

**siRNA TAŞINIMINDA KULLANILMAK ÜZERE YILDIZ TİPİ  
POLİMERLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF STAR  
SHAPED POLYMERS TO BE USED IN siRNA DELIVERY**

**SERHAT ÖZTÜRK**

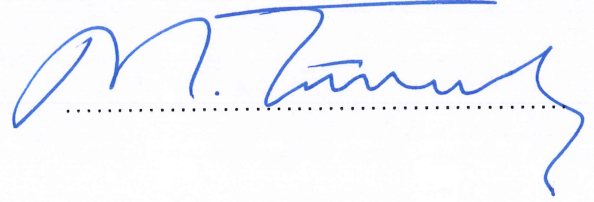
**DOÇ. DR. LOKMAN UZUN**  
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

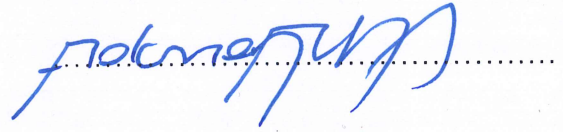
2018

**SERHAT ÖZTÜRK'** ün hazırladığı "**siRNA Taşınımında Kullanılmak Üzere Yıldız Tipi Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'**nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

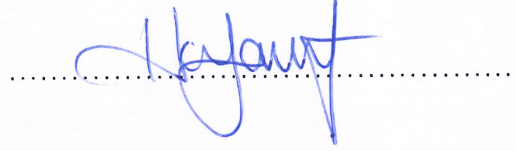
Prof. Dr. Mustafa Türk  
Başkan



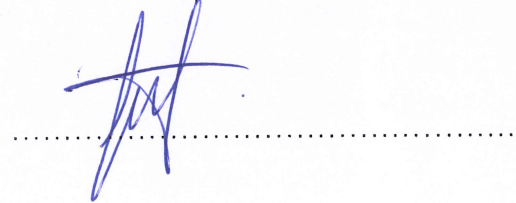
Doç. Dr. Lokman Uzun  
Danışman



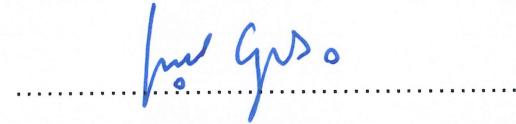
Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz  
Üye



Doç. Dr. Fatih Büyükserin  
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

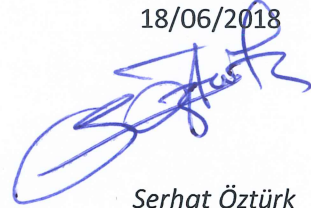
- Tezimin/Raporumun 18/06/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

18/06/2018



Serhat Öztürk

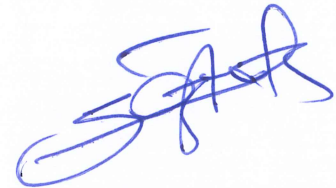
## ETİK

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

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

beyan ederim.

18/06/2018



SERHAT ÖZTÜRK

## ÖZET

### **siRNA TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE YILDIZ TİPİ POLİMERLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

**SERHAT ÖZTÜRK**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Lokman Uzun**

**Haziran 2018, 63 Sayfa**

siRNA temelli RNA interferans mekanizmasından faydalanılarak gen ifadenmesinin baskılanması, spesifik genlerin temel işleyişlerini ortaya çıkarmada kullanılmakla birlikte buna ek olarak viral enfeksiyonlar, genetik, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanser gibi hastalıklar üzerinde etkiye sahip bir gen tedavisi uygulamasıdır. Günümüzün en önemli ve ölümcül hastalıklarından olan kanser, her yıl on binlerce insanın hayatını tehdit etmekte ve bu rakamlar her geçen yıl artmaktadır. Kanser hastalığı ile mücadele için birçok geleneksel yöntem olması ile birlikte; bu yöntemlerin hastalar üzerinde olumsuz etkiler göstermesi, kanser tedavisi üzerine yoğunlaşan araştırmacıları yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmektedir. Bu yan etkilerin başında günümüzde kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin kanser hücreleri ile birlikte sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Son yapılan çalışmalarda bu sorun üzerine yoğunlaşmış ve kanser hücrelerini hedeflemeyi amaç edinen yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yeni nesil kanser hücresi odaklı yöntemlerden birisi de siRNA tedavisidir. siRNA tedavisi yöntem olarak doğrudan sorunlu gene mRNA düzeyinde etki ederek potansiyel bir terapötik

olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte siRNA'nın terapötik olarak kullanımını zorlaştıran, sahip olduğu yükün etkisi ile hücre membranından geçememesi ve hücre içine etkin bir şekilde girememesi gibi sınırlamaları mevcuttur. Bunun yanı sıra siRNA'ların nükleazlar tarafından enzimatik degradasyona uğrama ihtimallerinin oluşu, yarı ömürlerinin oldukça kısa olmasına neden olur. Bunun gibi olumsuz etkileri bertaraf etmek adına siRNA taşınımı için uygun ve etkili bir taşıyıcı sistemin kullanımı gereksinimi oluşmaktadır. Bu noktada yıldız polimerler taşıyıcı sistem gereksinimini ortadan kaldırmak ve siRNA degradasyonunun önüne geçmek için etkili bir polimer olarak karşımıza çıkmaktadır. Gen yüklemesindeki olağanüstü enkapsülasyon kapasiteleri, gen etkileşimi için elektriksel yüke sahip küre yapısı, fonksiyonellendirme için bol miktarda iç ve dış aktif gruplara sahip olması gibi özellikleri ile siRNA taşınımı için en etkili sistemin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Sunulan tez kapsamında, siRNA'lar ile etkileşecek olan yıldız polimerlerin sentezi, fonksiyonellendirilmesi ve karakterizasyonunun gerçekleştirilerek siRNA'lar için etkili bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Buradan yola çıkarak belirlenen hedefe ulaşmak için ilk olarak taşıyıcı sistem olan ATRP ile hazırlanan polietilen glikol (PEG) tabanlı, azot içeren çekirdeğe sahip yıldız polimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen yıldız polimerler çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılarak incelenmiş ve siRNA taşınımı için optimum değerleri veren yıldız tipi polimerik taşıyıcı sistemler elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise elde edilen katyonik özellik gösteren yıldız polimerlerin canlı hücreler üzerine sitotoksik etkileri ve larinks kanseri hücre hattı olan HEP-2 hücre hattı üzerinde de siRNA yüklenmiş katyonik partiküllerin gen susturma çalışmaları *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş ve HEP-2 hücreleri üzerinde gen ifadenmesinin baskılanması başarılı bir şekilde sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** yıldız polimer, ATRP, kanser, larinks kanseri, siRNA, gen tedavisi

## **ABSTRACT**

### **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF STAR SHAPED POLYMERS TO BE USED IN siRNA DELIVERY**

**SERHAT ÖZTÜRK**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Assoc. Prof. Lokman Uzun**

**June 2018, 63 pages**

Utilizing the siRNA-based RNA interfering mechanism, suppression of gene expression, in addition to being used to elucidate the basic functioning of specific genes, is a gene therapy application that has an effect on diseases such as viral infections, genetics, cardiovascular diseases and cancer. Cancer is one of the most important and deadly diseases in the world and nowadays threatens thousands of people and these numbers are increasing every year. Although there are many traditional methods for fighting cancer disease, these methods have negative effects on the patients, and researchers who are focused on cancer treatment lead to the development of new treatment strategies. One of the side effects of traditional treatment methods is that destroy cancer cells as well as healthy cells. Recent studies have focused on this problem and developed methods aiming at targeting cancer cells. One of the new generation cancer cell-based methods developed is siRNA therapy. siRNA therapy directly acts as a potential therapeutic agent by acting directly on the problematic gene at mRNA level. However, siRNA has limitations such as it's ability to pass through the cell membrane and not to enter the cell effectively, which makes it difficult to use therapeutically. Moreover, the

possibility of siRNA's undergoing enzymatic degradation by nuclease causes the half-life of siRNAs to be quite short. In order to avoid such adverse effects, there is a need to use an appropriate and effective carrier system for siRNA delivery. At this point, the star polymers are effective polymer to remove the need for carrier system and to prevent siRNA degradation. Development of the most efficient system for siRNA delivery with properties such as extraordinary encapsulation capacities for gene load, sphere structure with electrical charge for gene interaction and abundant internal and external active groups for functionalization.

Within the scope of the thesis, it is aimed to develop an effective carrier system for siRNAs by synthesizing, functionalizing and characterizing star polymers which will interact with siRNAs. From this point, to reach the determined target, synthesis of star polymers with polyethylene glycol based and nitrogen containing nucleus prepared with ATRP, which is the carrier system, was first carried out. Synthesized star polymers were studied using various characterization techniques and star-shaped polymeric carrier systems were obtained which gave optimum values for siRNA transport.

In the second part of the study, the cytotoxic effects of star polymers showing cationic properties on the living cells and gene silencing studies of siRNA loaded cationic particles on the HEP-2 cell line, which is a larynx cancer cell line, were performed in vitro and gene expression on HEP-2 cells was successful.

**Keywords:** star polymer, ATRP, cancer, larynx cancer, siRNA, gene therapy



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bilgisini ve değerli katkılarını esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Lokman Uzun ve bilgi ve tecrübesi ile her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a,

Her koşulda desteğini arkamda hissettiğim, fikirleri ile her zaman yolumu aydınlatan, her türlü sıkıntıma ortak olan değerli hocam ve ağabeyim Dr. Cem Bayram ve sevgili eşi, değerli hocam Merve Gültekinoğlu Bayram'a,

Yaptığım tüm çalışmalarda değerli katkılarını ve zamanını esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim değerli hocam ve ağabeyim Dr. Tayfun Vural'a,

Tez çalışmalarım boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Ekin Çelik'e,

Tez çalışması süresince yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarım Murat Demirbilek, Tamer Çırak, Öznur Akbal, Göknur Kara, Ali Örs, Ebru Erdal, Eda Yalçın, Betül Bozdoğan, Yeşim Tuğçe Yaman, Soheil Malekghasemi, ve Gizem Daban'a

İhtiyacım olduğunda değerli dostluklarını ve yardımlarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Elif Keskin, Merve Uğur, Pınar Kapçı ve İzzet Avcı'ya,

Beni bugünlere getiren, her zaman destek ve sevgilerini üzerimde hissettiğim canımdan çok sevdiğim ailem'e,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Serhat Öztürk

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	III
TEŞEKKÜR .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
ŞEKİLLER .....	X
ÇİZELGELER .....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	XII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser Nedir? .....	3
2.1.2. Onkojenler ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Keşfi .....	4
2.1.2.1. Onkojenler .....	5
2.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler .....	5
2.1.3. Baş ve Boyun Kanseri .....	5
2.1.3.1. Larinks Kanseri .....	6
2.1.4. Kanser Tedavi Yöntemleri .....	7
2.1.4.1. Ameliyat ve Modern Teknolojinin Kullanımı .....	7
2.1.4.2. Kemoterapi Tedavisi .....	7
2.1.4.3. Hormonal Tedavi .....	8
2.1.4.4. Radyasyon Tedavisi .....	8
2.1.4.5. Gen Tedavisi .....	8
2.1.5. RNA İnterferans Mekanizması .....	10

2.1.5.1. DICER.....	12
2.1.5.2. RNAi ve Terapötik Kullanımı .....	12
2.1.5.3. Siklin D1 .....	12
2.1.6. Gen Taşınım Yöntemleri.....	13
2.1.7. Yıldız Polimerler ile Gen Taşınımı .....	13
2.2. Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller .....	14
2.2.1. Nanopartikül Nedir?.....	14
2.2.1.1. Nanopartikül Türleri.....	14
2.2.2. Nanopartiküllerin Medikal Uygulamaları .....	16
2.2.2.1. Tıbbi Teşhis .....	16
2.2.2.2. Tıbbi Tedavi .....	16
2.2.3. Nanopartikül Olarak Yıldız Polimerler.....	18
2.2.3.1. Yıldız Polimerlerde Fonksiyonellik .....	19
2.2.3.2. Uyarıya Karşı Cevap Oluşturabilme.....	19
2.2.3.3. Biyouyumluluk.....	19
2.3. Yıldız Polimer Sentez Yöntemleri.....	20
2.3.1. Kontrollü Yaşayan Polimerizasyon.....	20
2.3.2. Yaşayan Radikal Polimerizasyonu/ Kontrollü Radikal Polimerizasyonun Sınıflandırılması .....	22
2.3.2.1. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP).....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	25
3.1. Kimyasallar.....	25
3.2. Yıldız Tipi Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	25
3.2.1. Yıldız Polimerlerin Sentezi.....	25
3.2.2. Yıldız Polimerlerin Karakterizasyonu .....	27
3.2.2.1. Molekül Ağırlığı Dağılımının Belirlenmesi .....	27

3.2.2.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.2.3. Kimyasal Yapısının Belirlenmesi.....	28
3.2.2.4. Yıldız Polimerlerin Boyut Analizi .....	28
3.2.2.5. Yıldız Polimerlerin Yüzey Yükü Analizi .....	29
3.2.3. Yıldız Polimerlerin Protonlanması .....	29
3.3. Yıldız Polimerlerin siRNA yüklenme Çalışması.....	29
3.3.1. siRNA Yüklenme Veriminin İncelenmesi.....	29
3.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışması .....	30
3.4. Yıldız Polimerlerin Hücre Etkileşim Çalışmaları .....	30
3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Kültüre Edilmesi .....	31
3.4.2. Sitotoksosite Çalışması .....	32
3.4.2.1. Gerçek Zamanlı PCR Analiz Çalışması .....	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	39
4.1. Yıldız Polimerlerin Karakterizasyonu .....	39
4.1.1. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi .....	39
4.1.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	39
4.1.3. Kimyasal Yapı Karakterizasyonu.....	40
4.1.4. Boyut ve Yüzey Yükü Analizi.....	43
4.2. Yıldız Polimerlerin Yüklenme Veriminin İncelenmesi.....	44
4.2.1. Qubit 3.0 Cihazı ile Yüklenme Veriminin İncelenmesi.....	44
4.2.2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışması ile Yüklenme Veriminin İncelenmesi.....	46
4.3. Yıldız Polimerlerin Sitotoksosite Analizi .....	47
4.4. Yıldız Polimerler ile RT-PCR Çalışması .....	49
SONUÇLAR.....	51
KAYNAKLAR .....	53

EKLER.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	63



## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin oluşum mekanizması [6].	4
Şekil 2.2. RNAi Mekanizması [19].	11
Şekil 2.3. Kontrollü Polimerizasyon Reaksiyonu [62].	21
Şekil 2.4. ATRP mekanizması; $M_i^n$ :Geçiş metali, L: Kompleks ligand, $P_n$ : Polimer zinciri, X: Br veya Cl [70].	24
Şekil 3.1. Yıldız polimer nanopartiküllerin sentez basamakları	27
Şekil 3.2. HEp-2 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.	31
Şekil 3.3. MTT-tetrazolyum'un formazan kristallerine dönüşümü	33
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin farklı büyütmelemlerde elde edilmiş TEM görüntüleri	40
Şekil 4.2. PEGMA molekülünün $^1H$ - NMR spektrumu.	42
Şekil 4.3. Sentezlenen yıldız polimer nanopartikülün $^1H$ - NMR spektrumu.	43
Şekil 4.4. Partiküller ile 4 saat inkübe edilmiş ssDNA'nın bağlanma verimi.	45
Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforez çalışması.	46
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda asit ile muamele edilmemiş yıldız polimer nanopartiküllerin % canlılık (sitotoksosite) grafiği.	48
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda asit ile muamele edilmiş yıldız polimer nanopartiküllerin %canlılık (sitotoksosite) grafiği.	48
Şekil 4.8. Farklı miktarlardaki partiküller ile etkileştirilmiş siRNA'lar ile sadece siklin D1'in HEp-2 hücreleri ile etkileştirildikten sonra elde edilen Gerçek-Zamanlı PCR sonuçları.	49

## ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Hücre kültüründe uygulanan koşullar. ....	32
Çizelge 3.2. RNA hazırlama kiti ile izole edilen RNA miktarları.....	35
Çizelge 3.3. Eşlenik DNA sentezinde kullanılan çözeltilerin miktarı.....	36
Çizelge 3.4. PCR cihazında uygulanan sıcaklık programı. ....	36
Çizelge 3.5. Siklin D1 sentezinde uygulanan sıcaklık programı.....	37
Çizelge 3.6. Optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen 20 µL'lik hacmin içeriği. .....	37
Çizelge 4.1. Yıldız polimerlerin boyut, yüzey yükü ve PDI değerleri. ....	44
Çizelge 4.2. Farklı partikül oranlarında, 7500 ng sabit ssDNA miktarlarında Qubit 3.0 cihazı ile yapılan ölçümlerde okunan değerler. (n=3).....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ATRP</b>	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Döterokloroform
<b>CCND1</b>	Siklin D1
<b>CRP</b>	Kontrollü Radikal Polimerizasyonu
<b>DMAEMA</b>	Dimetilaminoetil Metakrilat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dsRNA</b>	Çift Sarmal Ribonükleik Asit
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik Asit
<b>EGDMA</b>	Etilenglikol Dimetakrilat
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Gerekli Ortam
<b>GPC</b>	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
<b>HMTETA</b>	Hekzametilentrietilen Tetraamin
<b>LRP</b>	Yaşayan Radikal Polimerizasyonu
<b>miRNA</b>	Mikro Ribonükleik Asit
<b>M<sub>n</sub></b>	Sayıca- Ortalama Molekül Ağırlığı
<b>M<sub>w</sub></b>	Ağırlıkça- Ortalama Molekül Ağırlığı
<b>NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans
<b>NMP</b>	Nitroksit Destekli Polimerizasyon
<b>PCR</b>	Polimer Zincir Tepkimesi
<b>PDI</b>	Poli Dispersite İndeksi
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PEGMA</b>	Polietilen Glikol Metil Eter Metakrilat
<b>RAFT</b>	Tersinir Ekleme-Ayrıştırma Zincir Transferi
<b>RISC</b>	RNA- etkili Susturucu Kompleksi



<b>RT-PCR</b>	Gerçek-Zamanlı Polimer Zincir Tepkimesi
<b>siRNA</b>	Küçük Girişimci Ribonükleik Asit
<b>shRNA</b>	Kısa Saçtokası Ribonükleik Asit
<b>ssDNA</b>	Tek Zincirli Deoksiribonükleik Asit
<b>THF</b>	Tetrahidrofuran
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>(w/w)</b>	(Kütle/Kütle)



# 1. GİRİŞ

Günümüzde insanlığın en önemli sağlık sorunlarından bir olan kanser, her geçen yıl rastlanan vaka sayılarındaki artış göz önüne alındığında dünya genelinde üzerinde durulması gereken en önemli rahatsızlıklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Dünya Sağlık Örgütünü (WHO)'nün rakamları baz alındığında görülen vaka sayılarındaki artışın yanı sıra dünya genelinde görülen ölümler incelendiğinde kanser hastalığının bu ölümlerde, kalp rahatsızlıklarından kaynaklanan ölümlerden sonra en büyük pay sahibi olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre yüksek bir ivme ile kanser hastalığının tedavisi için bilim insanları tarafından yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır.

Geçmişten günümüze kadar uygulanan ve hali hazırda uygulanmaya devam eden cerrahi uygulamalar, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler kanser hastalığının durdurulması ve gelişmesinin önlenmesinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Ancak bu tedavi yöntemlerinde kanser hücrelerinin aktivitelerinden kaynaklı olarak bir çok sorun ortaya çıkmaktadır. Kanser üzerinde çalışmanın zorluğunun yanı sıra baş ve boyun kanserleri gibi kanserli bölgenin vücutta bulunduğu bölgenin oluşturduğu tedavi zorlukları da söz konusudur. Baş ve boyun kanserleri dünya genelinde en sık görülen 6. kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır [2]. Baş ve boyun kanserlerinde çalışılan bölgenin zorluğu ve hassasiyeti nedeni ile uygulanan kombine tedaviler sonucunda hasta üzerinde olumsuz yan etkiler görülebilmektedir. Bu sonuçlar arasında yutkunma kaybı, yutkunma zorlukları, ses tellerinde oluşan hasara bağlı olarak gelişen ses kaybı ve konuşma sorunları gibi hastaların hayatını oldukça olumsuz etkileyen sorunlar görülebilmektedir. Baş ve boyun kanserleri arasında en sık görülen kanser türü larinks kanseri olarak karşımıza çıkmaktadır. Larinks kanserinin vücutta geliştiği bölge itibari ile cerrahi müdahale ve ışın tedavileri sonucunda hastalarda tedavi sonrasında kalıcı sorunlar oluşabilmektedir. Yapılan geleneksel tedaviler sonucunda larinks kanserinin tekrar edebildiği yapılan vaka araştırmalarında görülebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü kanser üzerine çalışan bilim insanları yeni tedavi yöntemleri geliştirme üzerine çalışmakta ve var olan tedavi stratejilerini güncellemeye odaklanmaktadır. Bu çalışmaların başında gen tedavisi yöntemi gelmektedir. Gen tedavisi, genetik rahatsızlıkların düzeltilmesi için uygulanan ve terapötik etki yaratan nükleik asitlerin hücre içerisine aktarılması

işlemi ile gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir. Gen tedavisinde hasarlı olan genin onarımı, ön plana çıkan bir tedavi olarak görülse de belirli bir fonksiyonun baskılanması ya da inhibe edilmesi için de nükleik asitlerin kullanımı söz konusudur. Ancak nükleik asitlerin sahip oldukları negatif yüklerin bir sonucu olarak hücre içerisine taşınma zorluğu ve yine hücre içerisine penetrasyon sıkıntısı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle yeni taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve fonksiyonellendirilmesi bu tip tedavi yöntemleri için oldukça önem arz etmektedir. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilecek olan tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen nanopartikül sistemleri ile siRNA temelli gen tedavisi uygulamasının insan larinks kanseri hücre hattı olan HEp-2 hücre hattı ile bu kansere özgü siRNA olan siklin D1 geni kullanılarak *in vitro* olarak gerçekleştirilecek olması çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır. Ayrıca *in vitro* olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda elde edilmiş olan veriler başka kanser tipleri ve tez kapsamında çalışılan kanser türünde *in vivo* olarak gerçekleştirilecek çalışmalara da öncülük etmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

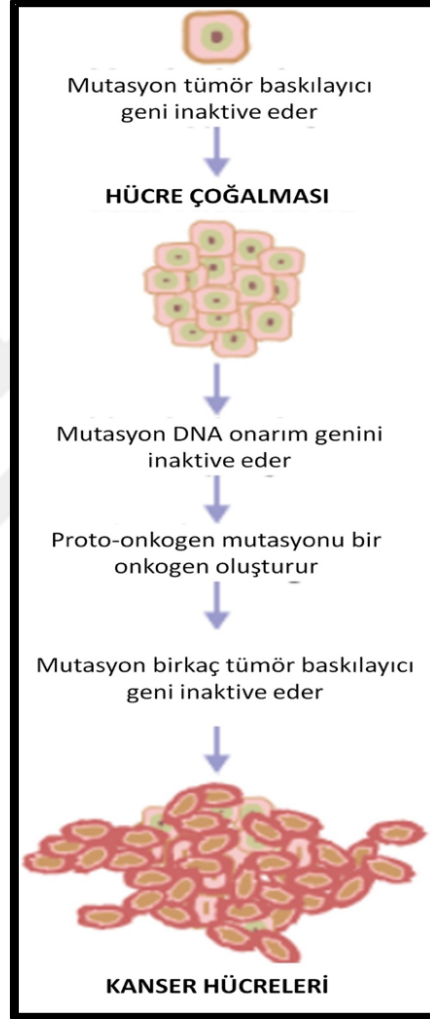
#### 2.1.1. Kanser Nedir?

Kanser dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen en fazla ölüm oranına sahip hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan erkek popülasyonunun yarısı, kadınların ise üçte biri yaşamlarının herhangi bir evresinde kanser hastalığı ile karşı karşıya kalacağı tahmin edilmektedir [3]. Günümüzde kanser hastalığı geçiren milyonlarca hastanın erken teşhis ve tedavi sayesinde yaşam süreleri uzatılabilmektedir. Kanser çağımızın hastalığı olarak tanımlanması ile birlikte, aslında yeni ortaya çıkan bir rahatsızlık değildir. Kanser kelimesi kendisi de doktor olan Hipokrat tarafından karsinoma tümörlerini adlandırmak için ortaya atılan ve Yunanca yengeç anlamında kullanılan karkinos'tan gelen bir terimdir. Ancak kanser ile ilk defa karşılaşan Hipokrat olmamıştır. Milattan önce 1600 yıllarından kalma Mısırda bulunan mumyalar incelendiğinde insanda görülen kemik kanserinin ilk kanıtları ortaya çıkmıştır [4].

Kanser, geçmişte örnekleri olmasına rağmen günümüzde kanserin tanımı net bir şekilde yapılabilmektedir. Kanser, vücudun belirli bir bölgesine ait hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda gelişme gösteren bir rahatsızlıktır [5]. Bütün kanser hücrelerinde hücreler çoğalmaya devam eder. Bu çoğalma sonucunda ortamda yeni anormal hücreler meydana gelir. Bir kısım kanser hücreleri vücut içerisinde kan dögüsü ile vücudun farklı bölgelerine yayılarak metastaz denilen durumu ortaya çıkartır. Örnek vermek gerekirse göğüs kanseri hücreleri kan yolu ile taşınarak karaciğerde çoğalmaya başlayıp metastaz gerçekleştirmesi sonucunda karaciğerde oluşan kanser, karaciğer kanseri değil göğüs kanseri olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak kanser hücreleri DNA hasarından kaynaklı olarak oluşmaktadır. Çoğu zaman DNA hasar görse bile vücudun bunları tamir etmekte kabiliyeti söz konusudur. Fakat DNA hasarı olan kanser hücrelerinin onarımı söz konusu olamamaktadır.

İnsanlar ayrıca kalıtsal olarak ebeveynlerinden hasarlı DNA'ya sahip olabilmekte ve bu tip kanserler kalıtsal kanserler olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca çevresel etkiler sonucunda DNA hasarının oluşması da söz konusudur. Kanserler genelde katı

tümör formunda karşımıza çıkmaları ile birlikte bazı kanser türlerinde örneğin kan kanserinde, kanser oluşumu tümör formunda oluşmamaktadır. Bununla birlikte kan kanseri, kan içerisinde çoğalarak dolaşım sistemi aracılığı ile vücutta bulunan diğer doku ve organlara yayılabilmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak değişik kanser tipi hücrelerde değişik davranışlar göstermektedir. Kanser erken safhada teşhis edilebilir ise tedavisi kolay ve aynı zamanda hastalarda uzun yaşama şansı yüksektir [4].



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin oluşum mekanizması [6].

### 2.1.2. Onkojenler ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Keşfi

20. yüzyılın ortalarında bilim insanları kanserin ardında yatan sebepleri biyoloji ve kimya temellerinde oluşturduğu kompleks problemleri çözmeye başlamışlardır. 1953 yılında DNA'nın heliks yapısının keşfi ile Watson ve Crick 1962 senesinin Nobel ödülünün sahibi olmuşlardır. Bu adımlardan sonra bilim insanları genlerin

nasıl çalıştığını ve mutasyonlar sonucunda nasıl hasara uğradıklarını keşfetmişlerdir [7]. Araştırmacılar kanserin kimyasallardan, radyasyondan, virüslerden ve kalıtsal olarak atalardan gelen genlerden kaynaklanabileceğini ortaya koymuşlardır. Çoğunlukla karsinogenler, DNA'ya hasar vererek anormal hücre çoğalmasını tetikleme mekanizması ile çalışmaktadırlar. DNA hasarı olan kanser hücrelerinin ölmediği; ancak DNA hasarı bulunan kanser olmayan hücrelerin öldüğü de bu dönem araştırmacıları tarafından keşfedilmiştir [4].

### **2.1.2.1. Onkojenler**

Bu genler normal hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olarak kanserin ortaya çıkmasına sebep olmaları ile bilinmektedir. Bunlar proto-onkojen denen, hücrenin normal genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadırlar [8].

### **2.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler**

Bu genler hücre bölünmesinin kontrolü, DNA onarımı ve hücrelerin ne zaman öleceğinin bilgisini veren genlerdir. Tümör baskılayıcı genler normal olarak çalışmadığında hücrelerin çoğalması kontrolden çıkarak kanser oluşumu gözlenir. Bilim insanları onkojenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin kimyasallar ve radyasyon sonucu hasar gördüklerini tanımlamışlardır. BRCA 1 ve BRCA 2, göğüs kanserine neden olan genlerin keşfedilmesi bunlara örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca farklı olarak keşfedilen genlerin, tiroid, pankreas, rektum, kolon ve böbrek kanserine neden oldukları ve bununla beraber kalıtsal olarak aile içerisinde aktarılabilirdiği de gözlemlenmiştir [9].

### **2.1.3. Baş ve Boyun Kanseri**

Baş ve Boyun kanseri, ağız boşluğu ve orofarinks kanseri de dahil olmak üzere bu bölgeye özgü birçok farklı kanser türünü içermektedir. Yapılan çalışmalarda her yıl 400.000 ila 600.000 yeni kanser teşhisi konan hasta sayısına ve 223.000 ila 300.000 arasında ölüm vakası sayısına sahip bir kanser türü olduğu rapor edilmiştir. Baş ve boyun kanserlerinin bilinen en önemli sebebi aşırı sigara ve alkol kullanımı

olarak karşımıza çıkmaktadır. Son 20 yıl içerisinde sigara kullanımındaki düşüşün gözlemlendiği ülkelerde ağız boşluğu kanseri görülme oranının düştüğü ortaya konmuş olsa da Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve Danimarka gibi 1980'den bu güne sigara kullanım oranındaki düşüşe rağmen artan oranda orofarinks ve ağız boşluğu kanserleri görülmüştür. Buradan yola çıkarak insan papilloma virüsünün (HPV) yarattığı enfeksiyonun, bazı baş ve boyun kanserlerinin gelişmesine ön ayak olduğu teorilerinin ortaya atılmasına neden olmuştur [10].

### **2.1.3.1. Larinks Kanseri**

Larinks (gırtlak), boğazın altında yemek borusunun önünde akciğerlerin hemen üzerinde bulunmaktadır. Larinks'in görevi yiyeceklerin akciğerlere kaçmasını engellemek, konuşmaya ve nefes almaya yardımcı olmaktır. Larinks üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar ses tellerinin olduğu kısım olan (glot), ses tellerinin üzerindeki kısım olan (üstglot) ve ses tellerinin alt kısmı olan (altglot) olarak karşımıza çıkmaktadır. Larinks kanseri sıklıkla ses tellerinin üzerinde oluşmaktadır. Larinks kanseri Avrupa' da en çok rastlanan kanser türlerinden biridir. Avrupa' da her yıl 52.000 yeni vaka görülmektedir. 2016 yılında yapılan bir çalışmada aynı yıl içerisinde 13430 larinks kanseri vakasının teşhis edileceği ve bu vakalardan 3620'sinin ölümle sonuçlanacağı öngörülmüştür. Rakamlar göz önüne alındığında bu sayının her geçen yıl arttığı görülmektedir. Larinks kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda görülmekle birlikte erkeklerde görülme sıklığı kadınlarda görülme sıklığından daha yüksektir. Erkeklerde her 100.000'de 5,8 vaka görülürken kadınlarda ise 100.000' de 1,2 vaka görülmektedir. Larinks kanseri son 40 yıl içerisinde 5 yıllık sağ kalım oranının %66'dan %63'e azaldığı birkaç onkolojik rahatsızlıktan biridir [11]. Larinks kanserinde çeşitli risk faktörleri mevcuttur. Bunlardan en önemlisi ve öne çıkanı alkol ve sigara kullanımınıdır. Ayrıca araştırmacılar alkol tüketimi ile larinks kanseri arasında doğrusal bir bağ olduğunu ortaya koymuşlardır [12]. Genel olarak larinks kanseri incelendiğinde kanserin gelişim gösterdiği bölge üzerinde çalışma zorluğu kanserin tedavi sürecine de yansımaktadır. Dolayısı ile bu tip kanserlerde bilim insanları tarafından yeni nesil tedavi yöntemleri araştırılmakta ve uygulamaya çalışılmaktadır.

## **2.1.4. Kanser Tedavi Yöntemleri**

### **2.1.4.1. Ameliyat ve Modern Teknolojinin Kullanımı**

Birçok insan, günümüzde çoğu kanser tipinin iyileştirilemeyen türde olmasına rağmen kanserin ilk aşamalarında doktora danışmayı ve erken önlem alma prosedürlerini geciktirmektedir. 1846 yılında anestezinin keşfedilmesinin ardından cerrahlar Bilroth, Handley ve Halsted lenf nodlarında bulunan tümörün tamamen alındığı cerrahi bir operasyon gerçekleştirmişlerdir. Ardından cerrah Paget kanser hücrelerinin ilk oluşan tümör dokusundan kan dolaşımı ile diğer dokulara metastaz gerçekleştirdiğini bildirmiştir [13]. Bu bilgiler ışığında kanserin yayılma mekanizmasının keşfi, kanser cerrahisinde uygulanacak olan limitlerin bulunmasını oldukça kolaylaştırmıştır. 1970'lerin başında ultrasonografide yaşanan ilerlemelerin sonucunda daha detaylı araştırma ameliyatları yapılmaya başlanmıştır. Minyatür kameralar ve endoskopi cihazları kullanılarak cerrahlar kolon ve mesane tümörlerini temizlemeyi başarabilmektedir. Son yapılan çalışmalarda sıvı nitrojenin tümör dokusu üzerine püskürtülerek dondurulması ve tümör dokusunun yok edilmesini sağlayan yöntemler geliştirilmiştir. Bununla birlikte lazer ile tümör dokusunun kesilerek temizlendiği operasyonlar da gerçekleştirilmektedir [4].

### **2.1.4.2. Kemoterapi Tedavisi**

Kemoterapi kelime anlamı açısından incelendiğinde ilaç tedavisi anlamına gelmektedir. Kanser tedavisinde ise kemoterapi tedavisi hücreleri öldüren çeşitli ilaçların hastalar üzerinde uygulanması işlemidir. 20. yüzyılın sonunda cerrahlar, kanser tedavisinde kemoterapi ve radyoterapiyi ameliyat ile kombine ederek yeni bir tedavi yöntemi ortaya koymuşlardır. Ortaya konan bu buluştan yıllar sonra birçok kemoterapi ilacının, sonucunda farklı kanser tiplerinde tedavi metodu olarak başarı sağladığı gözlemlenmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise farklı ilaç kombinasyonlarının kullanımı, lipozomal ve monoklonal antibadi tedavisi ile kanser hücrelerinin hedef alınması, kimyasal koruyucu ajanlar ile kemoterapinin yan etkilerinden kurtulmaya çalışılmaktadır [14].



#### **2.1.4.3. Hormonal Tedavi**

1878 yılında Thomas Beatson tavşanlarda yumurtalıkların alınmasından sonra göğüslerde süt üretiminin durduğunu keşfetmiştir. Bu buluşun ışığında bilim insanları testisler çıkartıldıktan sonra metastatik prostat kanserinin dramatik bir şekilde gerilediğini gözlemlemişlerdir. Kanser gelişimi ve yayılması üzerinde hormonların etkisinin bu şekilde gözlemlenmesinin ardından yeni nesil ilaçlar geliştirilmiş, prostat ve meme kanserinin hormonal olarak tedavi edilmesinde kullanılmışlardır [15].

#### **2.1.4.4. Radyasyon Tedavisi**

Radyasyon tedavisi diğer adı ile radyoterapi, iyonize radyasyon kullanılarak kanser hastalığının tedavisinin gerçekleştirildiği bir yöntemdir. Radyoterapi ile verilen yüksek dozdaki radyasyon, kanser hücrelerinin öldürülmesi ve bölünerek çoğalmalarının engellenmesi amacı ile kullanılmaktadır. Ayrıca kanserli bölgelere yapılan cerrahi operasyonlar sonrasında bölgede kalmış olabilecek kanserli hücrelerin yok edilmesi için de uygulanabilmektedir. Kanser hastalarının büyük çoğunluğunda ameliyat ve kemoterapi ile birlikte kombine tedavi yöntemi olarak da değerlendirilmektedir [14].

#### **2.1.4.5. Gen Tedavisi**

Gen tedavisi modern medikal araştırma alanları arasında en hızlı gelişme gösteren alanlardan biri olarak göze çarpmaktadır. Gen tedavisi, DNA'nın terapötik amaçlı olarak planlı bir şekilde istenilen bölgeye (ki bu bölge spesifik hücre veya doku olabilmektedir) aktarılması olarak tanımlanabilir. Bu yöntemde yalnızca ilgili DNA sekansları kullanılmaktadır. Aksi takdirde kemik iliği, böbrek veya karaciğeri içerisinde bulunduran transplantasyon prosedürleri gen tedavisinin farklı formları olarak düşünülebilir. Bu yöntemde terapötik etkiye sahip spesifik gen materyalinin minimum toksisite ile transfer edilmesi oldukça önemlidir. Bu yöntem ile hedef genin yeniden fonksiyonellendirilebilmesi sağlanabilmektedir [16].

Genetik bilginin pratik medikal bir araç olarak taşınması konsepti gen klonlama teknolojisi ile birlikte 1970'li yıllarda ortaya atılmış ve geliştirilmiştir. Tanımlanmış

genetik sekansları izole etme ve çoğaltma becerisi olmaksızın, bu sekansların klinik kullanım için saflaştırılmış malzeme olarak üretimi imkansızdır. Bu teknolojinin pratik uygulaması için yol gösterici olan, biyoteknoloji endüstrisinin bakterilerde rekombinant teknikler ile üretilen kompleks insan biyomolekülleri arayışıdır. Son on yıllık süreç içerisinde eczacılıkta kullanılan insülin, interferon, interlökin 2 ve tümör nekroz faktörü klinik denemeler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu bilgiler ışığında herhangi bir gen tedavisi yöntemi geliştirmek için bir dizi parametrenin kesin bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu parametreler, terapötik genin seçimi, uygulama yolu, gen taşıyıcı sistemler, hücre hedefleme, terapötik genin kararlılığı, terapötik genin ifadenmesi ve gen tedavisine karşı oluşan immün cevap olarak sıralanabilir.

Terapötik genin seçimi dendiğinde günümüzde mevcut potansiyel terapötik fonksiyona sahip geniş bir spektrumda incelenen ve gen tedavisinde kullanılan çeşitli nükleik asitler aklımıza gelmektedir. Bunlar protein kodlayıcı genleri ile genellikle bir hedef mRNA'ya antisens olan ribozomlar, siRNA'lar, RNA ve DNA'lar gibi oligonükleotidler ve DNA taklitlerini içeren küçük ve kodlanmayan birer nükleik asit serisini içerir. Uygulama yolunda ise hastadan alınan hücrelerin izolasyonu ve laboratuvar ortamında gen transferi aracılığı ile (*ex vivo* gen tedavisi) ya da terapötik yapıda olan genin hastalara doğrudan verilmesine dayanan (*in vivo* gen tedavisi) uygulama yollarından biri izlenerek gen tedavisi gerçekleştirilir. *Ex vivo* gen tedavisinde hücreler hastalardan alınarak kültüre edilir. Yapılan bu çalışma periyodunda terapötik gen hücrelere transfer edilir ve hücrelerin alındığı hastanın vücuduna yeniden infüze edilir. Bu yaklaşımın avantajları arasında farklı hücre popülasyonlarına *ex vivo* olarak genişletilebilmesi, gen transferinin gerçekleştiği hücreleri seçebilme ve gen transferini imkansız hale getirebilecek taşıyıcı vektöre karşı oluşacak immün cevap olasılığını ortadan kaldırma imkanı vermesi sayılabilmektedir. Bununla birlikte bu prosedür *in vivo* gen transferine göre daha elverişsiz ve pahalıdır. Ayrıca her hasta için tedavinin kişiselleştirilmesinin gerekmesi ortaya çıkan bir başka zorluktur.

*In vivo* gen tedavisi olarak bilinen yönteminde ise terapötik olan gen doğrudan olarak hastaya verilir. Bu yöntemin prensibi, *ex vivo* gen tedavisinden daha basit olmakla birlikte bir kere optimize edildikten sonra aynı hastalığa sahip farklı hastalara uygulanabilmektedir. Yöntemin bu gibi avantajları ile birlikte bazı

sınırlamaları da söz konusudur. Bunlardan ilki ve en önemlisi *in vivo* erişimin oldukça zor olmasıdır. Bu duruma örnek olarak beyin, kıkırdak, bağ doku veya kemiğe gen taşınımını gerçekleştirmenin oldukça zor olması gösterilebilir. Bu tip durumlar ile karşı karşıya kalındığında gen tedavisi terapötik genin belirli bölgelere uygulanması ile sınırlı kalmaktadır. İkinci istenmeyen etki ise *in vivo* uygulanan genin hedeflenen bölgeler dışında farklı bölgelerdeki hücrelere girmesi ve bunun sonucunda ortaya istenmeyen etkilerin çıkmasıdır. Bir diğer etki olarak ise gen taşınımı için vektörün bağışıklık cevabı oluşturma ihtimali göstermesidir. Bu gibi etkilerin ortaya çıkması uygulama yolunun belirlenmesinde ve uygulanmasında oldukça büyük önem arz etmektedir [17].

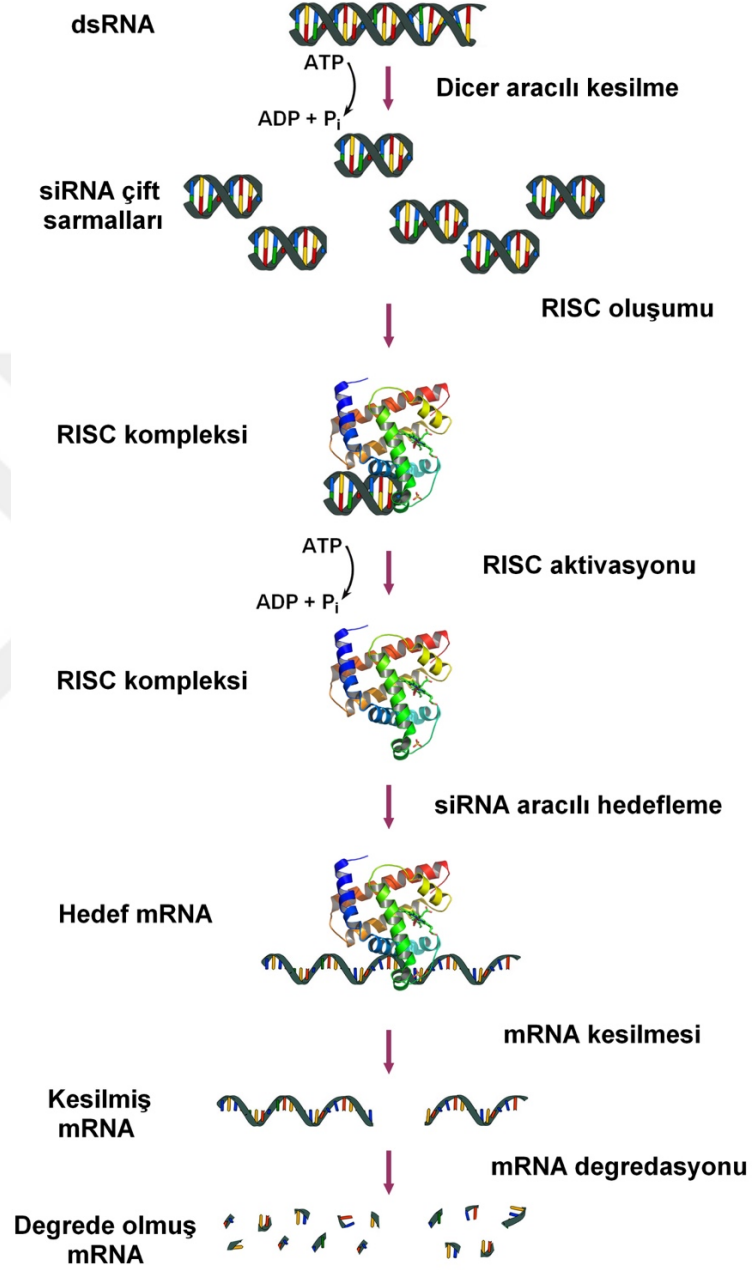
### **2.1.5. RNA İnterferans Mekanizması**

RNA girişim (RNAi), hedef RNA'nın parçalanmasını, translasyonun baskılanması gibi çoklu mekanizma olaylarını içeren ve gen ifadenmesinin post-translasyonel olarak gerçekleştirilmesine öncülük eden bir mekanizmadır.

RNAi'nin miRNA veya siRNA yolağının nihai efektörü olarak karşımıza çıkan ribonükleo-protein kompleksi (RISC), argonaute ailesinden oluşan ve çeşitli proteinleri içeren bir komplekstir. Bu proteinler, miRNA ve siRNA ile bağlanabilen PAZ bölgelerini, hedef RNA parçalanmasının efektörü RNaz H ile benzer olarak PIWI bölgelerini içerir. siRNA'lar hücreye eksojen olarak uygulandığında RISC kompleksi üzerinde bulunan kılavuz filament ile hedef siRNA arasında bağlantı gerçekleştirilerek endonükleolitik aktivitenin oluşması sağlanır. Oluşan bu durum sonucunda RISC kompleksi bir enzim görevi görerek substrat molekülünü kademeli olarak yok eder.

Bir başka gen susturma yöntemi ise RISC kompleksi ile bağlantılı olan argonaute proteinlerinin RNA bozunmasının gerçekleşeceği düşünülen P cisimleri olarak adlandırılan spesifik sitoplazmik bölgelerdeki hedef mRNA'ları izole edebilme yeteneğinden ileri gelmektedir. Burada bahsedilen gen susturma mekanizmaları hedef olarak transkripsiyonlu mRNA'yı içerdiğinden dolayı bu mekanizmalar genel olarak post-transkripsiyonel gen susturma olarak tanımlanırlar. Bununla birlikte bitkiler, mayalar ve *Drosophila*'da transkripsiyonel seviyelerde gen ifadenmesini durdurabilir. Bu durumda siRNA'lar hedef mRNA'ların gen kodlanma seviyelerindeki

kromatinlerin konformasyonel değişikliğine neden olarak bu bölgelerdeki DNA metilasyonunu tetiklerler. Son yapılan çalışmalarda ortaya çıkan deneysel bilgiler transkripsiyonel gen susturma (TGS) mekanizmalarının memeli hücrelerinde çalışabileceğini göstermektedir [18].



Şekil 2.2. RNAi mekanizması [19].

### **2.1.5.1. DICER**

Dicer enzimi, ribonükleaz (RNaz) III ailesinin bir üyesidir. Çift sarmallı RNA olan dsRNA, ve küçük RNA'lar olarak bilinen miRNA ve siRNA moleküllerini bölmek için RNAi mekanizmasında işlev gören bir endonükleaz olarak bilinmektedir [20]. Dicer'in endonükleaz fonksiyonu sadece küçük RNA biyogenezi ile değil; aynı zamanda farklı endojen ve eksojen substratların işlenmesinde de rol oynamaktadır. Dicer'in işlevi bölünme ile sınırlı olmamak ile birlikte hücresel süreçlerin düzenlenmesinde de rol oynayabilmektedir [21].

### **2.1.5.2. RNAi ve Terapötik Kullanımı**

Birkaç yüz baz çiftinden oluşan uzun dsRNA molekülleri mayalarda, bitkilerde, Drosophila'da ve Caenorhabditis'de RNAi'nin indüklenmesi için en etkili yoldur. Bununla birlikte memeli hücrelerinde başlangıçta dsRNA moleküllerinin interferon üretimini aktive ettiğinin gözlenmesi siRNA'ların eksojen olarak kullanımı konusunda cesaretleri kırmıştır [22]. Ardından yapılan çalışmalarda dsRNA molekülünün nükleotidler ile interferon üretimini aktive etmediği gözlemlenmiş ve bunun sonucu olarak RNAi'nin önce deneysel daha sonra da klinik uygulamalarının önü açılmıştır. Klinik öncesi düzeyde gerçekleştirilen farklı çalışmalar, bu moleküllerin iyi tolere edildiğini, antisens oligonükleotid (ASO) ve ribozimlere göre daha yüksek bir etkinlik ve özgüllük sergilediğini göstermiştir [23].

### **2.1.5.3. Siklin D1**

Bir proto-onkojen olarak siklin D1, farklı hücre tiplerinde G1 fazı ve S fazının ilerlemesi süresince önemli bir düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır [24]. Siklin bağımlı olan kinaz 4 ve kinaz 6 ile birlikte retinablastoma proteininin fosforilasyonu ve inaktivasyonu sonucunda hücre döngüsünün ilerlemesine destek olan aktif kompleksleri oluşturmaktadır. CDK4 aktivitesinden bağımsız olarak siklin D1'in çeşitli transkripsiyon faktörleri ve histon deasetilazin (HDAC3) aktivitesini düzenleyerek transkripsiyon modülatörü olarak işlev görmektedir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda CCND1, meme kanseri, akciğer kanseri, melanoma ve oral

skuamoz hücreli kanserde kullanımına dair çalışmalar da karşımıza çıkmaktadır. [25]

#### **2.1.6. Gen Taşınım Yöntemleri**

Gen tedavisinde klinik açıdan kullanılabilen gen transfer yöntemleri dört kategori altında incelenmektedir. Bunlardan ilki farklı moleküllerle kompleksleştirilmemiş, basitçe *in vivo* enjekte edilerek veya kültüre edilmiş hücrelerin, hücre dışı ortamlarına eklenerek uygulanmasıdır. İkinci olarak ise fiziksel yöntemler kullanılarak hücrelere nükleik asitlerin girişinin sağlanmasıdır. Üçüncü yöntemde ise lipofeksiyon ile nükleik asitlerin hücrelere taşınmasıdır. Dördüncü ve son olarak ise viral veya non- viral vektörlerin içerisine nükleik asit dizilerinin yerleştirilmesi ve ardından yüksek verimlilikte hedef hücrelerin içerisine taşınmasıdır [17, 26].

#### **2.1.7. Yıldız Polimerler ile Gen Taşınımı**

Gen taşınımı, ilaç taşınımının bir parçası olması ile birlikte; hastalığın tedavisi için plazmid DNA, siRNA, shRNA ve miRNA gibi genetik materyallerin kullanılması yönünden ilaç taşınımından ayrılmaktadır. Yıldız polimerler etkin gen aktarımı için gerekli olan, enzimler tarafından genin bozulmasını engelleyici bir görev üstlenir. Gen yüklemesi için mükemmel enkapsülasyon kapasiteleri, gen etkileşimi için küresel yapıda yük yoğunluğu oluşturan grupları fazlaca içeren ve fonksiyonellik kazandırılması için bol miktarda iç ve dış aktif gruplara sahip olmaları gibi eşsiz özellikler ile gen taşınımı için gerekli koşulların sağlanması açısından ihtiyaçları karşılamaktadır [27]. Yıldız polimerlerin molekül ağırlığı, yapı, dallanma derecesi ve yük yoğunluğu gibi özellikleri gen taşınımında değişik faktörleri etkilemektedir. Bu nedenle; bu özelliklerin kontrolü uygulama için oldukça önemlidir. Bu bilgilerden yola çıkarak yıldız polimerler için kontrollü gerçekleştirilen polimerizasyon yönteminin önemi oldukça büyüktür [27].

## **2.2. Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller**

### **2.2.1. Nanopartikül Nedir?**

Nano, kelime anlamı olarak Yunancada cüce anlamına gelmekte ve metrenin milyonda birini ifade etmektedir. Nanoteknoloji kavramının ortaya çıkması ile birlikte yapılan çalışmaların nano ölçeğe indirgenmesi ve bu ölçekte malzemelerin farklı davranışlar göstermesi incelenmeye başlanmıştır. Genel olarak 1-100 nm aralığındaki parçacıklara nanopartikül denilmektedir [28]. Nanopartiküller, yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi, yığın hallerinde bulunmayan farklı eşsiz özelliklere sahiptir. Benzersiz mekanik, termal, elektriksel, manyetik ve optik davranışlar sergileyebilirler. Bu özellikler onları elektronikten enerji toplama ve depolamaya, iletişimden biyolojiye, tıpa ve ilaca kadar geniş bir uygulama yelpazesine uygun hale getirir [29]. Nanopartiküllerin aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya olmak üzere temel olarak iki farklı üretim yöntemi mevcuttur [30]. Bunların birbirlerine göre farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Farklı malzemelerden yapılmış olan nanopartiküllerin farklı üretim yöntemleri bulunmaktadır. Nanopartikülleri temel olarak anorganik ve organik olarak sınıflandırabiliriz.

#### **2.2.1.1. Nanopartikül Türleri**

Anorganik nanopartiküllere örnek olarak altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller, demir oksit gibi manyetik nanopartiküller ya da kadmiyum, antimon, selenyum gibi elementlerden oluşan kuantum noktacıklar verilebilir. Genellikle anorganik malzemelerin tuzlarının bir indirgen madde yardımı ile indirgenmesi sonucu oluşturulan metalik nanopartiküllerin boyutları 1-2 nm kadar küçük olabilmektedir [31]. Altın nanopartiküller, altının klorür tuzunun farklı indirgenler ile tepkimesi sonucu oluşturulur. Tiyol grubu ile kolay bağ yapması nanopartikülün yüzeyinin kolayca fonksiyonelleştirilebilmesi açısından bir avantajdır. Farklı biyosensör çalışmalarında altın nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır [32]. Gümüş nanopartiküller ise genellikle gümüş nitratın indirgenmesi ile oluşturulur ve özellikle antibakteriyel yüzeylerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküller belli bir manyetik alan altında yönlendirilebilme özelliğine sahiptirler ve medikal tedavide modifiye manyetik nanopartiküllerin istenilen bölgede

tutulabilmesine olanak verirler. Kuantum noktacıkları birkaç nanometre boyutlarında olup görüntüleme amacıyla kullanılmaktadır. Genellikle kadmiyum, antimon ve selenyum tuzlarının indirgenmesi ile oluşturulan kuantum noktacıklarının üstün emisyon özellikleri vardır. Çok dar bir dalgaboyu aralığında çok şiddetli emisyon ışınması yapabilmektedirler. Silika ve titanyum nanopartiküller de anorganik nanopartiküllerdendir ve biyomalzeme ya da biyosensör alanlarında sıkça çalışılmaktadır [33].

Organik yapılardan oluşan bu nanopartiküllere örnek olarak ise dendrimerler, miseller, lipozomlar, protein yapılı nanopartiküller, karbon temelli nano yapılar, nanojeller ve yapay ya da doğal polimerik nanopartiküller verilebilir. Dendrimerler, bir çekirdek molekül üzerinde dallanmış organik moleküllerden oluşmaktadır. Dallanma sayısına göre jenerasyon sayısı bulunur. Dallanmış yapısından dolayı farklı molekülleri absorplayarak bünyesinde tutabilmektedir [34]. Miseller genellikle dış kısmı hidrofobik iç kısmı ise hidrofilik olacak şekilde tasarlanmış nano boyutta partiküllerdir. Bu yapısından dolayı özellikle suda çözünmeyen ilaçların miseller içerisine hapsedilip sulu ortamda taşınabilmesine olanak vermektedir. Suda çözünmeyen ilaçların bu şekilde tedavi için kullanımı mümkün olabilmektedir. Lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik kompartmanlara sahiptirler. Böylece aynı anda hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilme yeteneğine sahiptirler. Protein yapılı nanopartiküller proteinlerin kendiliğinden düzenlenmesi ile oluşan yapılardır. Kolay fonksiyonelleştirilebilmeleri ve doğal olmasından dolayı toksik etkilerinin olmaması gibi avantajlara sahiptir [35]. Karbon yapısından oluşan karbon nanotüp, fulleren ve grafen gibi nanopartiküller karbonun farklı allotrop yapılarından oluşan nanopartiküllerdir. Özellikle çok üstün elektriksel ve mekanik özelliklere sahip olmaları malzeme ve elektronik alanlarında kullanılabilmelerini sağlamıştır [36]. Su tutma ve şişme özelliğine sahip olan nanojeller, buldukları ortama göre şişip büzülebilen ve kontrollü salım yapan nanopartiküllerdir. Doğal ya da sentetik birçok polimerden ve bu polimerlerin birleşimlerinden (kopolimerlerden) farklı özelliklerde birçok nanopartikül sentezi literatürde bulunmaktadır. Kontrollü salım sürelerinin ayarlanabilmesi, boyutlarının ayarlanabilmesi, kolay fonksiyonelleştirilebilmesi, kararlı olması, birçok polimerin FDA onaylı olması ve immünojenik etki göstermemesi polimerik nanopartiküllerin avantajlarından biridir.



## 2.2.2. Nanopartiküllerin Medikal Uygulamaları

### 2.2.2.1. Tıbbi Teşhis

Günümüzde görüntüleme teknikleri, hastalıkların teşhisinde önemli bir yer tutmaktadır. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (CT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) bunlardan bazılarıdır. Bu görüntüleme teknikleri ile özellikle günümüzde sıklıkla görülen kanser tümörlerinin saptanması çok önemlidir. Görüntüleme cihazlarının sürekli gelişmesi ile birlikte bazı durumlarda hastanın kontrast artırıcı ajanlar kullanması gerekebilmektedir. Günümüzde bu ajanlardan daha yüksek kontrastlar elde edebilmek için nanoteknoloji devreye girmiş ve birtakım nanopartiküller kullanılarak yüksek kontrastlar elde edilmiştir. Manyetik nanopartiküllerin MRI'da kullanımı ile yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilebilmektedir [37]. *In vitro* ve *in vivo* floresan görüntülemede genellikle yeşil ve sarı organik boyalar ve metal kompleksler kullanılmaktadır. Bu tür boyalar görüntülemede uzun zamandır kullanılmakla birlikte ışıkla birlikte etkinliklerini kaybederek sönmülmektedirler. Bunun önüne geçmek için floresan boya bir takım nanopartiküller ile modifiye edilerek kullanımı sorunu çözebilmektedir. Ayrıca kuantum noktalarının kendiliğinden floresan ışımaları, fonksiyonelleştirilebilmeleri, dar bir dalgaboyu aralığında ve şiddetli emisyon vermeleri ve ışıktan etkilenmeden uzun süre stabil kalmaları gibi büyük avantajları vardır. Günümüzde, genellikle ağır metal içeren kuantum noktalarının toksisitesinin önlenmesi üzerine çalışılmaktadır.

### 2.2.2.2. Tıbbi Tedavi

Muhtemelen nanopartiküllerin tıp alanında en çok kullanıldığı yer hastalıkların tedavisidir. Çünkü nanopartiküller geleneksel tedavi yöntemlerindeki problemlerin giderilebilmesi için birçok özellik içermektedir. Özellikle geleneksel yöntemlerdeki yan etkiler ve düşük biyoyararlanım, nanopartiküller kullanılarak giderilebilmektedir. Nanopartiküller ile yapılan tedavi türleri olarak ilaç taşınımı, gen tedavisi, fotodinamik tedavi, fototermal tedavi, magnetolitik tedavi ve antimikrobiyel tedavi sayılabilir [38].

İlaç taşınımı, bir ilacın nanopartiküle enkapsülasyon, absorpsiyon, adsorpsiyon ya da konjügasyon ile yüklenmesi ve vücuda verilerek güvenli bir şekilde istenilen

yerde etki göstermesidir. Nanopartiküller ilacın taşınımı ve kontrollü salımının yanında kanserli ve diğer hastalıklı hücrelerin gösterdiği çoklu ilaç direnci etkisinin de üstesinden gelinmesini sağlar [29]. İlk çalışmalarda küçük moleküler ağırlıklı ilaçların taşınımı üzerinde çalışılırken günümüzde makromoleküler ilaçlar, peptitler, proteinler ve DNA taşınımı üzerine de çalışılmaktadır. Fotodinamik tedavi, kanser, dermatolojik bozukluklar ya da mikrobiyal enfeksiyonlar gibi farklı hastalıkların tedavisinde uygulaması olan ve ışıkla birlikte aktifleşen bir tedavi şeklidir. Genellikle porfirin gibi ışığa karşı duyarlı malzemeler içerecek şekilde üretilen nanopartiküller, hedeflenen tümör bölgesine gittiklerinde ışık altında bünyesindeki ilaçları salabilirler. Fotoduyarlı nanopartiküller biyobozunur polimerlerden, misellerden ya da lipozomlardan üretilirler [39]. Fototermal tedavide, nanopartikülün kendisi ilaç gibi davranır. Bu tür nanopartiküller kızılötesi ışığı absorplayarak 45°C sıcaklığa kadar ısınabilirler. Kanserli bölgeye hedeflenmiş bu nanopartiküllere kızılötesi ışık uygulanması sonucu tümörlü bölgedeki kanser hücreleri sıcaklık nedeniyle nekroza uğratarak öldürülebilirler. Altın nanomalzemeler fototermal tedavide sıkça kullanılmaktadır [40]. Magnetolitik tedavide, üretilen manyetik özelliğe sahip nanopartiküller dışarıdan uygulanan bir manyetik alana cevap verirler. Bunun iki farklı avantajı bulunmaktadır. Dış bir manyetik alan ile nanopartiküller istenilen yere yönlendirilerek veya istenilen yerde tutularak hedefli tedavi gerçekleştirilebilir. Diğer avantajı ise manyetik alan altında lokal ısı artırılarak tedavi gerçekleştirilebilir. Antimikrobiyal tedavide amaç nanopartiküllerin toksik etkileri kullanılarak patojenik bakteri, fungi yada virüsleri öldürmektir. Altın, gümüş ya da platin gibi metalik nanopartiküllerin yüksek yüzey enerjilerinden dolayı bu amaçla faydalanılmaktadır. En çok kullanılanlardan birisi ise gümüş nanopartiküllerdir. Yanıkların tedavi edilmesi için piyasada gümüş nanopartikül içeren topik kremler bulunmaktadır. Böylece yara ve yanıklarda oluşan enfeksiyonun önüne geçilebilmektedir.

Gen tedavisinin amacı genetik olarak miras alınan veya sonradan edinilmiş hastalıklardan kansere kadar birçok hastalığın tedavisini genetik seviyede gerçekleştirmektir [41]. İlk genetik tedavi çalışmalarında ilgili genetik bilgiyi içeren plazmidler kullanılmaktaydı. Daha sonraları virüslerden ve günümüzde ise daha çok polimerik nanopartiküllerden yararlanılmaktadır. DNA veya siRNA'nın negatif yükünden dolayı katyonik polimerler kullanılarak elektrostatik tutunma sağlanabilmektedir [42]. Katyonik kuarternar amonyum grupları içeren lipozomlar

anyonik genetik malzemeyi tutmada yüksek başarı gösterirler [43]. Polietilenimin gibi katyonik polimerlerin dallanmış yada düz zincir yapılarının gen tedavisinde kullanılması üzerine de çokça çalışma bulunmaktadır [44]. Polilaktik asit ve kitosan gibi oldukça biyouyumlu ve biyobozunur polimerler ve çeşitli modifiye edilmiş halleri ile yapılan başarılı çalışmalar da bulunmaktadır [45, 46]. Gen taşınımı için ayrıca tersiyer amin ile fonksiyonelleştirilmiş katyonik polilaktat kullanılarak katyonik nanopartiküller sentezlenmiştir. siRNA'nın taşınımı için kullanılan bu nanopartiküller ile ilgili genlerin susturulması ile prostat kanserinin tedavi edilebileceği gösterilmiştir [47].

### **2.2.3. Nanopartikül Olarak Yıldız Polimerler**

Yıldız polimerler, bir merkezi çekirdeğe sahip ki bu çekirdek; atom, küçük moleküller, nanojel, dallanmış makromolekül ve nanopartikül olabilmektedir. Oluşan bu çekirdekten yayılan en az üç makromoleküler zinciri yapısında bulunduran kompleks makromoleküler yapıya sahip bir polimerdir. Yıldız polimerler eşsiz topolojik yapılara sahip olmaları, ilgi çekici fiziksel ve kimyasal özellikleri ile sıklıkla kullanılan yapılara dönüşmüşlerdir. Üç boyutlu küresel yapıları sayesinde enkapsülasyon kapasiteleri oldukça iyidir [48, 49]. Aynı molekül ağırlığına sahip lineer türevleri ile kıyaslandığında; yıldız polimerler seyreltik çözeltilerde daha düşük çözelti viskozitesi gösterirler. Bunun nedeni ortamda daha az kol dolaşıklığı gözlenmesidir. Buna ek olarak iç ve çevresel aktif grupları değişik ve değerli fonksiyonelite göstermede çalışılabilme imkanı oluşturur. Yıldız polimerler yüksek yoğunluklu fonksiyoneliteye sahip olmalarından ötürü etki-tepki mekanizmaları oldukça iyidir. Dendritik polimerlerin üç boyutlu küresel yapısına benzer olmakla birlikte dendritik polimerlerin tipik dallanmış kolları ve yoğun kabuğu ile karşılaştırıldığında yıldız polimerler, kol uzunluğunun artması ile kabuk yoğunluğunu düşürerek viskozite ve esneklik gibi özelliklerde farklı sonuçlar ortaya çıkmasını sağlar [50, 51] Yıldız polimerler göreceli olarak basit doğrusal kollar ve maksimum sınırlı kol uzunluğundan dolayı nispeten daha düşük sterik engel oluşturacak şekilde yapılar ortaya koymada elverişlidir. Yıldız polimerler genellikle iki tip olarak kategorize edilirler. Bunlardan ilki düzenli yıldız polimerler diğeri ise miktoarm yıldız polimerler olarak karşımıza çıkmaktadır [52]. Düzenli yıldız polimerler, homopolimer kollar ve blok kopolimer kollar da dahil olmak üzere aynı kol bölümlerine sahipken;

düzensiz yıldız polimerler, farklı kimyasal yapıları, topolojileri, molekül ağırlıkları ve fonksiyonel grupları içeren asimetric mimarilerine bağlı olarak birkaç farklı alt gruba ayrılabilirler [53, 54]. Hem yıldız yapısı hem de blok yapısının avantajları ile miktoarm yıldız polimerler, biyomedikal uygulamalar için yeni morfolojik ve çok moleküllü yapıların hayata geçirilmesinde yer alması beklenen polimerlerdendir.

### **2.2.3.1. Yıldız Polimerlerde Fonksiyonellik**

Yıldız polimerlerin çok sayıda iç ve dış aktif gruplara sahip olmaları nedeni ile fonksiyonellendirilmeleri oldukça etki edilebilir olmaktadır. Bununla birlikte yıldız polimerlerin spesifik biyomedikal amaçlarına bağlı olarak bir fonksiyona kavuşturulmaları da söz konusudur [55].

### **2.2.3.2. Uyarıya Karşı Cevap Oluşturabilme**

Uyarıya karşı cevap oluşturan polimerler, çevre koşullarındaki nispeten küçük değişikliklere yanıt olarak önemli derecede karşı cevap oluşturabilmektedir. Özelliklerin değişiminde yapısal değişiklikler, geri döndürülebilir çözünürlük varyasyonları ve farklı yapılara geri dönüşümlü kendiliğinden düzenlenmeyi içerir. Özellikle yıldız polimerlerin uyarıya karşı cevap oluşturmaları, yıldız polimerlerin eşsiz fiziki/ kimyasal özellikleri, pH' a karşı oluşturulan tepki açısından çok daha kompakt yüklü grupların neden olduğu iç ozmotik basınç nedeni ile lineer polimerlere göre belirgin bir fark gösterir [56]. Kol sayısı, zincir uzunluğu ve çekirdek şekli gibi moleküler mimarilerin özelliklerinin yıldız polimerlerin uyarıcıya karşı oluşturdukları tepkilerini büyük ölçüde etkilediği kanıtlanmıştır. Tipik olarak etki- tepki uygulaması yapılan yıldız polimerler, enzimatik reaksiyonları, redoks potansiyelindeki değişimi, ışık, ısı ve pH'a karşı duyarlı bir şekilde çalışabilmektedir. Örnek olarak pH duyarlı yıldız polimerler ilaç/gen taşınımı için efektif bir taşıyıcı olarak kullanımı göze çarpmaktadır [57].

### **2.2.3.3. Biyouyumluluk**

Biyoyumluluk, doku mühendisliği, ilaç/gen taşınımı ve biyomedikal tanı için çeşitli ve kompleks fizyolojik koşullarda kullanılan tüm biyomalzemelerin temel ve en üst

düzeydeki gereksinimidir. Biyouyumluluk yoksunluğu genellikle sitotoksiste, inflamasyon ve bağışıklık sisteminde oluşturulan tepkiler gibi daha ciddi problemlere yol açabilecek birçok istenmeyen fizyolojik etkiye neden olur [58]. Dolayısı ile biyomedikal uygulamalar için yıldız polimerlerin iyi biyolojik uyumluluğa sahip olmaları gerekmektedir. Buradan yola çıkarak doğal ve fonksiyonellendirilebilir yapıya sahip ve biyolojik olarak parçalanabilir polimerler gibi birçok biyouyumlu molekül, biyomedikal amaçlar için biyouyumluluk sağlamak amacı ile yıldız polimerlere dönüştürülmüştür. Yıldız polimerlerin biyouyumlulukları ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur [59, 60].

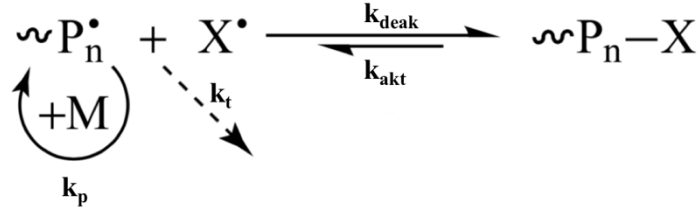
## **2.3. Yıldız Polimer Sentez Yöntemleri**

### **2.3.1. Kontrollü Yaşayan Polimerizasyon**

Michael Szwarc tarafından bulunan yaşayan anyonik polimerizasyon polimer bilimi üzerinde oldukça büyük etki yaratmış ve çeşitli gelişmelere neden olmuştur. Çalışması sentetik polimer kimyası ve polimer fiziğinde büyük gelişmelerin önünü açmıştır. Ayrıca iyi tanımlanan polimerlerin sentezi, polimer yapısının dizaynında kontrolün sağlanması açısından da yeni bir pencere açmıştır.

Zincir büyüme polimerizasyonundan transfer ve sonlanma reaksiyonlarının ortadan kalkması Szwarc'ın buluşunun temelini oluşturmuştur. Szwarc'ın geliştirdiği bu teknik ilk olarak akademik uygulamalarda yerini almış ancak endüstriyel uygulamalara hızlı bir şekilde adapte edilmiştir. Anyonik polimerizasyon adını verdiği bu yöntem ile ortamda monomerler tükenene kadar sürmüş ve daha sonrasında ortama monomer eklendiğinde polimerizasyon kaldığı yerden devam etmiştir. Buradan yola çıkarak yaşayan polimerizasyon terimi ortaya çıkmıştır [61]. Kopolimerlerin anyonik polimerizasyon ile sentezinde blok uzunluklarının kontrolünün kesin olarak sağlanabilmesi için hızlı bir başlama basamağı ve buna nispeten yavaş bir büyüme basamağı gereklidir. Bu tip hassas makromoleküler sentezlerin gerçekleştirilmesi için zincir kırılma reaksiyonlarının (sonlanma ve zincir transferi) etkisinin minimuma indirilmesi ile tüm zincirlerin eş zamanlı ve anında gerçekleştiği başlatma basamağı gereklidir. Bu tip sentezler için yaşayan polimerizasyon kavramı kullanılır. Normalde radikal polimerizasyonunda hızlı başlama ve sonra erme basamakları ele alındığında, yavaş başlama yolu ile

ilerleyen ve ortamda bulunan zincirlerin herhangi bir anda ölü olması bakımından radikal polimerizasyonu ile bir çelişki göstermektedir [62].



Şekil 2.3. Kontrollü polimerizasyon reaksiyonu [62].

Radikal ve kontrollü radikal polimerizasyonu arasındaki fark ve benzerlikler şunlardır;

Kontrollü radikal polimerizasyonu ve radikal polimerizasyonu aynı radikal mekanizma yolu ile ilerlemektedir. Benzer kemo-, regio- ve stereo- seçicilik sergilemekle birlikte benzer bir monomer yelpazesinde polimerize edilebilirler. RP ve CRP arasındaki benzerlikler ve farklılıklar ele alınacak olursa;

- Büyüyen zincirlerin ömrü, uykuda olan türler ve tersinir aktivasyonun katılımı ile radikal polimerizasyonunda yaklaşık 1 saniye civarında iken kontrollü radikal polimerizasyonunda 1 saatten fazla uzatılmıştır.
- Radikal polimerizasyonunda başlama basamağı yavaştır ve serbest radikal başlatıcı çoğu zaman ortamda tüketilmeden kalır. Kontrollü radikal polimerizasyonunda ise başlama basamağı çok hızlıdır ve neredeyse tüm zincirlerin anlık büyümesine imkan verir. Bunun sonucunda ise zincir mimarisi üzerinde kesin kontrol sağlanmaktadır.
- Radikal polimerizasyonunda tüm zincirler neredeyse ölü iken, kontrollü radikal polimerizasyonunda <%10 şeklindedir.

- Kontrollü polimerizasyon genellikle radikal polimerizasyonundan daha yavaştır. Bununla birlikte bazı durumlarda oranlar karşılaştırılabilir olabilmektedir.
- Radikal polimerizasyonunda kararlı bir durum oluşturacak konsantrasyon, benzer başlama ve sonlanma oranları ile kurulurken, kontrollü radikal polimerizasyonu sistemlerinde aktivasyon ve deaktivasyon oranlarının dengelenmesi sonucunda sabit bir radikal konsantrasyonlarına ulaşılır.
- Radikal polimerizasyonunda sonlandırma genellikle uzun zincirler ve radikal polimerizasyonunda sürekli olarak üretilen yeni zincirler arasında gözlemlenir. Kontrollü radikal polimerizasyonunda ise tüm zincirler aynı anda oluşmuş ve reaksiyonun erken aşamalarında kısa durumdadırlar. Bu zincirler zaman içerisinde uzun bir forma geçerler. Bunun sonucu olarak sonlandırma, zamanla önemli ölçüde azalır [63].

### **2.3.2. Yaşayan Radikal Polimerizasyonu/ Kontrollü Radikal Polimerizasyonun Sınıflandırılması**

Kontrollü/ Yaşayan radikal polimerizasyonunda, büyüyen serbest radikaller ve uyku halindeki türler arasında oluşturulan dengeyi sağlama prensibi ele alınır. Ortaya çıkan bu polimerizasyon sistemlerinde molekül ağırlıkları, polidispersite ve istenilen son işlev üzerinde kesin kontrol elde edilmesini sağlamak için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu sistemler mekanizmaya ve aynı zamanda uyuyan türlerin yapısına bağlı olarak sınıflandırılabilirler. Günümüzde ATRP, NMP ve RAFT gibi yöntemler diğer yöntemlerle kıyaslandığında en etkili yöntemler olmaları sebebi ile karşımıza çıkmaktadırlar [64].

### 2.3.2.1. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)

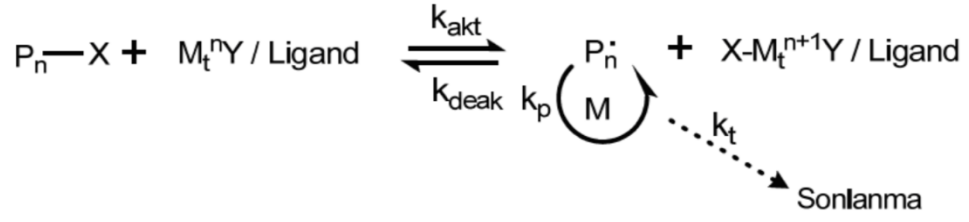
ATRP ilk kez Matyjaszewski, Wang ve Sawamoto tarafından birbirlerinden ayrı olarak gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda 1995 yılında ortaya atılmış bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır [65, 66]. Tekniğin ilk olarak ortaya çıkma mantığı ATRA denilen “atom transfer radical addition” yöntemi üzerinden incelenmektedir. ATRP’de uygun katalizör ve başlatıcının geliştirilerek kullanılması ile polimerizasyon ortamında polimer zincirlerinin aynı anda büyümesinin sağlanması, atom transfer basamağı ile sağlanmaktadır.

Günümüzde ATRP polimerizasyonu ticari olarak bulunabilen ve aynı zamanda ucuz olan katalizörlerin kullanılıyor olması, kolay olarak hazırlanabilen başlatıcıların bulunması, deneysel düzeneklerin hazırlanmasının kolay oluşu açısından oldukça ilgi gösterilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. ATRP en güçlü sentetik yöntemlerden biridir. Bunun nedeni polimer biliminde fonksiyonel materyallerin hazırlanmasına yönelik dar molekül ağırlığı dağılımı gösteren polimerlerin sentezi ve arzu edilen bileşim ve moleküler mimarinin sağlanmasına izin verir. Bu teknikle çeşitli organik, inorganik nanokompozitler, biyokonjugatlar ve diğer kompleks nano yapıları malzemeler de sentezlenebilmektedir. Başarılı bir ATRP gerçekleştirmek için geçiş metali kompleksi, reaksiyon ortamında en azından çözünebilir. ATRP reaksiyonları homojen veya heterojen koşullar altında gerçekleştirilebilmektedir. Aktivatör ve deaktivatörlerin konsantrasyonlarının hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi daha dar bir molekül ağırlığı dağılımı sağlar. Reaksiyon sıcaklıkları tipik olarak oda sıcaklığından 150°C’ye kadar uygulanabilmekle birlikte, sisteme uygun olarak da değiştirilebilmektedir. Reaksiyon basınç veya vakum altında gerçekleştirilebilmektedir [67].

ATRP sisteminde genellikle Cu, Fe, Ru geçiş metali olarak kullanılmaktadır [68]. Bu metal ile birlikte alkil halojenürler başlatıcı olarak görev yapmaktadır. Katalizör olarak uygun bir metale bağlı alkil halojenürün amin grubu taşıyan uygun bir molekül ile kompleks oluşturmuş ligand sistemi şeklinde kullanılır. Sistemde ligand, bağlandığı Cu(I)Br’nin redoks potansiyelini düşürmek için kullanılmaktadır. Bu sistemlerin etkileşimleri sonucunda ortamda alkil radikalleri oluşmaktadır. Oluşan bu radikaller polimerizasyonun başlatılmasında kullanılmaktadır. Ortamda serbest halde bulunan brom radikali, oluşan bu alkil radikalleri ile reaksiyon vererek



polimerizasyonu durdurur. Bu reaksiyonda aktivasyon-deaktivasyon işlemleri ardı ardına gerçekleşerek polimerizasyonun kontrollü bir şekilde ilerlemesini sağlar [69].



Şekil 2.4. ATRP mekanizması;  $M_t^n$ : Geçiş metali, L: Kompleks ligand,  $P_n$ : Polimer zinciri, X: Br veya Cl [69]

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çerçevesinde gerçekleştirilen çalışmalar, 3 ana bölümden meydana gelmektedir. Çalışmanın ilk bölümünde taşıyıcı olarak kullanılacak olan yıldız polimerlerin sentezi üzerine yoğunlaşmıştır. siRNA'ların hücre içerisine taşınabilmesi için PEG tabanlı, azot içeren çekirdeğe sahip yıldız polimerler, ATRP tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. Yıldız polimerlerin sentezi aşamasında polimer sisteminden alınan örnekler Zeta-Sizer Nano ZSP cihazı kullanılarak incelenmiş ve polimer sisteminde polimerin ortalama molekül ağırlığının karakterizasyonu yapılmıştır. Polimerik nanopartiküllerin boyutları Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazından faydalanılarak bulunmuş ve taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise polimerik nanopartiküller siRNA'lar ile etkileştirilerek polimer kompleksler oluşturulmuş ve siRNA'ların sentezlenen yapı ile kompleks oluşturup oluşturmadıkları Qubit 3.0 cihazı ile incelenmiştir. siRNA ile yüklenen polimerik yıldız tipi nanopartiküllerin terapötik olarak etkinlikleri larinks kanseri hücre hattı HEP-2 (ATCC-İngiltere) kullanılarak *in vitro* incelemesi yapılmış ve gen ifadenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazı ile ortaya konmuştur.

#### 3.1. Kimyasallar

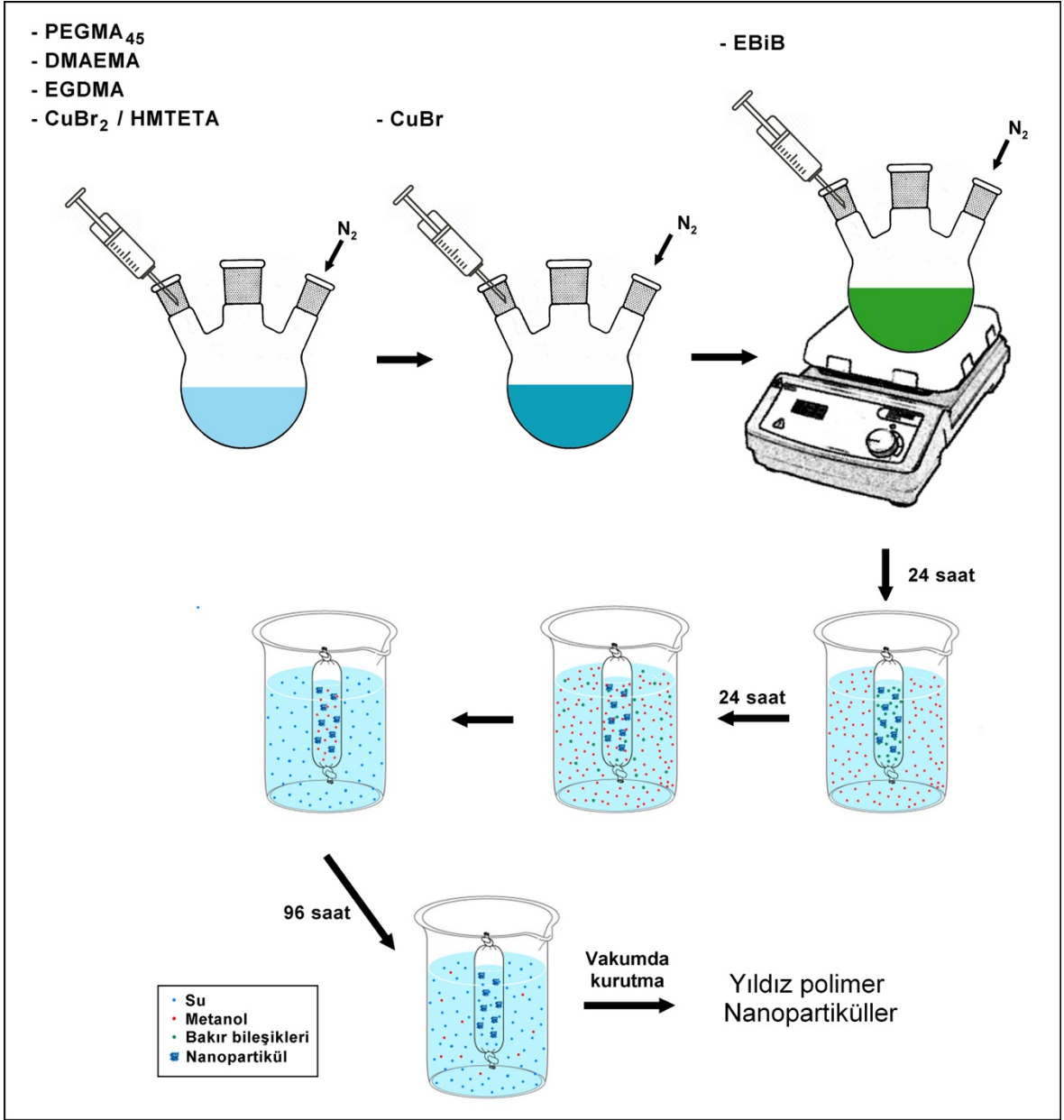
Bu tez çalışması kapsamında yapılan ve hazırlanan nanopartiküllerin sentezinde 1,1,4,7,10,10-heksametiltriethylentetraamin (HMTETA), poli(etilenglikol) metil eter metakrilat (PEGMA), 2-(dimetilamino)etil metakrilat (DMAEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), etil 2-bromoizobutirat (EBiB), Bakır(I)bromür, Bakır(II)bromür, metanol, toluen, hidroklorik asit Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

#### 3.2. Yıldız Tipi Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

##### 3.2.1. Yıldız Polimerlerin Sentezi

Yıldız tipi polimerik nanopartiküllerin sentezi, ATRP yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde öncelikle ATRP için katalizör olacak olan

CuBr<sub>2</sub>/HMTETA kompleksi oluşturmak için gerekli olan CuBr<sub>2</sub> (6 mg, 0.03 mmol), HMTETA (162 µL, 0.6 mmol) üç boyunlu balona 30 mL metanol ve 1,5 mL toluen içerisine alınmıştır. Ardından balon içerisine PEGMA (6,24 g, 3.0 mmol), DMAEMA (1 mL, 6 mmol), EGDMA (567µL, 3 mmol) gerekli oranlarda, alümina kolondan geçirilerek içerilerinde bulunan inhibitörlerden arındırıldıktan sonra çözücü içerisine aktarılmıştır. Balonun içerisindeki reaksiyon ortamı azot gazı yardımı ile oksijenden arındırılmış ve içerisine, CuBr (81 mg, 0.57 mmol) azot gazı altında ilave edilmiştir. Azot gazı ile inert bir ortam sağlanmış olmakla birlikte reaksiyonu durdurucu etki gösteren oksijen de ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Başlatıcı olan EBiB (88,9 µL, 0.6 mmol) karışıma enjekte edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Polimerizasyona 24 saat boyunca 60 °C'ye ayarlanmış yağ banyosu içerisinde devam edilmiştir [70]. Bu aşamadan sonra sentezlenen yıldız tipi polimerler bir gün boyunca reaksiyon ortamında bulunan bakır bileşikleri ve polimerleşmeden kalan moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması için metanole karşı diyaliz membranından geçirilmiş ve ardından 4 gün boyunca membran içerisindeki metanolün uzaklaştırılması için saf suya karşı diyaliz membranında bekletilmiştir. Son olarak diyaliz membrandan geçirilen yıldız polimerler vakum altında kurutulmuştur.



Şekil 3.1. Yıldız polimer nanopartiküllerin sentez basamakları.

### 3.2.2. Yıldız Polimerlerin Karakterizasyonu

#### 3.2.2.1. Molekül Ağırlığı Dağılımının Belirlenmesi

ATRP yöntemi ile hazırlanan PEG tabanlı, azot çekirdeğe sahip yıldız polimerlerin sentezinden sonra polimerin kullanıma uygunluğu çeşitli yöntemlerle incelenmiştir. Bu yöntemlerin başında jel geçirgenlik kromatografisi ya da diğer adı ile boyut dışlama kromatografisi gelmektedir. GPC yardımı ile sentezlenen polimerin molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı incelenmiştir.

### **3.2.2.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Sentezlenen yıldız tipi polimerlerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. TEM görüntüsü alınan örnekler üzerinde şekil ve boyut dağılımı açısından değerlendirme yapılmıştır.

### **3.2.2.3. Kimyasal Yapısının Belirlenmesi**

Manyetik alan içerisine alınan ve kendi spini olan bir çekirdeğin uygun frekans aralığında bir radyo dalgasının fotonu ile rezonansa girmesi ilkesi ile çalışan spektroskopik yöntem, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile bileşiğin yapısı, bağlanma özellikleri ve polimerlerin yapısal düzenleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Yapılan çalışmada yıldız tipi polimerlerin yapısının aydınlatılması ve istenilen reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği bu yöntem ile analiz edilmiştir.

### **3.2.2.4. Yıldız Polimerlerin Boyut Analizi**

Zeta Sizer, çözeltideki partiküllerin molekül ağırlığı, zeta potansiyel ve hidrodinamik boyut ölçümü için kullanılan bir cihazdır. Partiküller için ölçülebilir sınırlar; boyut için 5 nm ile 10 mikron arası, zeta potansiyel için ve molekül ağırlığı için 1-20,000 kDa arasındadır. Bu cihaz, nanopartiküller, kolloidler ve biyomoleküller için çözeltideki partiküllerin boyutlarının tayininde kullanılabilir. Dinamik ışık saçılması, en son teknoloji ile 1  $\mu\text{m}$ ' den küçük olan ve sub-mikron bölgesindeki partikül ve moleküllerin boyutlarının ölçümünde kullanılan bir tekniktir. Çözeltiden lazer saçılmasının meydana gelmesi ile Brownian hareketinin hızı, partiküllerin boyutunun hesaplanmasında kullanılabilir. Sentezlenen yıldız tipi polimerlerin boyut ve boyut dağılımlarının belirlenmesi için TEM yöntemi ile elde edilen verileri karşılaştırmak amacı ile Zeta- Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır.

### **3.2.2.5. Yıldız Polimerlerin Yüzey Yükü Analizi**

Sentezlenen yıldız tipi polimerlerin yüzey yükü analizi için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan polimerlerin yüzey yükleri, siRNA yükleme ve partiküllerin hücre içerisine enkapsülasyonlarının değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin yüzey yüklerinin hangi değerlere sahip oldukları Zeta-Sizer cihazı ile incelenmiş ve çalışmanın ilerleyen aşamalarından biri olan sentezlenen yıldız tipi polimerlerin protonlanması aşamasından önce yıldız tipi polimerlerin yüzey yük değerlerine bakılmış ve protonlanan ile protonlanmayan polimerlerin yüzey yükü kıyaslaması için kullanılmıştır.

### **3.2.3. Yıldız Polimerlerin Protonlanması**

Elde edilen yıldız polimerlerin siRNA bağlanması ve hücre enkapsülasyonunun artırılması amacı ile polimerin çekirdeğinde bulunan NH<sub>2</sub> grupları protonlanarak zeta potansiyelinin daha pozitif değerlere çekilmesi amaçlanmıştır. Bunun için sentezlenen polimer saf su ile hazırlanan pH: 2, HCl (Hidroklorik asit) çözeltisi içerisinde 8 saat boyunca 25°C sıcaklıkta karıştırılmış ve ardından vakum altında kurutulmuştur.

### **3.3. Yıldız Polimerlerin siRNA yükleme Çalışması**

Tez kapsamında Siklin D1 geninin susturulması için siRNA (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Kullanılan siRNA etkinliği kanıtlanmış olan ticari siRNA'dır. Sentezlenen yıldız polimerlere etkin siRNA konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacı ile değişik oranlarda siRNA bağlanmış ve en etkin siRNA konsantrasyonları bulunmuştur.

#### **3.3.1. siRNA Yükleme Veriminin İncelenmesi**

siRNA yükleme veriminin tespitinde Qubit 3.0, Thermo Fisher Scientific cihazından yararlanılmıştır. Bu cihaz yüksek hassasiyette DNA, RNA ve mikroRNA ölçümü yapabilen, floresan tabanlı bir kantitatif analiz yöntemidir. Sitotoksikite çalışmaları sonucunda belirlenen toksik olmayan optimum partikül miktarı baz alınarak sabit

miktarda ssDNA partiküller ile etkileştirilmiş ve ssDNA'nın farklı partikül miktarlarında bağlanma verimi analiz edilmiştir. 2,8 mg partikül, 1 mL nükleaz-free suda çözülmüştür. Hazırlanan 2,8 mg/mL' lik partikül çözeltisinden her bir mini-santrifüj tüpüne belirlenen oranlarda alınarak siRNA ile etkileştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sabit miktarlarda alınan ssDNA içerisine farklı konsantrasyonlarda partikül eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübe edilerek bağlanmanın gerçekleşmesi beklenmiştir. İnkübe edilen partiküllerin ssDNA bağlanmasının hesaplanması için inkübasyonun gerçekleşmesinin ardından her bir deney grubu için partiküller 15000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminin ardından alınan örneklerden süpernatantlar alınmış ve süpernatantta bulunan bağlanmayan ssDNA'ların özel floresan boya yardımı ile boyanmasının ardından Qubit 3.0 cihazı ile ölçümler gerçekleştirilmiş ve bağlanma verimleri hesaplanmıştır.

### **3.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışması**

Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin siRNA ile kompleks yapının olduğu yapılan Qubit 3.0 cihazı ile gözlemlenmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi, partikül ile siRNA arasında bağlanmanın gerçekleştiğinin gösterilmesi için destek bir çalışma olarak yapılmıştır.

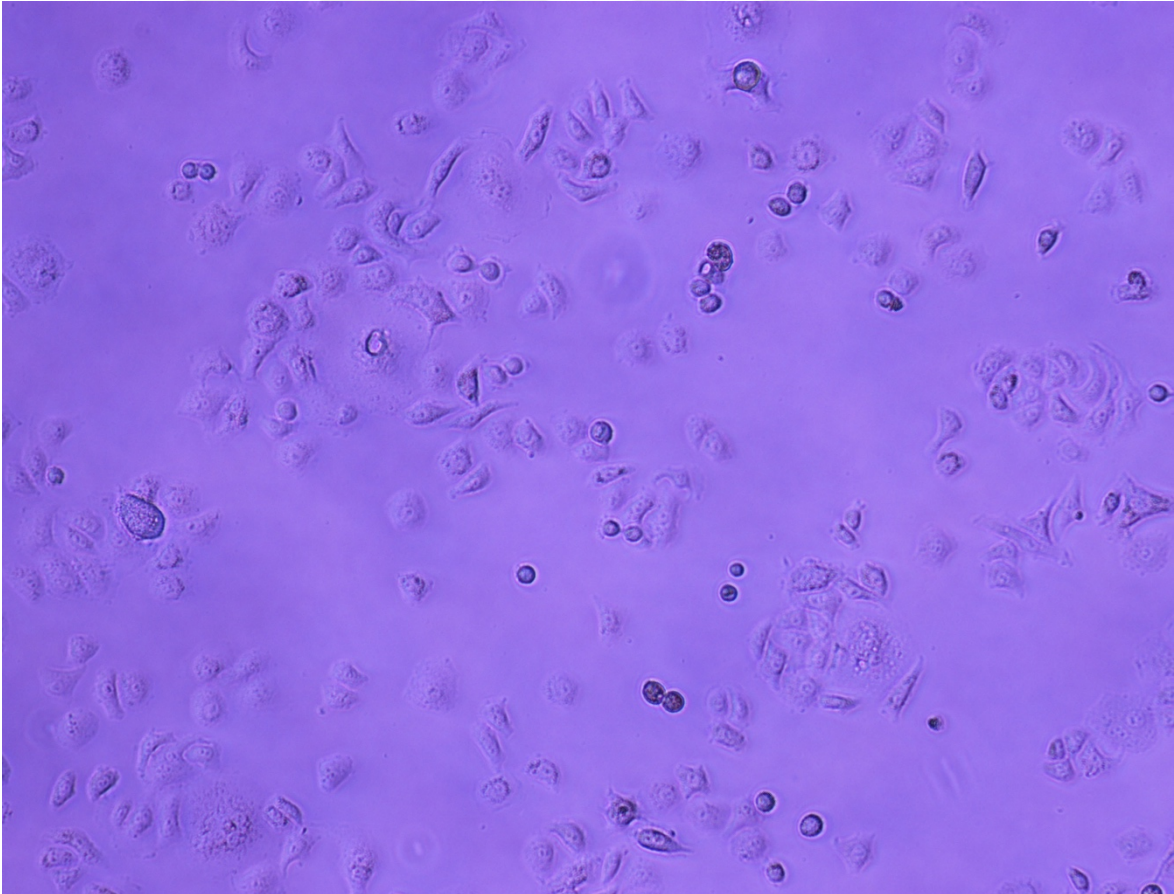
Örnekler 2:1 örnek/boya çözeltileri olarak hazırlanmış ve jelde bulunan kuyucuklara siRNA bağlanan örneklerin santrifüj edilmesi sonucunda oluşan süpernatantları ile boş siRNA yüklemesi yapılmıştır. 75 V, 30 dakika sabit akım kullanılarak örneklerin jelde yürütülmeleri sağlanmıştır. Yürütme işleminin ardından jelin görüntülenme işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Yıldız Polimerlerin Hücre Etkileşim Çalışmaları**

Yapılan çalışmanın bu aşaması, larinks skuamoza hücre karsinomu olan HEp-2 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerik nanopartikülün hücre etkileşimi indirekt sitotoksosite ve ilgili gen ifadeleme seviyesinin ölçülmesi açısından incelenmiştir.

### 3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Kültüre Edilmesi

Kriyotüpler kullanılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklanan HEP-2 hücreleri, dondurucudan alınarak çözülmesi sağlanmıştır. EMEM (Eagle' s Minimum Essential Medium) içerisinde %10 FBS (Fetal Sığır Serum) olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır. Çözülme işlemi gerçekleştirilen HEP-2 hücreleri falkon tüp içerisine alındıktan sonra üzerine 4 mL hazırlanmış olan besi yerinden eklenmiştir. Bu işlemden sonra hücrelerin bulunduğu falkon tüp 3000 rpmde 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisinde bulunan süpernatant atılmış ve pellet besi yeri ile süspansiyon edilerek flasklara aktarılmıştır.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatöre alınan flasklar 24 saatte bir kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının incelenmesi için kontrol edilmiştir. Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında kültürler tripsin enzimi yardımı ile kaldırılmış ve pasajlanarak yeni flasklara aktarılmıştır.



Şekil 3.2. HEP-2 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.



Çizelge 3.1. Hücre kültüründe uygulanan koşullar.

Hücre Türü	Larinks Kanseri Hücre Hattı (HEp-2)
Kültür Kabı	25 cm <sup>3</sup> lik polistiren flask, yüzeyi hücre tutunmasına uygun
Kültür Vasatı	%10 Fetal sığır serumu içeren EMEM
Rutin sub-kültür	1/4
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	5 mL
pH	7,2-7,5
Sıcaklık	37±0,5°C
İnkübasyon Ortamı	% 5'lik CO <sub>2</sub> etüvü

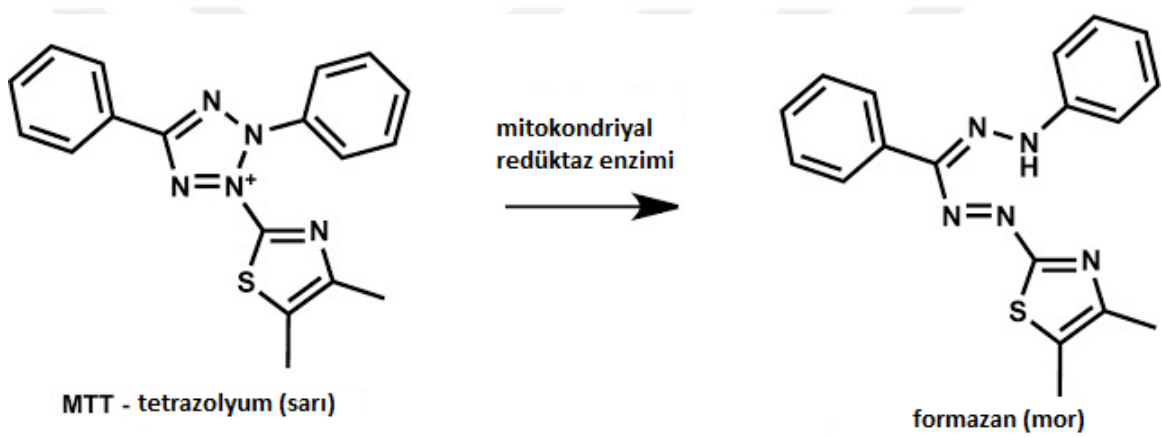
Flasklara aktarılarak çoğaltılan HEp-2 kanser hücreleri yüzeyleri kaplama oranlarına bakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Flask yüzeyleri kaplandıktan sonra hücre vasatı atılarak PBS ile hücrelerin yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından tripsin-EDTA eklenen hücrelere inkübatöre alınarak 3-4 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop yardımı ile kontrol edildikten sonra taze besi yeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 2 ml taze besi yeri ile süspanse edilmiştir. Bu işlemin ardından hücre sayımı hücrelerin tripan mavisi ile boyandıktan sonra thoma lamı aracılığı ile mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Sayımda maviye boyanan hücreler ölü olmakla birlikte parlak renkte ve boyanmamış olarak gözükten hücreler ise canlıdır.

#### 3.4.2. Sitotoksisite Çalışması

Sentezlenen yıldız polimerlerin siRNA ile etkileştirilmeden önce hücreler üzerinde oluşturdukları toksik etkilerin değerlendirilmesi için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle HEp-2 hücreleri 96 kuyucuklu plakalar yardımı ile inkübatör içerisinde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) kültüre edilerek kullanılmıştır. Farklı miktarlarda

polimerik partikül içeren deney grupları vasatı atılan hücreler üzerine eklenerek 24 saat boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

MTT testi hücrelerin canlılığının ortaya konması için tasarlanmış sitotoksisite testlerinden biridir. Bu test yardımı ile incelenmek istenen sitotoksisite oranları tespit edilebilir. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin tetrazolyum boyasını indüklemesinden yola çıkarak oluşturulmuş kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücreler sarı renkli olan tetrazolyum tuzlarını mor renk oluşturan formazan kristallerine dönüştürülmesi gerçekleştirir.



Şekil 3.3. MTT-tetrazolyum'un formazan kristallerine dönüşümü

Tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşümünün ardından, oluşan formazan kristalleri HCl'in izopropil alkol ile hazırlanan seyreltik çözeltisi ile çözülmesi sağlanır. Çözünme sonucunda oluşan mor renkli çözeltilerin absorban değerleri spektrofotometre yardımı ile ölçülür ve hücre aktiviteleri, hücre canlılıkları bu şekilde hassas bir biçimde ortaya konur. Çalışan bu yöntem ile hangi partikül miktarının hücreler üzerinde toksik etki yaratmadığı hesaplanmış ve bu aşamadan sonra gerçekleştirilen hücre çalışmaları hesaplanan bu optimum değer üzerinden gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.2.1. Gerçek Zamanlı PCR Analiz Çalışması

Tez kapsamında çalışılan hedef genin larinks kanseri hücrelerine verilen siRNA aracılığı ile baskılandığını göstermek için Gerçek Zamanlı-PCR (RT-PCR) analiz çalışması yapılmıştır. Çalışmaya başlanmadan önce HEp-2 larinks kanseri hücreleri ile 6 kuyucuklu plakalarda kültür çalışması yapılmış ve her kuyucukta  $2,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Yapılan bu işlemin ardından hücreler 24 saat inkübasyon işleminden geçirilmiş ve tez kapsamında çalışılan deney grupları ile etkileştirilmişlerdir. Bu gruplar sabit siRNA miktarlarının, farklı partikül miktarları ile etkileştirilerek 100:1, 10:1 partikül/siRNA oranları sağlanacak şekilde çalışma gerçekleştirilmiştir. 48 saat süre ile deney grupları ile etkileştirilen hücreler total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi için toplanmışlardır.

RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi için Zymo Research Quick-RNA Mini Prep kiti kullanılmıştır.

- Hazırlanmış olan örneklerin üzerine 300  $\mu$ L lizis tamponu eklenmiş ve hücrelerin kaldırılması için vorteks kullanılmıştır. Bu işlemin ardından kaldırılan hücreler oda sıcaklığında 2 dakika süresince inkübe edilmiştir.
- Oluşan çözelti RNA izolasyon kolonuna aktarılarak 14000 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- Lizat çözeltilerinin üzerine 300  $\mu$ L etanol eklenerek pipetaj işleminden geçirilmiştir.
- Oluşan çözelti ikinci bir RNA izolasyon kolonuna aktarılmış ve 30 saniye boyunca santrifüjden geçirilmiştir. Ardından santrifüj sonucunda tüp altında biriken çözelti ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Gerçekleştirilen bu işlemin ardından izole edilen RNA'lar ile birlikte DNA'ların da izole edilmiş olma ihtimaline karşı DNaz I ekleme işlemi uygulanmış ve DNA'lar uzaklaştırılmıştır. Bu işlem için kolonlar üzerine 80  $\mu$ L DNaz I çözeltisi eklenmiştir. DNaz I ekleme işleminin ardından 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu işlemlerin ardından kolonlar üzerine 400  $\mu$ L

RNA hazırlama tamponu eklenmiş ve 30 saniye 14000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır.

- Kolonlar üzerine sırası ile primer tamponu ardından ise sekonder tampon eklenerek izole edilen RNA'lara yıkama işlemi uygulanmıştır.
- Yıkama işleminin ardından 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmış ve fazla etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- RNA izolasyonu gerçekleştirilen tüpler RNA/DNA içermeyen tüpler içerisine yerleştirildikten sonra üzerlerine 100 µL elüsyon tamponu eklenmiş ve 1 dakika boyunca inkübasyon işleminden geçirilmiştir.
- 14000 rpm'de 1 dakikalık santrifüj işlemi uygulanarak RNA'ların tüpte birikmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazında kontrol edilmiştir. 500-800 ng/µL olarak bulunan konsantrasyonlar, deneyde sürekliliğin sağlanması açısından 100 ng/µL olacak şekilde seyreltme işleminden geçirilmiştir.

Çizelge 3.2. RNA hazırlama kiti ile izole edilen RNA miktarları.

<b>Deney Grubu</b>	<b>İzole Edilen RNA Miktarı (ng/µL)</b>
Naked siRNA (280 ng)	518.8
Naked siRNA (700 ng)	566.3
Naked siRNA (1400 ng)	473.7
Naked siRNA (2800 ng)	550.2
Partikül:siRNA (280 µg:2800 ng)	614.9
Partikül:siRNA (280 µg:1400 ng)	551.5
Partikül:siRNA (280 µg:700 ng)	551.2
Partikül:siRNA (280 µg:280 ng)	529.4
Kontrol	569.8

#### cDNA Sentez İşlemi:

- İzole edilen RNA'lardan, geleneksel PCR cihazı (Veriti, Applied Biosystems) kullanılarak Jena Bioscience Script cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific) yardımı ile eşlenik DNA sentezlenmiştir.
- Yapılan optimizasyon deneylerinin sonucunda, her tüpün hacmi 20 µL olacak şekilde aşağıda verildiği gibi solüsyonlar hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Eşlenik DNA sentezinde kullanılan çözeltilerin miktarı.

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim (µL)</b>
RNA Örneği	2
RNAz içermeyen su	9
Primer	1.0
cDNA Tampon Çözeltisi	4.0
dNTP Çözeltisi	2.0
RNase İnhibitörü	1.0
Reverse Transkriptaz Enzimi	1.0
Toplam	20

- Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan tüpler, belirlenen reaksiyon koşulları altında normal PCR cihazı yardımı ile inkübe edildi.

Çizelge 3.4. PCR cihazında uygulanan sıcaklık programı.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>
25°C	5 dk
43°C	60 dk
70°C	5 dk

- Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PCR uygulaması yapılmadan önce elektroforez yardımı ile yürütülerek kontrol edilmiş ve -80°C'de saklanmıştır.

### Gerçek Zamanlı PCR Çalışması

- Gen analizlerine geçmeden önce kullanılacak olan siklin D1 ve ABCT primerlerinin 10 mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır.
- Primer optimizasyonları gerçekleştirilerek, sekans uzunlukları, GC oranları ve molekül ağırlıkları dikkate alınarak uygun PCR koşulları belirlenmiştir.
- Gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucunda, reaksiyon her tüpte 20 µL hacimde, aşağıda verilen koşullarda 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Siklin D1 sentezinde uygulanan sıcaklık programı.

Sıcaklık	Süre
25°C	5 dk
43°C	60 dk
70°C	5 dk

- 20 µL tüp hacmi aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen 20 µL'lik hacmin içeriği.

Bileşen	Hacim (µL)
qPCR Master Mix	10
RNAz içermeyen su	6.8
F Primer	0.6
R Primer	0.6
Örnek	2.0
Toplam	20

- Tüm örnekler aynı reaksiyon içerisinde, karşılaştırmalı Ct metodu ile 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. ACTB (beta aktin) referans gen olarak kullanılmıştır.
- Deneyle Viia7 cihazında PowerUp Syber Green Master Mix (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. QuantStudio Teal Time PCR Software Version 1.2. yazılımı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.
- Primerlerin data kılavuzunda belirtildiği şekliyle reaksiyonun etkinliği 1 olarak kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Yıldız Polimerlerin Karakterizasyonu

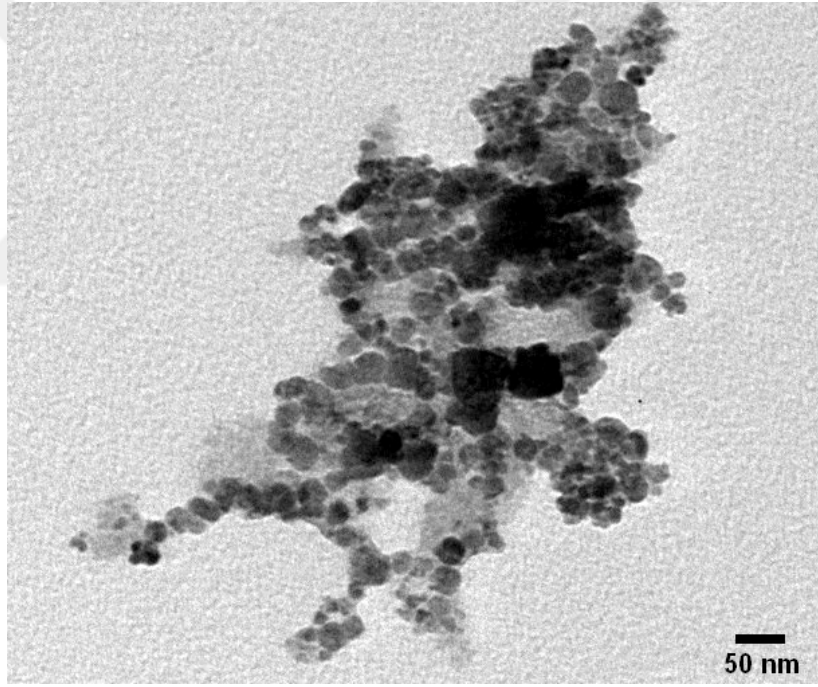
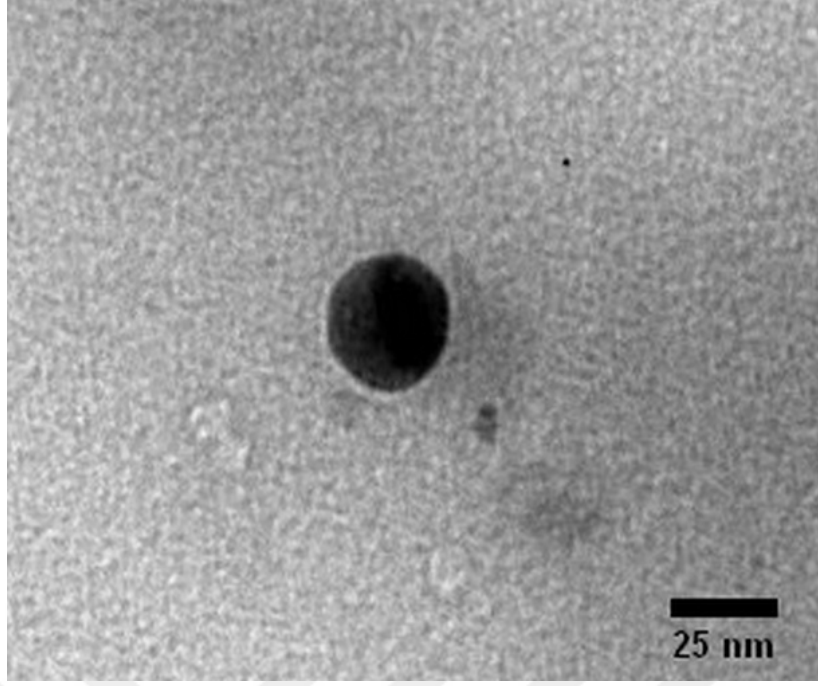
#### 4.1.1. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Sentezlenen yıldız tipi polimerlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi aşamasında elde edilen polimerlerin çapraz bağlı olmaları nedeni ile GPC yönteminde standart kolonların kullanımı sonuç vermemektedir. Bu nedenden ötürü molekül ağırlıklarının tayini farklı bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde Zeta-Sizer Nano ZSP cihazından faydalanılmıştır. Yöntemde ortalama molekül ağırlığı net bir şekilde ölçülmek ile birlikte GPC yönteminde olduğu gibi örneklerin bileşenlerine ayrılarak analizi yapılan molekül ağırlığı dağılımı verilememektedir. Deneyler genellikle bir lazer olan yüksek yoğunluklu, tek renkli bir ışığın makromolekül içeren çözeltilerin oluşturduğu ışık saçılımı yoğunluğunun bir veya birden fazla dedektörler yardımı ile ölçülmesi ile gerçekleşir. Bu yöntem ile çözelti içerisinde bulunan makromoleküller statik ışık saçılımı tekniği ile ölçüme tabi tutulmuşlardır. Çözeltilerin bilinen konsantrasyonları ile bir dizi kalibrasyon işleminin ardından ölçümler gerçekleştirilmiştir. GPC yöntemi ile yapılan ölçümler sonucunda sentezlenen nanopartiküllerin molekül ağırlığı dağılımı ( $M_w/M_n$ ) 1,11 olarak hesaplanmıştır. Zeta-Sizer Nano ZSP cihazı ile yapılan ortalama molekül ağırlığı ölçümlerinde ise ortalama molekül ağırlığının  $124 \times 10^3$  olduğu gözlenmiştir.

#### 4.1.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Yıldız tipi polimerlerin morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile TEM cihazından yararlanılmıştır. Elde edilen TEM görüntülerinden partiküllerin morfolojik yapısı incelenmiştir. Yapılan incelemeler şekil 4.1'de gösterilmiş ve incelemeler sonucunda partikül boyutlarının 15 ila 25 nm aralığında ve küresel yapıda oldukları gözlemlenmiştir.





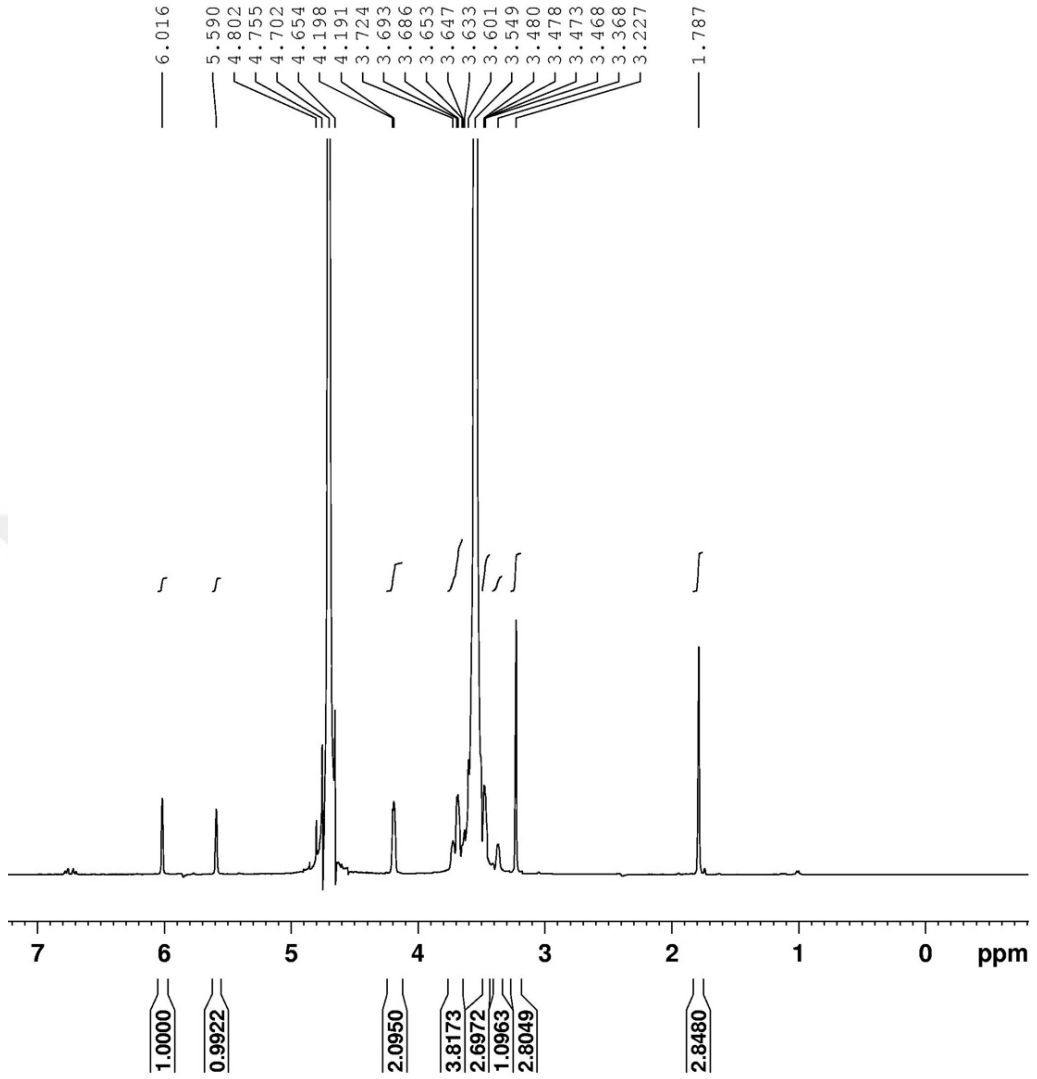
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin farklı büyütmelelerde elde edilmiş TEM görüntüleri

#### 4.1.3. Kimyasal Yapı Karakterizasyonu

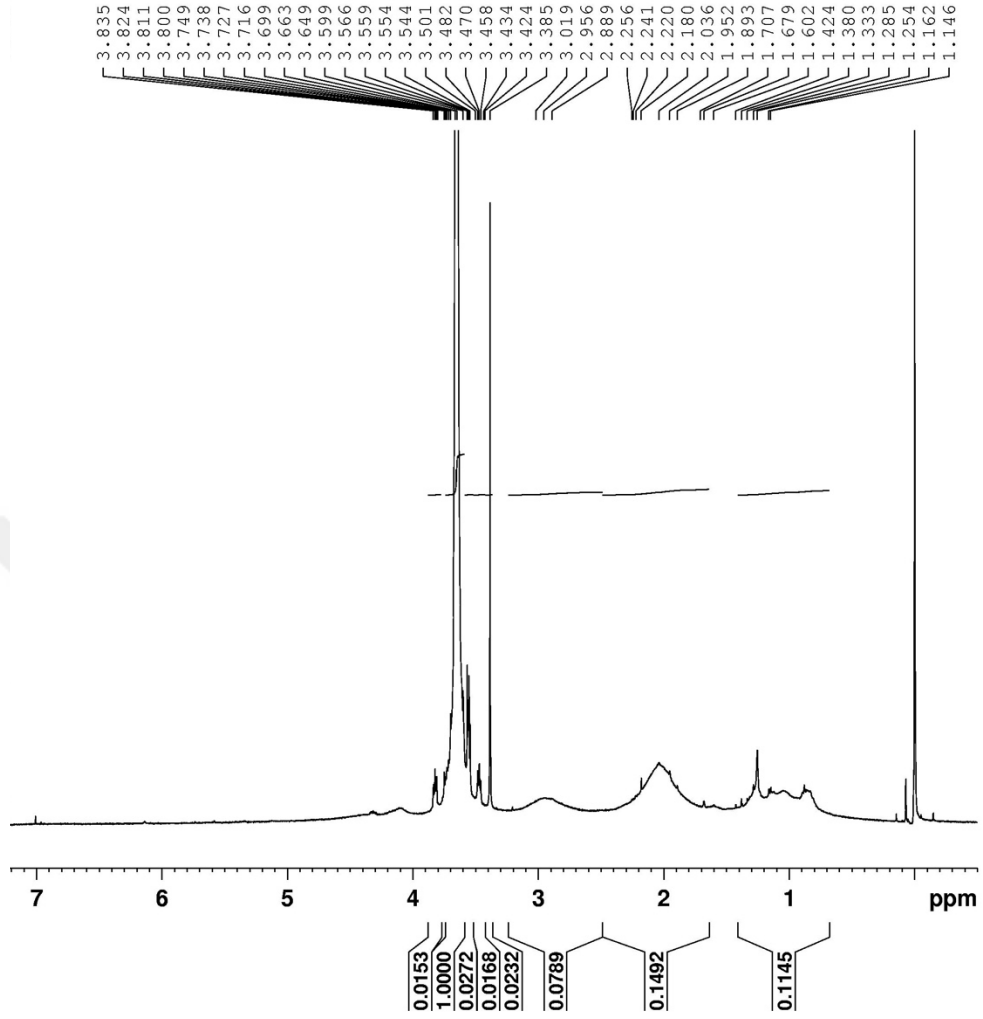
Deneyler sonucunda sentezlediğimiz polimerik nanopartiküllerin sahip oldukları yapısal özelliklerin belirlenebilmesi için Nükleer Manyetik Rezonans yöntemi ile karakterizasyondan faydalanılmıştır. Buradan yola çıkarak sentez aşamasında gerçekleştirilen polimerizasyon yönteminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği

gösterebilmek amacı ile elimizde bulunan monomer olan PEGMA, sentezlenen ürün ile kıyaslanmış ve yorumlar gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin  $^1\text{H}$  NMR spektrumları Bruker cihazında çözücü olarak  $\text{CDCl}_3$  kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonda monomer olarak kullanılan PEGMA molekülünün Şekil 4.2'de görülen  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda 5-6 ppm aralığında görülen iki adet pik bu moleküle ait olan metakrilat bölgesindeki  $-\text{CH}_2$  moleküllerinden ileri gelmektedir. Polimerizasyon sonucunda elde edilen ürünün şekil 4.3'te görülen  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu incelendiğinde ise monomerde bulunan 5-6 ppm bölgesinde görülen iki adet  $-\text{CH}_2$  molekülündeki hidrojenlere ait piklere rastlanmamıştır. Bu da gerçekleşen polimerizasyon sonucunda ortamda monomerin kalmadığı ve monomerlerin başarılı bir şekilde polimerleştiğinin bir göstergesidir. Ayrıca sentezlenen ürünün  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda 1 ppm bölgesinde çıkan  $-\text{CH}_3$  gruplarının polimerleşmeden kaynaklı tekrarlayan birimler ile sayılarının artmasının bir sonucu olarak piklerin genişlediği gözlenmiştir.



Şekil 4.2. PEGMA molekülünün <sup>1</sup>H- NMR spektrumu.



Şekil 4.3. Sentezlenen yıldız polimer nanopartikülün  $^1\text{H}$ - NMR spektrumu.

#### 4.1.4. Boyut ve Yüzey Yüğü Analizi

Hazırlanan yıldız polimer partiküller, deiyonize su yardımı ile seyreltilmiş ve polistiren küvet içerisine alınan seyreltilmiş yıldız polimer partiküller Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak boyut ve yüzey yüğü analizi gerçekleştirilmiştir. Alınan her ölçüm üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Yıldız polimerlerin boyut, yüzey yükü ve PDI değerleri.

Partikül	Boyut (nm)	Zeta (mV)	PDI
Asitten Geçirilmemiş Örnekler	15,1 ±0,5	7,76 ±1,1	0,38 ±0,010
Asitten Geçirilmiş Örnekler	17,1 ±0,2	17,4 ±0,7	0,36 ±0,013

Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere 2M HCl çözeltisi ile muamele edilen partiküllerin yüzey yükleri muamele edilmeyenlere oranla pozitif değerlere kayma göstermiş ve bu sayede negatif yüke sahip siRNA'ların sentezlenen polimer nanopartiküllerin yüzeyine tutunma olasılıkları daha da arttırılmıştır. Ayrıca yapılan işlemin partiküllerin boyut ve boyut dağılımı üzerinde gözle görülür bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

## 4.2. Yıldız Polimerlerin Yüklenme Veriminin İncelenmesi

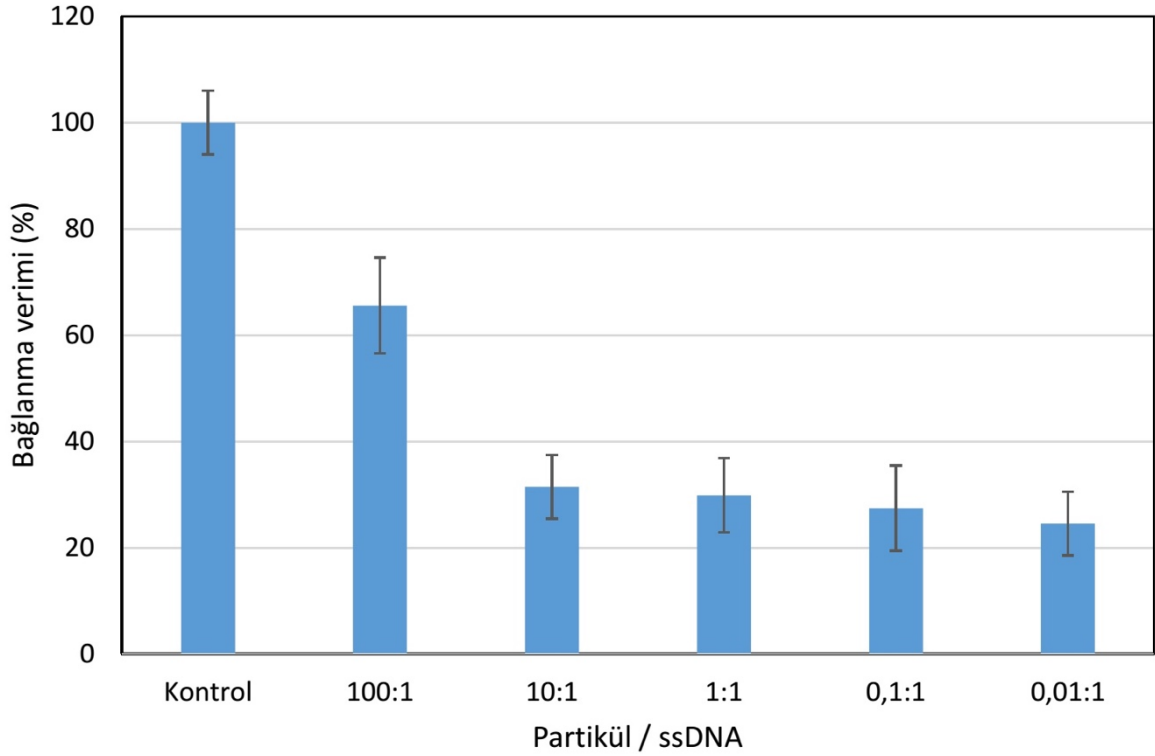
### 4.2.1. Qubit 3.0 Cihazı ile Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Sitotoksikite çalışmaları sonucunda belirlenen toksik olmayan optimum partikül miktarı olan 280 µg/1 mL en yüksek derişim kabul edilmiş ve buna göre 100:1, 10:1, 1:1, 0.1:1, 0.01:1 partikül/ssDNA (w/w) alınarak 7500 ng sabit ssDNA miktarlarında bağlanma verimi analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada siRNA yerine ssDNA kullanılmasının nedeni; bağlanmanın ölçülmesi için uzun sürelerde çalışılacak olması nedeniyle ssDNA'ya göre daha kırılğan olan siRNA'nın uzun süreli çalışmalara elverişli olmamasıdır. Çalışmada 2,8 mg partikül, 1 mL nükleaz içermeyen suda çözülmüştür. Hazırlanan stok partikül çözeltisinden yukarıdaki verilen oranlarda alınarak her bir mini santrifüj tüpündeki sabit ssDNA'lar ile etkileştirilmiştir. Sabit miktarlarda alınan ssDNA içerisine farklı konsantrasyonlarda partiküller eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübe edilerek bağlanma gerçekleştirilmiştir. İnkübe edilen partiküllerin ssDNA bağlanmasının hesaplanması için inkübasyonun gerçekleşmesinin ardından her bir deney grubu için partiküller 15000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminin ardından alınan örneklerden süpernatantlar alınmış ve süpernatantta bulunan bağlanmayan ssDNA'ların özel floresan boya yardımı ile boyanmasının ardından Qubit 3.0 cihazı ile ölçümler gerçekleştirilmiş ve

bağlanma verimleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler, aşağıda deney grupları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı partikül oranlarında, 7500 ng sabit ssDNA miktarlarında Qubit 3.0 cihazı ile yapılan ölçümlerde okunan değerler (ng/mL). (n=3)

Partikül/ssDNA (w/w)	İnkübasyon (ng/mL)			
	4 saat	12 saat	24 saat	48 saat
100:1	2580 ±427	2290 ±421	2420 ±402	2300 ±410
10:1	5140 ±152	4480 ±165	4620 ±154	4840 ±138
1:1	5260 ±163	4910 ±146	4670 ±155	4700 ±140
0,1:1	5440 ±179	6840 ±148	7320 ±123	7110 ±118
0,01:1	5660 ±131	7050 ±123	7500 ±89	7500 ±96



Şekil 4.4. Partiküller ile 4 saat inkübe edilmiş ssDNA'nın bağlanma verimi grafiği.

Yapılan deneyler sonucunda en fazla partikül miktarı oranına sahip 1. deney grubunda 100:1, 4 saat inkübasyon sonucunda ortamda serbest halde bulunan ssDNA miktarının azaldığı gözlemlenmiş ve ortamda bulunan partiküller ile ssDNA'ların bağlanma gösterdiği görülmüştür. Partikül miktarları az olan deney gruplarında bağlanmanın da düştüğü gözlemlenmiştir. İlerleyen deney sürelerinde

100:1, 10:1 ve 1:1 oranlardaki deney gruplarının bağlanma verimlerini korudukları ancak 0.1:1 ve 0,01:1 orana sahip deney gruplarının bağlanma verimlerini kaybettiği, yapılan 48 saatlik bağlanma verimi ölçümlerinin ardından gözlenmiştir.

#### 4.2.2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışması ile Yükleme Veriminin İncelenmesi

Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin ssDNA ile kompleks yapıların oluşturulduğu yapılan Qubit 3.0 cihazı ile gözlemlenmiştir. Agaroz jel elektroforez yönteminde ise partikül ile siRNA arasında bağlanmanın gerçekleştiğinin gösterilmesi ve Qubit 3.0 cihazı ile yapılan çalışmaya destek amaçlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Örnekler 2:1 örnek/boya çözeltileri olarak hazırlanmış ve jelde bulunan kuyucuklara siRNA bağlanan örneklerin santrifüj edilmesi sonucunda oluşan süpernatantları ile boş siRNA yüklemesi yapılmıştır. 75 V, 30 dakika sabit akım kullanılarak örneklerin jelde yürütülmeleri sağlanmıştır. Yürütme işleminin ardından jelin görüntülenme işlemi gerçekleştirilmiş ve şekil 4.5' te görülen sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforez çalışması.

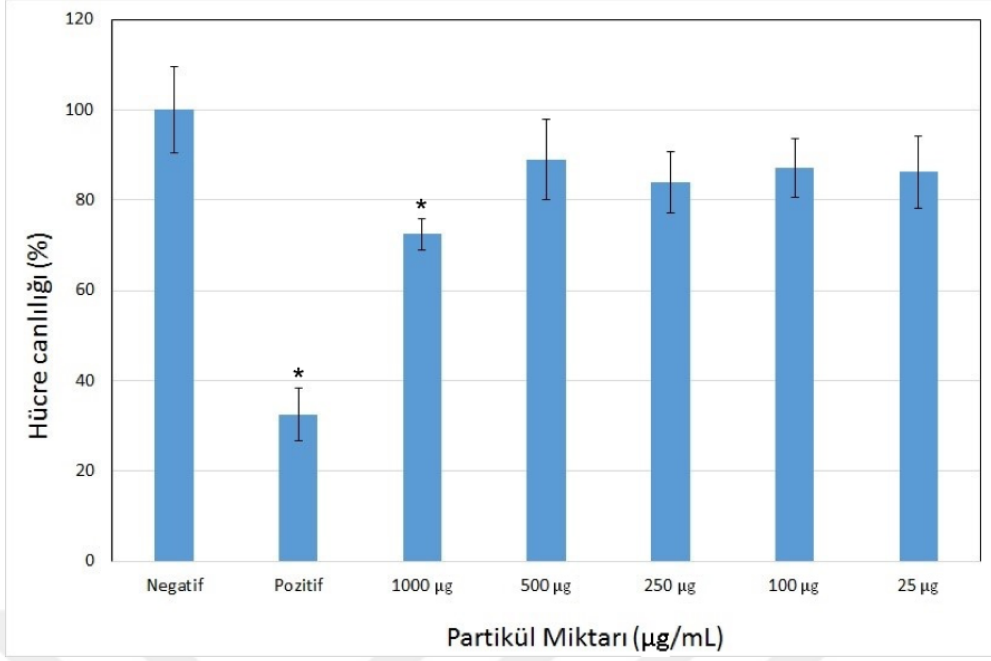
Elde edilen agaroz jel elektroforez verileri incelendiğinde, şekilde en parlak gözükten bölge partiküller ile muamele edilmemiş çıplak siRNA'dır. Partikül/siRNA (w/w) oranı

bir başka deyişle kütle oranları ile bağlantılı olarak, polimerde bulunan amin gruplarının mol oranlarının, siRNA içerisinde bulunan fosfatlara oranı (N/P) arttığında, bağlanma veriminin de yükseldiği gözlenmiştir. Buradan yola çıkarak Qubit 3.0 çalışmasında da olduğu gibi elde edilen veriler incelendiğinde, bağlanma verimi en fazla olan 100:1 (w/w) orana sahip partikül/siRNA grubu olarak görülmüştür.

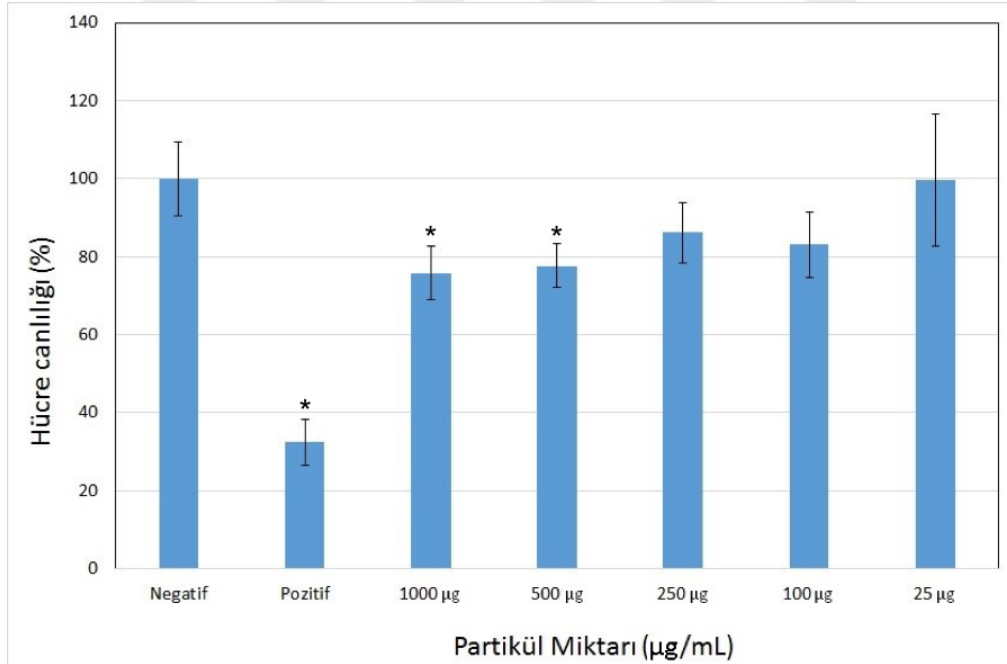
#### **4.3. Yıldız Polimerlerin Sitotoksosite Analizi**

Sentezlenen nanopartiküllerin siRNA etkileştirme aşamasından önce partiküllerin biyoyumluluklarının gösterilmesi için MTT testi kullanılmıştır. Sitotoksosite çalışmalarında da gen susturma aşamasında kullanılacak olan HEp-2 insan larinks kanseri hücre hattı kullanılmış ve hücreler 96 kuyucuklu plakalarda kültüre edilmişlerdir. MTT testinde farklı partikül derişimleri içeren deney grupları 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Aşağıda verilen %hücre canlılığı tabloları incelendiğinde asitle muamele edilen ve edilmeyen iki deney grubu sonuçlarında yükselen partikül derişimlerinde toksik etki gösterdiği, ancak 500 µg partikül ve bunun azalan miktarlarını içeren çözeltilerde %hücre canlılığının istenilen aralıklarda olduğu gözlemlenmiştir. Test sonuçları üzerinde tek yönlü ANOVA testi uygulanmış ve  $p < 0.05$  baz alınarak istatistiksel olarak pozitif kontrole göre anlamlı fark oluşan gruplar belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda asit ile muamele edilmemiş deney gruplarında pozitif kontrole göre anlamlı fark sadece 1000 µg partikül kullanılan deney grubu olarak gözlenmiştir. Ardından asit ile muamele edilen gruplar üzerinde yapılan çalışmada uygun aralık %80 ve üzeri canlılık gösteren ve anlamlı farkın oluşmadığı aralık olan 250 µg/mL ile 500 µg/mL belirlenmiştir. Bu gruplar içerisinde de anlamlı istatistiksel fark oluşmadığını belirlediğimiz aralıklar arasındaki değer olan 280 µg/mL çalışma konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.





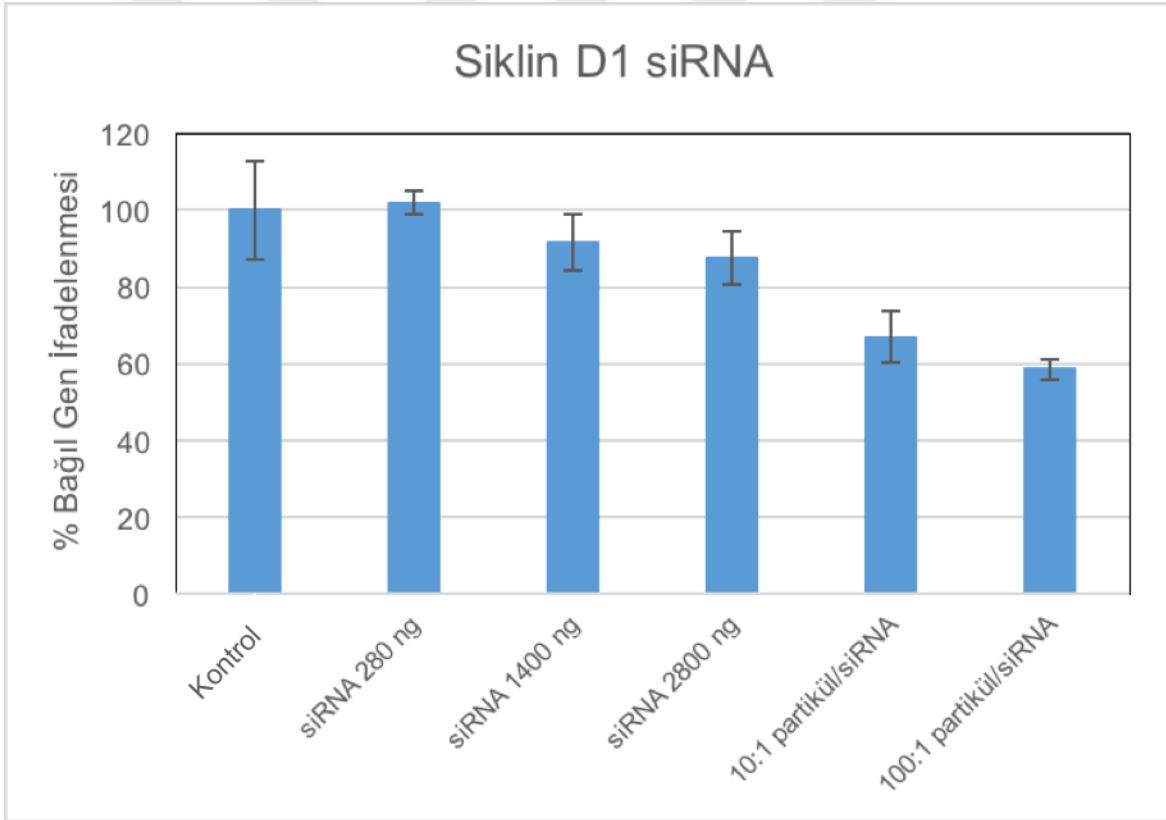
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda asit ile muamele edilmemiş yıldız polimer nanopartiküllerin % canlılık (sitotoksisite) grafiği ( $p < 0.05$ ). (\*)  $p < 0.05$  baz alındığında anlamlı fark olan grupları göstermektedir.



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda asit ile muamele edilmiş yıldız polimer nanopartiküllerin % canlılık (sitotoksisite) grafiği ( $p < 0.05$ ). (\*)  $p < 0.05$  baz alındığında anlamlı fark olan grupları göstermektedir.

#### 4.4. Yıldız Polimerler ile RT-PCR Çalışması

Siklin D1 geninin hücrelere verilmiş olan siRNA ile baskılandığını göstermek amacı ile Gerçek-Zamanlı PCR analizinden yararlanılmıştır. Yapılacak olan çalışma için 6 kuyucuklu plakalarda her kuyucukta  $2,0 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde HEp-2 hücreleri ekilmiştir. 24 saat süren inkübasyon işleminden geçirilen hücreler farklı deney grupları ile 48 saat muamele edilmişlerdir. Çalışma gruplarından izole edilen RNA'lar cDNA'ya dönüştürülmek için bölüm 3.4.2.1'de açıklanan prosedür izlenmiştir. Siklin D1 gen ifadenmesinin inhibe edildiğini gösterebilmek amacı ile gen ifade analiz çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerin analizleri yapılmış ve hedeflenen genin ne kadar inhibe edildiği referans olarak seçilen genin ifadenme seviyesi ile kıyaslanarak aşağıda verilen sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı miktarlardaki partiküller ile etkileştirilmiş siRNA'lar ile sadece siklin D1'in HEp-2 hücreleri ile etkileştirildikten sonra elde edilen Gerçek-Zamanlı PCR sonuçları.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde partiküller ile etkileştirilmeyen farklı miktarlardaki siRNA'ların eklenen miktarları ile orantılı olarak en fazla bağlı gen

susturma, yaklaşık %15 bağıl gen susturması gösteren 2800 ng (10 µL) siklin D1 siRNA içeren hücre grubunda gözlenmiştir. Taşıyıcı olarak kullanılan partiküller, partiküller ile etkileştirilmeden kullanılan çıplak siRNA'lar ile kıyaslandığında gen susturmasında daha başarılı oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca bağlanma verimi en yüksek olan partiküllerin (100:1) yaklaşık %43 bağıl gen susturması gösterdiği yapılan çalışma ile ortaya konmuştur. 100:1 ve 10:1 deney gruplarında sabit siRNA miktarı olarak 2800 ng siRNA kullanılarak, kütlece 100 kat ve 10 kat partikül ile etkileştirilmişlerdir.



## SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında *in vitro* olarak gerçekleştirilen gen tedavisi uygulaması için taşıyıcı sistem olarak yıldız polimerler sentezlenmiş ve larinks kanserinin gen tedavisi uygulamasındaki başarısı araştırılmıştır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar incelendiğinde;

- Çalışma kapsamında ilk olarak yıldız polimerler siRNA taşınımı için taşıyıcı sistem olarak sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır.
- Sentezlenen polimerik nanopartiküller boy-boy dağılımı ve yüzey yükleri açısından değerlendirilmiş ve bu parametreler incelendiğinde siRNA'nın yapısından kaynaklı olarak uygun bir taşıyıcı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği H-NMR ve TEM teknikleri aracılığı ile ortaya konmuştur.
- Yapılan zeta potansiyel çalışmalarında protonlanan nanopartiküllerin pozitif değere kaydıkları gözlemlenmiştir.
- siRNA yükleme çalışmalarında elde edilen veriler değerlendirildiğinde farklı miktarlarda partikül ile çalışılmış ve bağlanma verimi spektrofotometrik olarak Qubit 3.0 ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda %65,6 ile en iyi bağlanma verimi gösteren nanopartikül/siRNA (w/w) oranı 100:1 olarak gösterilmiştir. Ayrıca bağlanma veriminin en yüksek elde edildiği 100:1 oranı agaroz jel elektroforez yöntemi ile de desteklenmiştir.
- Nanopartiküllerin *in vitro* kullanımı için sitotoksikite çalışmalarında MTT testi uygulanmış ve hem asit ile muamele edilmiş partiküllerin hem de asit ile muamele edilmemiş partiküllerin ciddi bir toksik etki göstermediği sonucuna varılmış ve bu aşamadan sonra asit ile muamele edilip yüzey yükü pozitif değerlere kayan partiküller ile çalışılmış, toksik olmayan optimum çalışma miktarı 280 ug/mL olarak hesaplanmıştır.

- Yapılan bağlanma verimi çalışmalarında elde edilen veriler değerlendirildiğinde düşük nanopartikül miktarlarında partiküllerin belirli bir süre sonrasında siRNA taşıma kapasitelerinin düştüğü hatta ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. 100:1, 10:1 ve 1:1 partikül/siRNA (w/w) oranlarına sahip olan partiküllerin 48 saat inkübasyon süresince bağlanma verimi ölçümlerinden yola çıkarak stabilitelerini korudukları ortaya konmuştur.
- Yapılan RT-PCR analizlerinde bağlanma verimi en yüksek olan 100:1, 10:1 partikül/siRNA oranları kullanılmış ve siRNA ile etkileştirilen partiküllerin çıplak siRNA'lara oranla daha etkili oldukları ve gen baskılamada çıplak siRNA'ya oranla daha başarılı sonuçlar verdikleri görülmüştür.
- Bu sonuçlardan yola çıkarak sentezlenen yıldız polimerler ile larinks kanseri hücre hattı olan HEp-2 hücreleri üzerinde siRNA tedavisi uygulamasında siklin D1 geni kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] UICC, "Preface and Methodology: 2014 Cancer Medicines Review," 2015.
- [2] Belgian Cancer Registry, "Cancer prevalence in Belgium," *Belgian Cancer Regist.*, vol. 26, no. 2, pp. 74–76, 2010.
- [3] A. Urruticoechea, R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals, and G. Capella, "Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [4] A. Sudhakar, "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli," *J Cancer Sci Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 1–4, 2010.
- [5] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [6] G. I. Evan and K. H. Vousden, "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 342–8, 2001.
- [7] L. A. Pray, "Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick," *Nat. Educ.*, vol. 1, no. 1, p. 6, 2008.
- [8] C. Sherr, "Cancer cell cycles," *Science (80-. )*, vol. 274, no. 1995, p. 1672, 1996.
- [9] L. Chin and J. W. Gray, "Translating insights from the cancer genome into clinical practice," *Nature*, vol. 452, no. 7187, pp. 553–563, 2008.
- [10] E. Summary and P. H. Relevance, "Locally Advanced Squamous Carcinoma of the Head and Neck," *Review of Cancer Medicines*, pp. 1–8, 2014.
- [11] C. E. Steuer, M. El-Deiry, J. R. Parks, K. A. Higgins, and N. F. Saba, "An update on larynx cancer," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 67, no. 1, pp. 31–50, 2017.
- [12] L. Licitra, L. Licitra, Bernier J., Grandi C., Locati L., Merlano M., Gatta G., Lefebvre J. L., "Cancer of the larynx," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 47, no. 1, pp. 65–80, 2003.
- [13] I. J. Fidler, "The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 453–458, 2003.
- [14] M. Arruebo, N. Vilaboa, B. Saez-Gutierrez, J. Lambea, A. Tres, M. Valladares,

- A. Gonzales-Fernandes, "Assessment of the evolution of cancer treatment therapies," *Cancers (Basel)*., vol. 3, no. 3, pp. 3279–3330, 2011.
- [15] M. Das, "Androgen deprivation therapy for prostate cancer," *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 10, p. e567, 2017.
- [16] S. Worgall and R. G. Crystal, *Gene Therapy*, Fourth Edi. Elsevier, USA, 2013.
- [17] M. Giacca, *Gene therapy*, Springer, Italy, 2010.
- [18] M. Tijsterman and R. H. A. Plasterk, "Dicers at RISC: The mechanism of RNAi," *Cell*, vol. 117, no. 1, pp. 1–3, 2004.
- [19] A. Aigner, "Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs," *J. Biotechnol.*, vol. 124, no. 1, pp. 12–25, 2006.
- [20] R. W. Carthew and E. J. Sontheimer, "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs," *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 642–655, 2009.
- [21] M.-S. Song and J. J. Rossi, "Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity," *Biochem. J.*, vol. 474, no. 10, pp. 1603–1618, 2017.
- [22] G. J. Hannon and J. J. Rossi, "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference," *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 371–378, 2004.
- [23] A. K. Vaishnaw, J. Gallop, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougerolles, J. Maraganore,, "A status report on RNAi therapeutics," *Silence*, vol. 1, no. 1, pp. 1–13, 2010.
- [24] J. P. Alao, "The regulation of cyclin D1 degradation: Roles in cancer development and the potential for therapeutic invention," *Mol. Cancer*, vol. 6, pp. 1–16, 2007.
- [25] E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, and R. L. Sutherland, "Cyclin D as a therapeutic target in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 8, pp. 558–572, 2011.
- [26] K. Wang, F. M. Kievit, and M. Zhang, "Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies," *Pharmacol. Res.*, vol. 114, pp. 56–66, 2016.
- [27] W. Wu, W. Wang, and J. Li, "Star polymers: Advances in biomedical

- applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 46, pp. 55–85, 2015.
- [28] P. N. Prasad, *Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering*. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA, 2004.
- [29] M. E. Davis, Z. Chen, and D. M. Shin, “Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 771–782, 2008.
- [30] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, “Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, 2007.
- [31] R. A. Sperling and W. J. Parak, “Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, no. 1915, pp. 1333–1383, 2010.
- [32] K.-S. Kim, D. Dembereinyamba, and H. Lee, “Size-Selective Synthesis of Gold and Platinum Nanoparticles Using Novel Thiol-Functionalized Ionic Liquids,” *Langmuir*, vol. 20, no. 3, pp. 556–560, 2004.
- [33] X. Chen and S. S. Mao, “Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 7, pp. 2891–2959, 2007.
- [34] J. M. Frechet, “Functional polymers and dendrimers: reactivity, molecular architecture, and interfacial energy,” *Science (80-. )*, vol. 263, no. 5154, pp. 1710–1715, 1994.
- [35] I. Lynch and K. A. Dawson, “Protein-nanoparticle interactions,” *Nano Today*, vol. 3, no. 1–2, pp. 40–47, 2008.
- [36] Meryl D. Stoller, Sungjin Park, Yanwu Zhu, Jinho An, Rodney S. Ruoff “Graphene-Based Ultracapacitors,” vol. 8, no. September, pp. 3498–3502, 2008.
- [37] K. E. Scarberry, E. Dickerson, J. McDonald, Z. J. Zhang., “Magnetic Nanoparticle # Peptide Conjugates for in Vitro and in Vivo Targeting and Extraction of Cancer Cells Magnetic Nanoparticle - Peptide Conjugates for in Vitro and in Vivo Targeting and Extraction of Cancer Cells,” no. 12, pp. 10258–10262, 2008.



- [38] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 5, pp. 631–651, 2002.
- [39] A. Kamkaew, K. Burgess "Double-targeting Using A TrkC-Ligand Conjugated to BODIPY- based PDT Agent" vol. 40, no. 6, pp. 1301–1315, 2012.
- [40] X. Huang, S. Neretina, and M. A. El-Sayed, "Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications," *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 48, pp. 4880–4910, 2009.
- [41] N. Somia and I. M. Verma, "Gene therapy: trials and tribulations.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 1, no. November, pp. 91–99, 2000.
- [42] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, and J. P. Benoit, "Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer," *Biomaterials*, vol. 29, no. 24–25, pp. 3477–3496, 2008.
- [43] H. Davidson, B. J. Stevenson, A. D. Carothers, W. H. Wallace, S. Moralee, C. Hoenes, G. Kallmeyer, U. Michaelis, K. Naujoks, L-P Ho, J. M. Samways, M. Imrie, A. P. Greening, J. A. Innes, "Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis," *Gene Ther.*, vol. 4, no. 3, pp. 210–218, 1997.
- [44] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, and A. Göpferich, "Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, no. 2, pp. 247–266, 2005.
- [45] G. Borchard, "Chitosans for gene delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 52, no. 2, pp. 145–150, 2001.
- [46] W. Zou, C. Liu, Z. Chen, and N. Zhang, "Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 9, pp. 982–992, 2009.
- [47] C. K. Chen, W. C. Law, R. Aalinkeel, B. Nair, A. Kopwithaya, S. D. Mahajan, J. L. Reynolds, J. Zou, S. A. Schwartz, P. N. Parasad and C. Cheng, "Well-Defined Degradable Cationic Polylactide as Nanocarrier for the Delivery of siRNA to Silence Angiogenesis in Prostate Cancer," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 1, no. 6, pp. 751–761, 2012.

- [48] G. Lapienis, "Star-shaped polymers having PEO arms," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 9, pp. 852–892, 2009.
- [49] D. Kuckling and A. Wycisk, "Stimuli-responsive star polymers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, no. 14, pp. 2980–2994, 2013.
- [50] J. Roovers, "Concentration Dependence of the Relative Viscosity of Star Polymers," *Macromolecules*, vol. 27, no. 19, pp. 5359–5364, 1994.
- [51] D. S. Pearson and E. Helfand, "Viscoelastic Properties of Star-Shaped Polymers," *Macromolecules*, vol. 17, no. 4, pp. 888–895, 1984.
- [52] K. Khanna, S. Varshney, and A. Kakkar, "Miktoarm star polymers: advances in synthesis, self-assembly, and applications," *Polym. Chem.*, vol. 1, no. 8, p. 1171, 2010.
- [53] A. Hirao, M. Hayashi, S. Loykulnant, K. Sugiyama, S. W. Ryu, N. Haraguchi, A. Matsuo, T. Higashihara, "Precise syntheses of chain-multi-functionalized polymers, star-branched polymers, star-linear block polymers, densely branched polymers, and dendritic branched polymers based on iterative approach using functionalized 1,1-diphenylethylene derivatives," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 30, no. 2, pp. 111–182, 2005.
- [54] S. Shim, M. Ham, J. Huh, and Y. Kwon, "Simultaneous control over the molecular weight and tacticity of poly(vinyl acetate) using a low-temperature photoinitiated RAFT process in fluoroalcohols," *Polymer Chemistry*, vol. 4, no. 207890, pp. 5449–5455, 2013.
- [55] K. Takamizu and K. Nomura, "Synthesis of oligo(thiophene)-coated star-shaped ROMP polymers: Unique emission properties by the precise integration of functionality," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 18, pp. 7892–7895, 2012.
- [56] F. Liu and M. W. Urban, "Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 3–23, 2010.
- [57] H. il Lee, J. Pietrasik, S. S. Sheiko, and K. Matyjaszewski, "Stimuli-responsive molecular brushes," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 24–44, 2010.
- [58] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29,

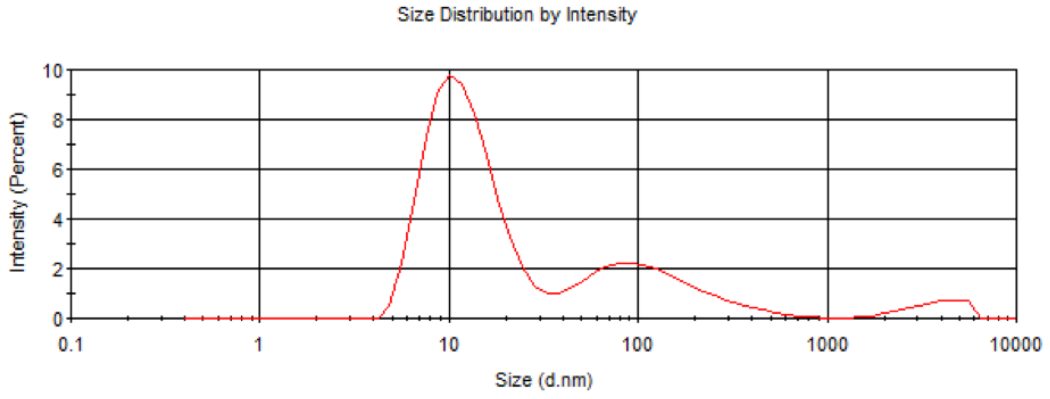
- no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [59] H. G. Dong, K. J. Yoon, Y. P. Sun, D. P. Yong, and K. D. Park, “Heparin-conjugated star-shaped PLA for improved biocompatibility,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 86, no. 3, pp. 842–848, 2008.
- [60] L. Wu, L. Wang, X. Wang, and K. Xu, “Synthesis, characterizations and biocompatibility of novel biodegradable star block copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(ε-caprolactone),” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 1079–1089, 2010.
- [61] S. C. Greer, “Living polymers,” *Comput. Mater. Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 334–338, 1995.
- [62] W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, “Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 93–146, 2007.
- [63] K. Matyjaszewski, “Fundamentals of Controlled / Living Radical Polymerization,” *Encycl. Radicals Chem. Biol. Mater.*, 2012.
- [64] T. Fukuda and A. Goto, *Controlled and Living Radical Polymerization - Principles and Fundamentals*, vol. 3. Elsevier B.V. USA, 2012.
- [65] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, and T. Higashimuras, “Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/ Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization<sup>1</sup>,” *Macromolecules*, vol. 28, no. 11, pp. 1721–1723, 1996.
- [66] J.-S. Wang and K. Matyjaszewski, “Controlled Living Radical Polymerisation. Halogen Atom Transfer Radical Polymerisation promoted by a Cu(I)/Cu(II) Redox Process,” *Macromolecules*, vol. 28, no. 1, pp. 7901–7910, 1995.
- [67] K. Matyjaszewski and J. Spanswick, *Copper-Mediated Atom Transfer Radical Polymerization*, vol. 3. Elsevier B.V. USA, 2012.
- [68] K. Satoh, M. Kamigaito, and M. Sawamoto, *Transition Metal Complexes for Metal-Catalyzed Atom Transfer Controlled/Living Radical Polymerization*, vol. 3. Elsevier B.V. USA, 2012.

- [69] K. Matyjaszewski and J. Xia, Atom Transfer Radical Polymerization, *RSC Polymer Chemistry Series*, vol. 101, no. 4. 2001.
- [70] H. Y. Cho, A. Srinivasan, J. Hong, E. Hsu, S. Liu, A. Shrivats, D. Kwak, A. K. Bohaty, H. J. Paik, J. O. Hollinger and K. Matyjaszewski., "Synthesis of biocompatible PEG-based star polymers with cationic and degradable core for siRNA delivery," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 10, pp. 3478–3486, 2011.

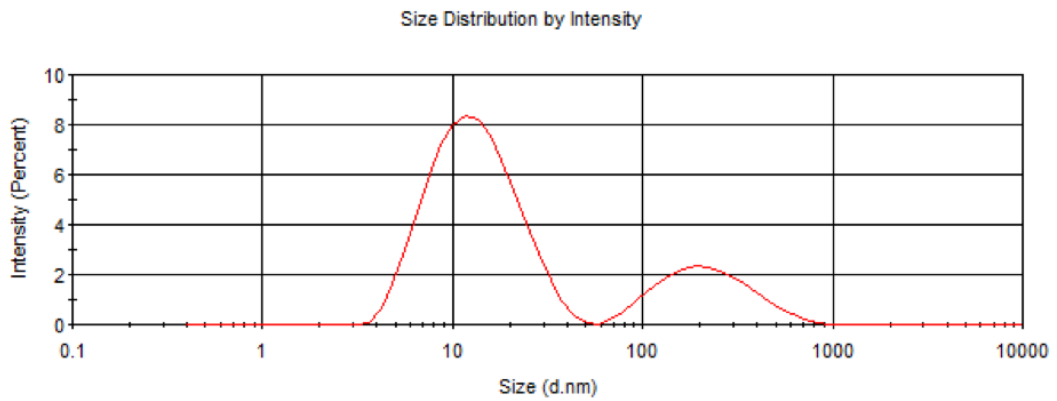


## EKLER

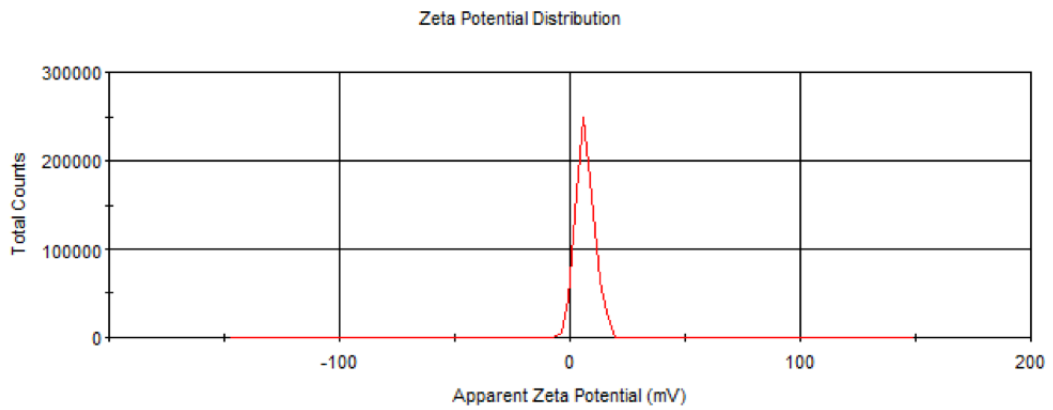
Asit ile muamele edilmemiş yıldız tipi polimerlerin boyut analiz grafiği.



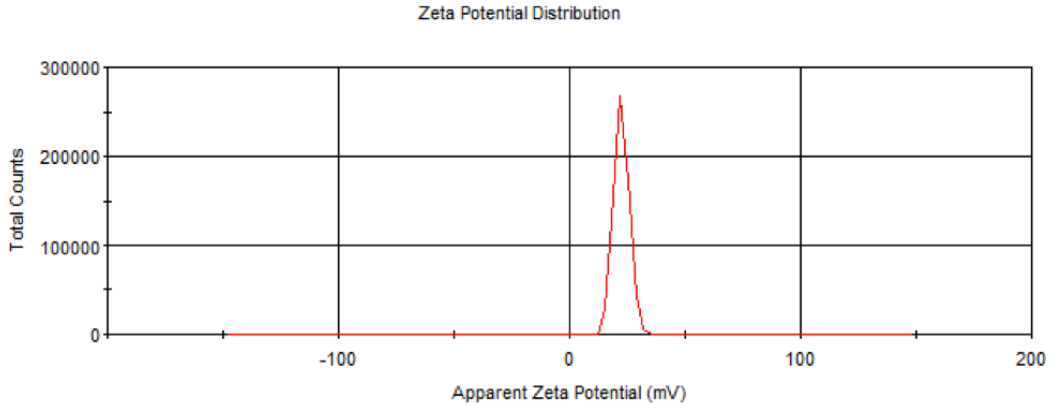
Asit ile muamele edilmiş yıldız tipi polimerlerin boyut analizi grafiği.



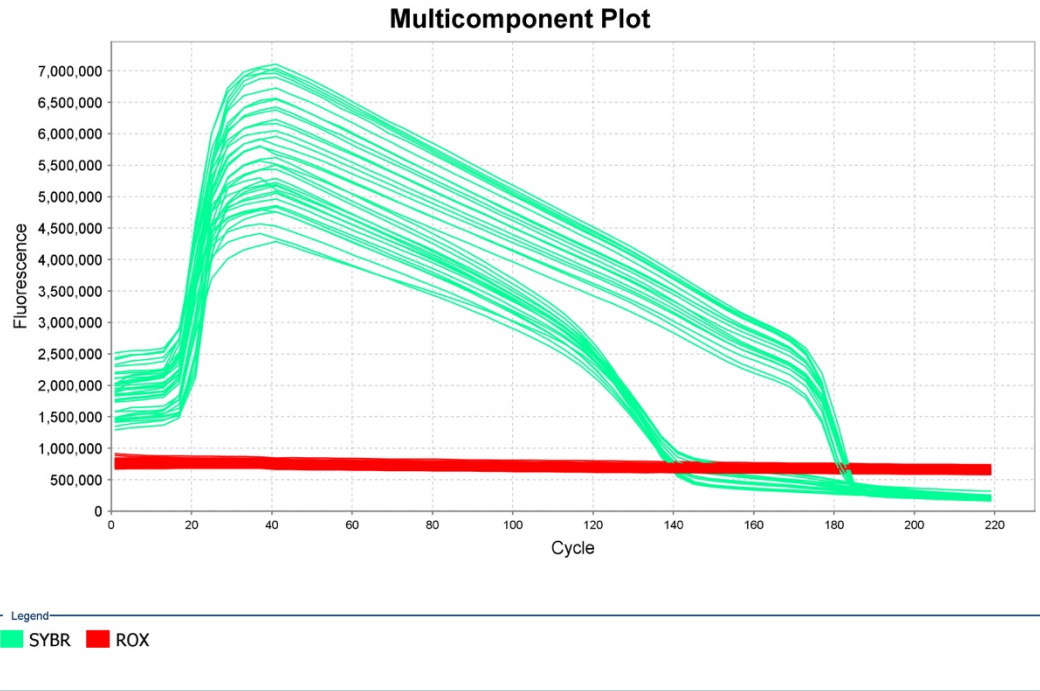
Asit ile muamele edilmemiş yıldız tipi polimerlerin yüzey yükü analizi grafiği.



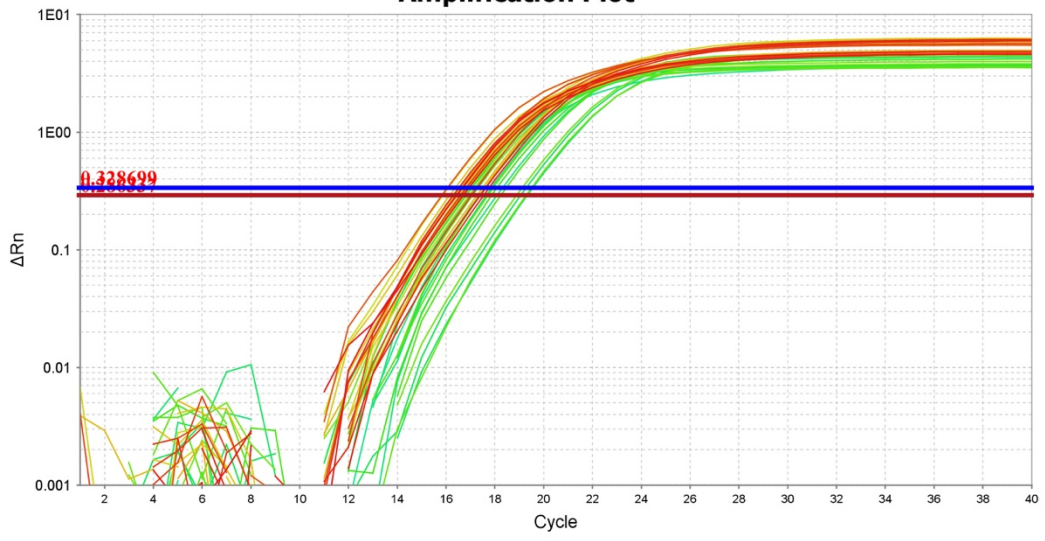
Asit ile muamele edilmiş yıldız tipi polimerlerin yüzey yükü analizi grafiği.



qPCR analizi grafikleri.



### Amplification Plot



# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Serhat Öztürk

Doğum Yeri : Türkiye

Medeni Hali : Bekâr

E-posta : serhat.ozturk@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Çankaya, Ankara

## Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce/ Profesyonel Çalışma Yetkinliği

Deneyim Alanları : Biyosensörler, Yüzey Kimyası, Biyomalzemeler, Nanomalzemeler, Nanopartiküller

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 28.06/2018

Tez Başlığı / Konusu: siRNA Taşınımında Kullanılmak Üzere Yıldız Tipi Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

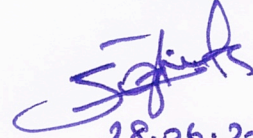
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 28/06/2018 tarihinde ~~sahim~~ tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~datm~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

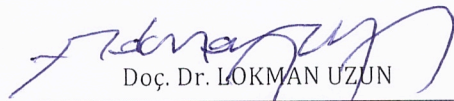
Gereğini saygularıyla arz ederim.

  
28.06.2018  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: SERHAT ÖZTÜRK  
Öğrenci No: N14321253  
Anabilim Dalı: KİMYA  
Programı: KİMYA  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

  
Doç. Dr. LOKMAN UZUN  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)