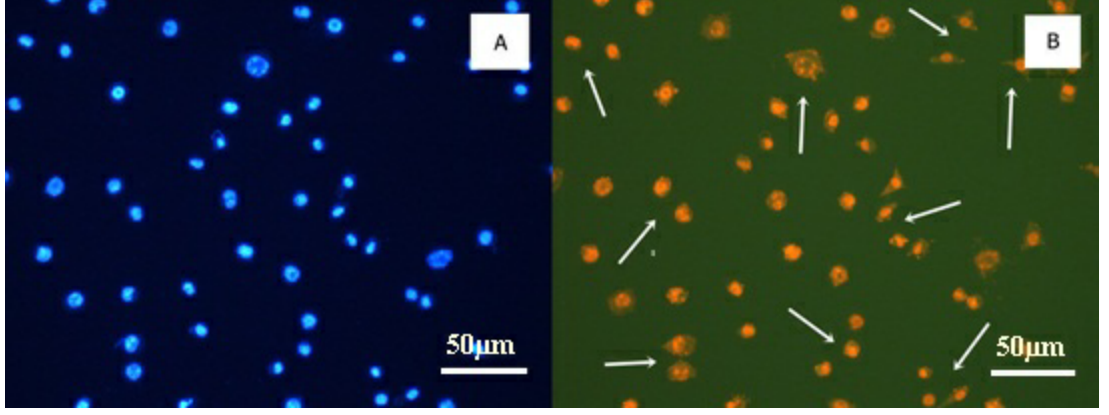
Şekil 4.45. AuNP 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



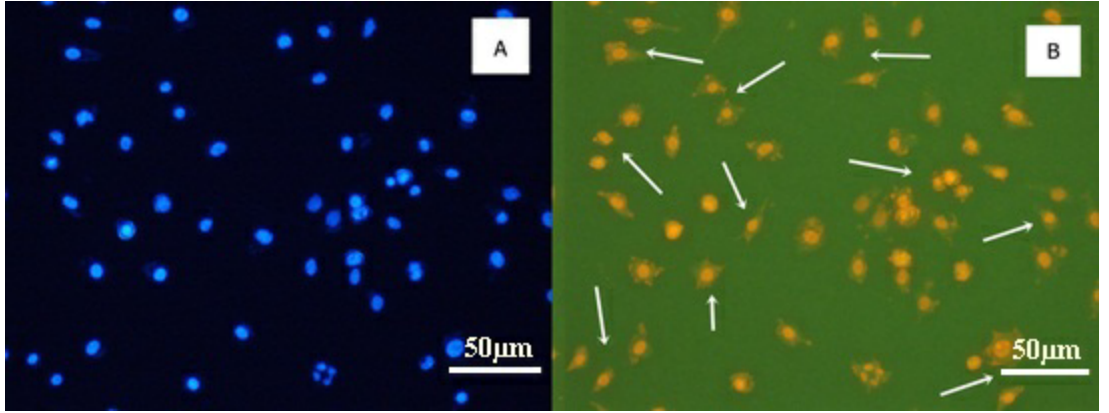
Şekil 4.46. AuNP 2µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



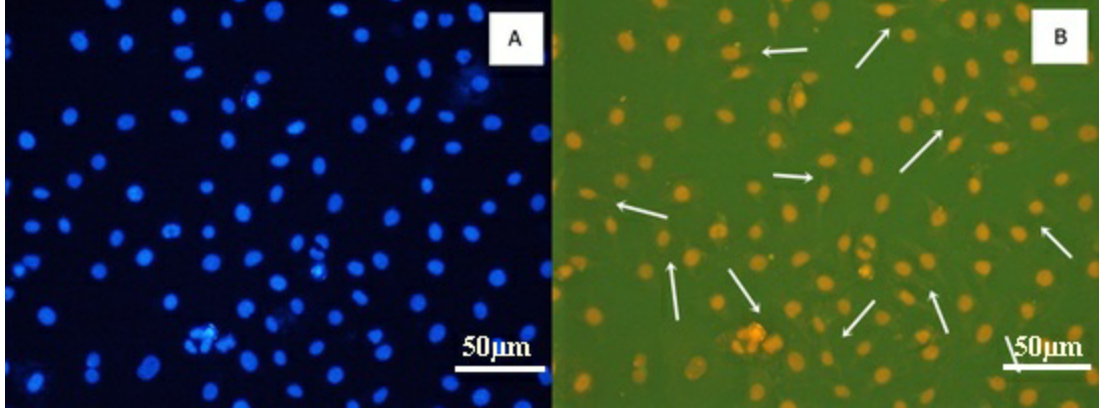
Şekil 4.47. AuNP 4µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



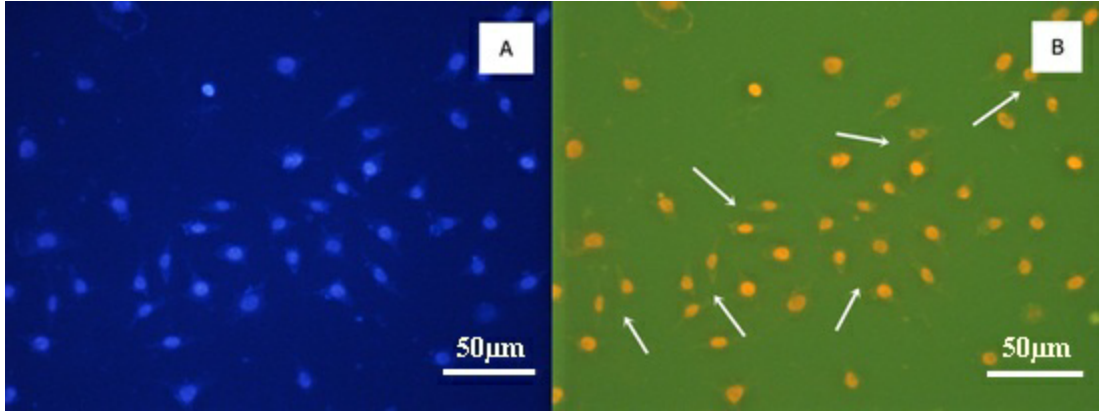
Şekil 4.48. AuNP 8µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.49. AuNP 16µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.50. AuNP 32µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.51. siRNA 1µL uygulanan L929 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan ikili boyama neticesinde elde edilen apoptotik (A) ve nekrotik (B) hücrelerin görüntüsü. İkili boyama (Double staining= Hoechst 33342 + Ribonükleaz A + Propidium iodide) BAR=50µm Leica DM6000 ile görüntülenmiştir.

Görüntüler Leica inverted floresan mikroskopunda 10X de büyütülerek görüntülenmiştir. Ölçek 50 µm ‘lık mesafeyi göstermektedir. Fotoğraflarda görülen siRNA ve AuNP kompleks yapılarının hücre üzerindeki nekrotik etkileri gözlemlenmektedir. Uygulanan kompleks yapı DLD hücrelerinde nekrozun arttığı

göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında kompleks yapının saf AuNP uygulanan grubun DLD hücreleri kontrol grubuna göre üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. siRNA, AuNP'ler tarafından hedeflendirildiğinden dolayı pH ve sıcaklığa duyarlı olan nanopartiküllerin siRNA'ları kontrollü bir şekilde salmasından dolayı bu sonuç gözlenmiştir.

5.SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında elde edilen bulgular ve sonuç özetleri aşağıdaki şekilde sunulmuştur.

Çalışmanın ilk kısmında AuNP'lerinin sentezi yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin Zeta Size potansiyel analizlerine bakılmıştır. Grafikler incelendiğinde ise sentezlenen AuNP'ün yüzey yükü analiz sonuçlarına bakıldığında -2.97mV'luk ve negatif yüzey yüklerine sahip oldukları görülmektedir. Nanopartikül + siRNA'ların ise; 1µL siRNA +1µL AuNP'nin -8.78 mV'luk, 1µL siRNA + 2µL AuNP'nin -6,09 mV'luk, 1µL siRNA + 4µL AuNP'nin -5.23 mV'luk, 1µL siRNA + 8µL AuNP'nin -4.83 mV'luk, 1µL siRNA + 16µL AuNP'nin -7.04 mV'luk, 1µL siRNA + 32µL AuNP'nin -5.43 mV'luk gibi daha negatif bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir. Böylelikle zeta potansiyel analizi ile negatif yüzey yüküne sahip olan nanopartiküllerin negatif yüke sahip olan siRNA ile etkileşime girerek bağlanmaları sağlanmıştır. Sonuçlar zeta-potansiyel analizin siRNA'nın AuNP ile bağlandığında AuNP'lerin negatifliğini artırdığını göstermiştir.

siRNA' nın nanopartikülle olan etkileşimi, agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve farklı dozlardaki nanopartiküllerin derişiminin yüklenme verimliliğine etkisi incelendiğinde denenen tüm siRNA + AuNP oranlarında etkileşim ve bağlanma gerçekleşmiştir. Agaroz jel elektroforezinde yalnızca siRNA konulan kuyucuktaki ilerlemenin yalnızca AuNP konulan kuyucuğa göre; siRNA'nın molekül ağırlığının AuNP'e göre daha az olmasından dolayı fazla ilerlediği gözlemlenmiştir. Yalnızca AuNP ve siRNA + AuNP komplekslerinin bir arada konulduğu kuyucuklar da ise AuNP'nün moleküler ağırlığının daha fazla olmasından dolayı jeldeki yürüme hızını siRNA'ya göre azalttığı gözlemlenmiştir. Eşit miktarlarda konulan preparatların agaroz jel elektroforezdeki yürümelerinde büyük oranda farklılık görülme de hücreler üzerindeki anlamlı etkileri diğer deneyler de gözlemlenmiştir.

Gerçek zamanlı hücre analizine bakıldığında AuNP ve siRNA + AuNP kompleksinin dozları arttıkça hücre proliferasyon grafilerinde buna bağlı azalma gözlemlenmiştir. Sonuç olarak en yüksek antiproliferatif etki siRNA + AuNP kompleksinde gerçekleşmektedir. Bunun sebebi Bcl-2 gen ifadesinin susturulmasıdır. Antiapoptotik olan Bcl-2 proteininin baskılanması tümör hücrelerinin proliferasyonunun inhibe edilmesine neden olur. Bu sayede tümörün büyümesi ve

bölünmesini engellemiş olmaktadır.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla da paralellik göstermektedir. Bunlardan bazıları;

2014 yılında Shehata Draz ve arkadaşlarının yaptığı çalışma manyetik hedeflendirme yaklaşımı hedef alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada Shehata Draz ve arkadaşları manyetik siRNA taşıyıcına bağlı veya taşıyıcıya enkapsüle edilmiş olan terapötik bir ajanın dışarıdan manyetik alan ile intravenöz enjeksiyonu uygulanması ile tümör dokusuna yönelme yapması sağlanmıştır. [42]

2015 yılında Mykhaylyk ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hedeflenen tümör hücresindeki manyetik nanopartikülün siRNA salınımı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hedef hücelere siRNA salınımının ve manyetik alan uygulandığında verdiği cevabın daha iyi olduğu görülmüştür. [43]

Apoptotik ve nekrotik indeksler ikili boyama metoduyla saptandı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında kompleks yapının saf AuNP uygulanan grubun DLD hücreleri kontrol grubuna göre üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. siRNA, AuNP'ler tarafından hedeflendirildiğinden dolayı pH ve sıcaklığa duyarlı olan nanopartiküllerin siRNA'ları kontrollü bir şekilde salmasından dolayı bu sonuç gözlenmiştir. Kontrollü salınan siRNA'ların etkisi serbest haldeki siRNA'lara göre daha uzun sürmektedir. Yapılan uygulama göstermiştir ki siRNA'ların kontrollü bir şekilde salınımı hücrenin Bcl-2 genini baskılandığından hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. [45]

Bcl-2 gen ifadesinin apoptoz engelleyici özelliğinden dolayı kanser gelişimine katkısı büyüktür. Bcl-2'nin baskılanması kanser gelişmesinin yavaşlamasına hatta durmasına ve bu sayede tümör hücre poliferasyonunda inkübasyonuna neden olacaktır. Bu yüzden siRNA'nın hücreye başarılı bir şekilde verilmesi susturma işleminin etkili bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır. [46 - 47]

Elde ettiğimiz xCELLigence RTCA sonuçlarında siRNA'nın nekrotik mekanizmayı da etkilediği açıkça görülmektedir. Kompleks yapının hücre poliferasyonunu azalttığını gözlemlemiştik. PI floresan ışık altında FITC filtresi ile çekilen bu fotoğraflar göstermiştir ki ölümlerin bir kısmı da nekrotik yolak ile gerçekleşmektedir.

2003 yılında Ming Jiang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada

kolorektal kanser hücrelerinde siRNA'nın inaktivasyon gerçekleştirdiği gözlemlenmiş ve Bcl-2'nin bu hücre poliferasyonunda antiapoptotik bir mekanizmayı düzenleyen bir gen olabileceği gösterilmiştir. [48]

Sonuç olarak; AuNP ile aktarılan siRNA'ın kanser tedavisinde olası bir gen terapi yöntemi olabileceği fikri uyanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D., Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacology&Therapeutics*, 99(1), 1-13, **2003**.
- [2] Adami, H.O., Hunter, D., Trichopoulos, D., *Textbook of Cancer Epidemiology*, Oxford University Press, New York, 1st Edition, 301-334, **2002**.
- [3] Atıcı, E., Tıp tarihinde kanser ve lösemi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 197-204, **2007**.
- [4] O. İşler, Primer Prostat Kanserine Bağlı Kaspaz-2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Konya **2012**.
- [5] Anonim, Colloidal gold, Wikiwand
http://www.wikiwand.com/en/Colloidal_gold#/Toxicity_and_hazards_in_synthesis
Erişim Tarihi: (27 Aralık 2015)
- [6] Erdemoğlu, M., Kolloitler Yüzey Yükü Zeta Potansiyel. İnönü Üniversitesi, Malatya
https://www.inonu.edu.tr/uploads/contentfile/642/files/Colloids_Surface_Zeta%20Potential_M_Erdemoglu.pdf (29 Aralık 2016)
- [7] Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Yanıkkaya Demirel, G., Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. Yeditepe Üniversitesi. Aralık **2013**.
- [8] Ö. Gürsoy Çalan, Nöronal Hücre Hatlarında AMİLOİD β Peptidin Oluşturduğu Hasarda Nörosteroidlerin Rolü. Uzmanlık Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir **2010**.

[9] Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA 2011.

[10] Anonim, Programlı Hücre Ölümü (Apoptosis), Hücre Ölümü (Nekroz) ve Evrim <http://www.evrimagaci.org/makale/268> (Erişim Tarihi:13 Eylül 2016)

[11] Hekim, N., Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü <http://bilimvebilimadami.com/apoptosis-programli-hucre-olumu/> (Erişim Tarihi:13 Eylül 2016)

[12] Danial, N,N., Korsmeyer, S.J., Cell death: Critical control points, *Cell*, 116(2), 205-219, **2004**.

[13] Kalın Bağırsak Kanseri, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanseri Daire Başkanlığı <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/45-kalin-bagirsak-kanseri.html> (Erişim Tarihi:24 Kasım 2016)

[14] Levin, B., Lieberman, D.A., McFarland, B., Andrews, K.S., Brooks, D., Bond, J., Dash, C., Giardiello, F.M., Glick, S., Johnson, D., Johnson, C.D., Levin, T.R., Pickhardt, P.J., Rex, D.K., Smith, R.A., Thorson, A., Winawer, S.J., Amerikan Kanseri Derneği Kolorektal Kanseri Danışma Grubu, US Multi-Society Task Force, American College of Radiology Kolon Kanseri Komitesi. American Gastroenterological Association, Published Online: February 13, 2008

[15] Tarhan, Ö.R., Kolon ve Rektum Kanseri (Kolorektal Adenokanser) <http://www.turkcerrahi.com/wp-content/uploads/kolon-ve-rektum-kanseri.pdf> (Erişim Tarihi:15 Kasım 2016)

[16] Bağırsak Kolon Kanseri, Türkiye Kanseri Savaş Vakfı <http://www.kanservakfi.com/bagirsak-kolon-kanseri-104.html> (Erişim Tarihi:29 Aralık 2016)

[17] Büyük, A., Karsinoid Tümörler ve Karsinoid Sendrom (Nöraendokrin Tümörler).

<http://www.dicle.edu.tr/Contents/ec318c96-2878-426b-aaba-797b1bafa5ef.pdf>

(Erişim Tarihi:23 Aralık 2016)

[18] Kolorektal Kanser Önleme ve Erken Teşhis, American Cancer Society
https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=tr&prev=search&url=translate.google.com.tr&sl=en&u=http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancerearlydetection/colorectal-cancer-early-detection-risk-factors-for-crc&usg=ALkJrhFB9CPOiO4N94d-2hs_10Ov8hSKA

(Erişim Tarihi:16 Kasım 2016)

[19] Bolaman, A.Z., Hodgkin Lenfoma, Etiyoloji, Tanı, Patogenez, Klinik, Prognoz ve Tedavi, Adnan Menderes Üniversitesi, Türkiye Hematoloji Derneği, HematoLog **2013**.

[20] Şakalar, Ç., İzgi, K., Canatan, H., Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. 105-110. Ed: Kaplan, M., Özcan, M., Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, Cilt 27, Sayı 2. Erciyes, **2013**

[21] Winawer, S.J., et al., Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. N Engl J Med, 1996. 334(2): p. 82-7.

[22] M.S. Pepeler, Kolorektal Kanserlerde Vitamin D Reseptör Ekspresyonunun Kolorektal Kanserlerde Evre İle İlişkisi ve Prognoz Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, **2011**

[23] Uchikado, Y., et al., Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2005. 11(3): p. 1174-80.

- [24] Kalın Bağırsak Kanseri, Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı
<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/45-kalin-bagirsak-kanseri.html>
Erişim Tarihi: (15 Aralık 2016)
- [25] Anonim, Kolon Kanseri. Anadolu Sağlık Merkezi Kanser ve Yaşam.
<http://kanserveyasam.org/kanser-hakkinda/kanser-turleri/adan-zye-kanser-turleri/k/kolon-kanseri/> (Erişim Tarihi:21 Aralık 2016)
- [26] Tekinel, M., Akıncı, H., Kolon Kanseri.
<http://www.surgimedclinic.com/kolon-kanseri.html> (Erişim Tarihi:28 Aralık 2016)
- [27] Turhal, N.S., Kolon Kanseri (Kalın Bağırsak Kanseri): Tanı, Belirtiler, Tedavi.
http://www.tavsiyeeidiyorum.com/makale_1906.htm , **2008**
- [28] Öven Ustaalioglu, B.B., Kemoterapinin Yan Etkileri.
http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/per/belge/kemoterapi_yan_etki.pdf
(Erişim Tarihi:5 Aralık 2016)
- [29] Yılmaz, S., Kemoterapi Hasta Eğitim Rehberi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Kuruluşları Hasta ve Yakınlarının Eğitimi. **2012**
<http://hastaegitimi.uludag.edu.tr/kemoterapi-hasta-egitim-rehberi.htm#.WGs301OLTIV> (Erişim Tarihi:3 Aralık 2016)
- [30] Karagüzel, A., Kalay, E., Celep, F.,RNA İnterferans(RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. 41-44. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2007**
- [31] Bodur, E., Demirpençe, E., Kodlanmaya RNA'lar ve Gen Susturumu. 82-89. Hacettepe Tıp Dergisi, **2010**.
- [32] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. Nat Rev Mol Cell Biol **2008**; 9:219-30.

- [33] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*". *Cell***75**: 843–854.
- [34] Yılmaz, M.B., Kalp Yetersizliğinde Yeni Bir Ufuk: MikroRNA. Kalp Yetersizliği Elektronik Haber Bülteni Sayı: 2. **2012**.
- [35] Phillips, T., What Is This siRNA and How Is It Used? Biotech and Pharmaceutical Industries.
<https://www.thebalance.com/what-is-sirna-and-how-is-it-used-375598> (Erişim Tarihi:29 Kasım 2016)
- [36] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN **2012**. *International Journal of Cancer* 2015;136:359-386.
- [37] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, **2014**. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
- [38] Nurilli, F., Uçmak Vural, G. Ve Aras, Ö., Teranostik Platformlarda Moleküler Görüntüleme Yöntemleri. *Nükleer Tıp Seminerleri* 2015; 2: 120-7, **2015**
- [39] Moselhy, J., Evaluation of copolymers of N-isopropylacrylamide and 2-dimethyl(aminoethyl)methacrylate in nonviral and adenoviral vectors for gene delivery to nasopharyngeal carcinoma, *International Journal of Nanomedicine*, 2(3),461-478, **2007**.
- [40] Chen, C.J, Wang, J.C., Zhao, E.Y., Gao, L.Y., Feng, Q., Liu, X.Y., Zhao, Z.X., Ma, X.F., Hou, W.J, Zhang, L.R., Lu, W.L., Zhang, Q., Self-assembly cationic nanoparticles based on cholesterol-grafted bio-reducible poly(amidoamine) for siRNA delivery, *Biomaterials*, 34(21), 5303-5316, **2013**.

- [41] Caffrey, D.R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M.E., Haney, S.A., Subramanian, R.R., Seymour, A.B., Hughes, J.D., siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency, *Plos One*, 6(7), **2011**.
- [42] Draz, MS., Fang, B.A., Zhang, P., Hu, Z., Gu, S., Weng, K.C., Gray, J.W., Chen, F.F., Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections, *Theranostics*, 4(9), 872–892, **2014**.
- [43] Mykhaylyk, O., Sanchez-Antequera, Y., Vlaskou, D., Cerda, M.B., Bokharai, M., Hammerschmid, E., Anton, M., Plank, C., Magnetic nanoparticle and magnetic field assisted siRNA delivery in vitro, *Methods Mol Biol*, 1218, 53-106, **2015**.
- [44] Moselhy, J., Vira, T., Liu, F.F., Wu, X.Y., Characterization of complexation of poly (N-isopropylacrylamide-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) thermoresponsive cationic nanogels with salmon sperm DNA, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 153–164, **2009**.
- [45] Chono, S., Li, S.D., Conwell, C.C., Huang, L., An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor, *Journal Control Release*, 131(1):64-69, **2008**.
- [46] Gao, Y., Liu, X.L., Li, X.R., Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1017-1025, **2011**.
- [47] Kim, C., Shah, B.P., Subramaniam, P., Lee, K.B., Synergistic induction of apoptosis in brain cancer cells by targeted codelivery of siRNA and anticancer drugs, *Pharmaceutics*, 8(5), 1955–1961, **2011**.
- [48] Jiang, M., Milner, J., Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells, *Genes Development*, 17(7), 832–837, **2003**.

[49] Anonim, Kanserle Dans Derneği Yayınları, **2013**.

<https://kanser.org/saglik/userfiles/file/KolonKanseri06.pdf> (Erişim Tarihi:12 Ekim 2016)

[50] Campbell, F.W., Compton R.G., The use of nanoparticles in electroanalysis:an updated review, Analytical and bioanalytical chemistry, DOI : 10.1007 / s00216-009-3063-7, 2010.

[51] Kolorektal kanser önleme ve teşhis. American Cancer Society.

<http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancerearlydetection/colorectal-cancer-early-detection-genetic-tests-screening-prevention&usg=ALkJrhiShYYTXb84hVmX08179gz-Uh9Ilg>

[52] Anonim, Kanser Hücreleri ile Normal Hücreler Arasındaki Fark

<https://limenya.com/kanser-hucreleri-ile-normal-hucreler-arasindaki-fark/> (Erişim Tarihi:8 Kasım2016)

[53] Dobrucalı, A., Epidemiyoloji

<http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/> (Erişim Tarihi:2 Ocak 2017)

[54] Tharu, R., Shroff, S., Chemotherapy Drugs. MeD INDIA 2016.

[55] Akbudak, S., n@nobülten 17, 5-9. e-dergi Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara, 2013.

[56] Bayram, C., n@nobülten 17, 20-24. e-dergi Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara, 2013.

[57] “Dual-Porosity Hollow Nanoparticles for the Immunoprotection and Delivery of Nonhuman Enzymes.” Inanc Ortac, et al. *Nano Lett.*, 2014, 14 (6), pp 3023–3032. DOI: 10.1021/nl404360k

- [58] Alkilany, A. M., Murphy, C.J., Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal Of Nanoparticle Research* 2010.
- [59] Gürmen, S., Ebin, B., TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Metalurji Dergisi 150.Sayı, 32, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul. 2006.
- [60] Zhong, W., “Nanomaterials in Fluorescence-Based Biosensing”, *Anal Bioanal Chemistry*, 2009.
- [61] Durak, H., Onkolojide Kişiselleştirilmiş Tedavi ve Teranostik Yaklaşımlar, *Nükleer Tıp Seminerleri.*, 2015 ;2:80-4, DOI:10.4274/nts.014
- [62] Özdoğan, M., 4.Evrede Kanser Nedir, Metastaz Ne Demektir, Kanser Neden Metastaz Yapar ?
<http://www.drozdogan.com/4-evrede-kanser-nedir-metastaz-ne-demektir-kanser-neden-metastaz-yapar/> (Erişim Tarihi:25 Kasım 2016)
- [63] Sperling, R. A., Gil, P. R., Zhang, F., Zanella, M. ve Parak, W. J., “Biological Applications of Gold Nanoparticles”, *Chemical Society*, 24 Nisan 2008
- [64] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello, V. M., “Gold Nanoparticles in Delivery Applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 12 Mart 2008.
- [65] Mehrabadi, Ş.F., Fischer, W., Haag, R., Dendritic and lipid-based carriers for gene/siRNA delivery (areview), *Solid state & Materials science*, 310-322, 2012.
- [66] Jiangyu, W., Weizhe, H., Ziyang, H., Dendrimers as Carriers for siRNA Delivery and Gene Silencing: A Review, 2013.
- [67] Vikas, V., Preeti, S., REVIEW ON NON-VIRAL DELIVERY SYSTEMS FOR siRNA, *International Journal of Pharmaceutical Science And Research ; Jhansi*, 294-301, 2014.

[68] Yazdi, F., Salehi, R., Mirzaei, H., SiRNA and epigenetic aberrations in ovarian cancer, Cancer surveys and therapeutics magazine, Mumbai, 2016.

[69] Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J.P., Passirani, C., A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer, Biomaterials, 6429-6443, 2013.