

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LOKAL İLAÇ SALIM SİSTEMLERİ İÇİN YENİ ISIYA HASSAS
POLİ(İZOBÜTİL METİL GLİKOLİD)-PEG BLOK
KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE ÖZELLİKLERİ**

DUYGU ÇETİN

KOCAELİ 2017

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LOKAL İLAÇ SALIM SİSTEMLERİ İÇİN YENİ ISIYA HASSAS
POLİ (İZOBÜTİL METİL GLİKOLİD)-PEG BLOK
KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE ÖZELLİKLERİ**


DUYGU ÇETİN

Doç.Dr. Olcay MERT
Danışman, Kocaeli Üniversitesi

Prof.Dr. Sibel ZOR
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. İkrime ORKAN UÇAR
Jüri Üyesi, Düzce Üniversitesi







Tezin Savunulduğu Tarih: 15.06.2017

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında 3-izobütil-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion ve PEG kullanılarak A-B ve A-B-A tipi yeni poli(izobütil metil glikolid)-PEG blok kopolimerleri sentezlenerek ısıya hassaslık, biyobozunurluk ve biyoyumluluk özellikleri incelendi.

Çalışmalarım boyunca desteğini, emeğini ve değerli bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyerek her daim bana yol gösteren, kendimi geliştirmeme büyük katkı sağlayan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Olcay Mert'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Sentezlediğimiz polimerlerin in vitro biyoyumluluk çalışmalarıyla ilgili büyük katkılarından dolayı değerli hocam sayın Doç. Dr. Halime Kenar'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasındaki yardımlarından ötürü Mehmet Onur Arıcan'a teşekkürlerimi sunarım.

Destekleri ve fedakarlıklarıyla her zaman koşulsuz yanımda olan canım annem Fatma Tekinçay'a, sevgili babam Tayyar Tekinçay'a ve kıymetli eşim Melih Çetin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım abim Umut Tekinçay ve yengem Fatma Tekinçay'a teşekkür ederim.

Haziran - 2017

Duygu ÇETİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. PLLA Homopolimerleri ve PLLA-PEG Kopolimerleri.....	4
1.2. PLGA Homopolimerleri ve PLGA-PEG Kopolimerleri.....	8
1.3. Asimetrik Alkil Sübstitüye Glikolidler	10
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
2.2. Kullanılan Çözücüler	13
2.3. Kullanılan Cihazlar	14
2.3.1. Azaltılmış toplam reflektans-fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR).....	14
2.3.2. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR)	14
2.3.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC).....	14
2.3.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	14
2.3.5. Termogravimetrik analiz (TGA).....	15
2.3.6. İnkübatör	15
2.3.7. Liyofilizatör	15
2.3.8. CO ₂ inkübatör	15
2.3.9. Mikroplaka okuyucu	15
2.3.10. Optik mikroskop	15
2.4. Yöntem.....	16
2.4.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi	16
2.4.2. 3-izobütil-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion (izobütil metil glikolid) sentezi.....	17
2.4.3. PIBMG-MePEG diblok kopolimer sentezi	19
2.4.4. PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimer sentezi	20
2.4.5. Kopolimerlerin ısıya hassaslık özelliklerinin incelenmesi.....	20
2.4.6. Fosfat tampon çözeltisinin (PBS) hazırlanması	21
2.4.7. Biyobozunurluk	21
2.4.8. Biyoyumluluk.....	22
2.4.8.1. Hücre kültürü.....	22
2.4.8.2. Biyoyumluluk değerlendirmeleri	22
2.4.8.3. Sitotoksite testleri	23
2.4.8.4. WST-1 testi.....	23
2.4.8.5. Live-dead analizi	24

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
3.1. L-2-Hidroksi-4-Metilpentanoik Asit (1)	25
3.2. 3-İzobütil-6-Metil-1,4-Diokzan-2,5-Dion (3) (İzobütil Metil Glikolid) Monomerinin Sentez ve Karakterizasyonu	27
3.3. Yeni PIBMG-MePEG (6) Diblok Kopolimerlerinin Sentez ve Karakterizasyonları	34
3.4. Yeni PIBMG-PEG-PIBMG (11) Triblok Kopolimerlerinin Sentez ve Karakterizasyonları	40
3.5. Kopolimerlerin Termal Karakterizasyonu	46
3.6. Kopolimerlerin Jel-Sol Geçiş Sıcaklıklarının Belirlenmesi	54
3.7. Biyobozunurluk Çalışmaları	56
3.8. Biyoyumluluk Çalışmaları	58
3.8.1. WST-1 çoğalma ve sitotoksosite testi	58
3.8.2. Live-dead analizi	62
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	74
EKLER	81
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	99
ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Laktidin stereoformları.....	4
Şekil 1.2.	L-laktid, d-laktid ve mezo-laktid'in halka açılma polimerizasyonu	5
Şekil 1.3.	PLGA'in sentezi	8
Şekil 1.4.	PLGA'in hidrolizi	8
Şekil 1.5.	Çeşitli asimetrik glikolid monomerleri	11
Şekil 2.1.	L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi	16
Şekil 2.2.	3-izobütil-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion (izobütil metil glikolid) sentezi.....	17
Şekil 2.3.	PIBMG-MePEG diblok kopolimer sentezi	19
Şekil 2.4.	PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimer sentezi	20
Şekil 3.1.	1 bileşiği	25
Şekil 3.2.	L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ATR-FTIR spektrumu	25
Şekil 3.3.	L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ¹ H-NMR spektrumu.....	26
Şekil 3.4.	L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ¹³ C-NMR spektrumu.....	27
Şekil 3.5.	3 bileşiği	27
Şekil 3.6.	2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asitin ATR-FTIR spektrumu	28
Şekil 3.7.	2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asitin ¹ H-NMR spektrumu	29
Şekil 3.8.	2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asitin ¹³ C-NMR spektrumu	30
Şekil 3.9.	İzobütil metil glikolid monomerinin ATR-FTIR spektrumu	31
Şekil 3.10.	İzobütil metil glikolid monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	32
Şekil 3.11.	İzobütil metil glikolid monomerinin ¹³ C-NMR spektrumu	33
Şekil 3.12.	6 bileşiği	34
Şekil 3.13.	6 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	35
Şekil 3.14.	6 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	36
Şekil 3.15.	6 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	38
Şekil 3.16.	6 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	39
Şekil 3.17.	11 bileşiği	40
Şekil 3.18.	11 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	41
Şekil 3.19.	11 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	42
Şekil 3.20.	11 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	44
Şekil 3.21.	11 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	45
Şekil 3.22.	MePEG-2000 homopolimerinin TGA eğrisi.....	46
Şekil 3.23.	PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimerinin TGA eğrisi	46
Şekil 3.24.	PIBMG-MePEG diblok 6 kopolimerinin TGA eğrisi	47
Şekil 3.25.	a. MePEG-2000 homopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı	48

Şekil 3.26. a. MePEG-2000 homopolimeri DSC soğutma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC soğutma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC soğutma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC soğutma termogramı	49
Şekil 3.27. a. MePEG-2000 homopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı	50
Şekil 3.28. a. PEG-2000 homopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı.....	51
Şekil 3.29. a. PEG-2000 homopolimeri DSC soğutma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC soğutma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC soğutma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC soğutma termogramı.....	52
Şekil 3.30. a. PEG-2000 homopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı.....	53
Şekil 3.31. 9 bileşiğinin jel (a) ve sol (b) görünümü	54
Şekil 3.32. PIBMG-MePEG 4, PIBMG-MePEG 5 ve PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerlerinin jel-sol geçiş eğrileri	56
Şekil 3.33. a. 5 kopolimerinin bozunurluk öncesi, b. 5 kopolimerinin bozunurluk sonrası	57
Şekil 3.34. a. 10 kopolimerinin bozunurluk öncesi, b. 10 kopolimerinin bozunurluk sonrası	57
Şekil 3.35. a. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin 5. gündeki görüntüsü, b. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin 31. gündeki görüntüsü, c. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin 10. gündeki görüntüsü	58
Şekil 3.36. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücre hattı mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 3.37. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücre hattı mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 3.38. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Şekil 3.39. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Şekil 3.40. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL	63
Şekil 3.41. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL	65

Şekil 3.42. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL	67
Şekil 3.43. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL	69
Şekil A.1. L-Lösin ATR-FTIR spektrumu	82
Şekil A.2. 4 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	82
Şekil A.3. 5 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	83
Şekil A.4. 9 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	83
Şekil A.5. 10 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	84
Şekil A.6. 12 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu	84
Şekil B.1. 4 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	85
Şekil B.2. 4 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	85
Şekil B.3. 5 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	86
Şekil B.4. 5 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	86
Şekil B.5. 7 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	87
Şekil B.6. 7 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	87
Şekil B.7. 8 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	88
Şekil B.8. 8 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	88
Şekil B.9. 9 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	89
Şekil B.10. 9 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	89
Şekil B.11. 10 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	90
Şekil B.12. 10 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	90
Şekil B.13. 12 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	91
Şekil B.14. 12 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	91
Şekil C.1. 4 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	92
Şekil C.2. 5 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	93
Şekil C.3. 7 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	94
Şekil C.4. 8 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	95
Şekil C.5. 9 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	96
Şekil C.6. 10 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	97
Şekil C.7. 12 bileşiğinin GPC kromatogramı.....	98

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. PIBMG-MePEG sentezi için deneysel koşullar	19
Tablo 2.2. PIBMG-PEG-PIBMG sentezi için deneysel koşullar	20
Tablo 2.3. Jel-sol geçiş sıcaklığının belirlenmesi için test edilen kopolimer konsantrasyonları	21
Tablo 3.1. PIBMG-MePEG diblok kopolimerlerinin molekül ağırlıkları	35
Tablo 3.2. 6 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	39
Tablo 3.3. PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimerlerinin molekül ağırlıkları	40
Tablo 3.4. 11 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	45
Tablo 3.5. 4 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi	54
Tablo 3.6. 5 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi	55
Tablo 3.7. 9 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi	55
Tablo C.1. 4 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	92
Tablo C.2. 5 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	93
Tablo C.3. 7 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	94
Tablo C.4. 8 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	95
Tablo C.5. 9 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	96
Tablo C.6. 10 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	97
Tablo C.7. 12 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

M_n	: Sayıca ortalama molekül ağırlığı, (g.mol ⁻¹)
M_w	: Kütlece ortalama molekül ağırlığı, (g.mol ⁻¹)
T_{cc}	: Soğuk kristalizasyon sıcaklığı, (°C)
T_g	: Camı geçiş sıcaklığı, (°C)
T_{hc}	: Sıcak kristalizasyon sıcaklığı, (°C)
T_m	: Erime sıcaklığı, (°C)

Kısaltmalar

¹ H-NMR	: Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)
¹³ C-NMR	: Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Karbon Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)
ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Azaltılmış Toplam Reflektans-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi)
DSC	: Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri)
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
GPC	: Gel Permeation Chromatography (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)
MePEG	: Poli(etilen glikol) Metil Eter
PBS	: Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PDLA	: Poli(D-laktid)
PEG	: Poli(etilen glikol)
PIBMG	: Poli(izobütil metil glikolid)
PLGA	: Poli(laktid-ko-glikolid)
PLLA	: Poli(L-laktid)
TGA	: Thermogravimetric Analysis (Termogravimetrik Analiz)

LOKAL İLAÇ SALIM SİSTEMLERİ İÇİN YENİ ISIYA HASSAS POLİ (İZOBÜTİL METİL GLİKOLİD)-PEG BLOK KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE ÖZELLİKLERİ

ÖZET

Bu çalışmada lokal ilaç salım sistemleri için yeni, biyobozunur ve biyouyumlu PEG bazlı asimetrik alkil sübstitüye glikolid blok kopolimerleri sentezlenerek çeşitli yöntemlerle karakterizasyonları yapıldı ve ısıya hassaslık özellikleri incelendi.

Çalışma 4 bölümde gerçekleştirildi.

Çalışmanın ilk bölümünde 3-izobütül-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion (izobütül metil glikolid) monomerinin sentezi gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle L-2-amino-4-metilpentanoik asit başlangıç maddesi kullanılarak NaNO_2 ve H_2SO_4 varlığında L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin sentezi gerçekleştirildi ve karakterizasyonu spektroskopik (FTIR, NMR) teknikler kullanılarak yapıldı. Ardından L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin 2-bromopropiyonil bromürle kondenzasyon tepkimesiyle ara ürün esteri oluşturulup, DMF ve NaHCO_3 varlığında halka kapatılarak 3-izobütül-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion monomerinin sentezi gerçekleştirildi. Ara ürün ve monomerin karakterizasyonu spektroskopik (FTIR, NMR) teknikler kullanılarak yapıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ katalizörü varlığında halka açılması polimerleşmesi yöntemi ile yeni, her bir bileşenin uzunluğu özenle ayarlanmış poli (izobütül metil glikolid)-MePEG diblok ve poli (izobütül metil glikolid)-PEG-poli (izobütül metil glikolid) triblok kopolimerleri eriyik polimerleşme ile sentezlendi ve karakterizasyonları spektroskopik (ATR-FTIR, NMR), kromatografik (GPC) ve termal (DSC, TGA) metotlar kullanılarak yapıldı.

Çalışmanın üçüncü bölümünde kopolimerlerin ısıya hassaslık özellikleri incelenerek uygun molekül ağırlığı ve konsantrasyonda olanlar belirlendi. Kopolimerler; enjeksiyon için gerekli olan sıcaklıkta ($40-41^\circ\text{C}$) sol (akışkan) formundadır ve vücuda enjekte edildiğinde fizyolojik koşullar altında (37°C) hızla hedef dokuda jel oluşturabilmektedir.

Çalışmanın son bölümünde ise kopolimerlerin biyobozunurluk ve biyouyumluluk testleri yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Asimetrik Alkil Sübstitüye Glikolid, Biyobozunurluk, Biyouyumluluk, Isıya Hassaslık, Lokal İlaç Salım Sistemleri.

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NOVEL THERMOSENSITIVE POLY (ISOBUTYL METHYL GLYCOLIDE)-PEG BLOCK COPOLYMERS FOR LOCAL DRUG DELIVERY SYSTEMS

ABSTRACT

In this study, novel, biodegradable and biocompatible PEG-based asymmetric alkyl-substituted glycolide block copolymers for local drug release systems were synthesized and characterized by various methods and their heat sensitivity properties were investigated.

The study was performed in 4 steps.

Firstly, synthesis of 3-isobutyl-6-methyl-1,4-dioxane-2,5-dione (isobutyl methyl glycolide) monomer was performed. For this purpose, firstly the synthesis of L-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid was performed in the presence of NaNO_2 and H_2SO_4 by using L-2-amino-4-methylpentanoic acid as starting material and its characterization was carried out by using spectroscopic (FTIR, NMR) techniques. Then intermediate ester was formed with the condensation of L-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid with 2-bromopropionyl bromide at first and the ring was closed in presence of DMF and NaHCO_3 to give 3-isobutyl-6-methyl-1,4-dioxane-2,5-glycolide monomer. Characterization of the intermediate and the monomer was performed by using spectroscopic (FTIR, NMR) techniques.

Secondly, new poly (isobutyl methyl glycolide)-MePEG diblock and poly (isobutyl methyl glycolide)-PEG-poly (isobutyl methyl glycolide) triblock copolymers with the carefully adjusted length for each component were synthesized by ring opening polymerization method with melt polymerization in the presence of $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ and their characterization was performed by spectroscopic (ATR-FTIR, NMR), chromatographic (GPC), and thermal (DSC, TGA) methods.

Thirdly, the thermosensitivity properties of the copolymers were investigated and appropriate molecular weight and concentration of copolymers were determined. They are in sol (fluid) form at required temperature ($40\text{-}41^\circ\text{C}$) for injection and when injected to the body, they are rapidly gelled under physiological conditions (37°C) at the target tissue.

Lastly, tests of biodegradability and biocompatibility for the copolymers were performed.

Keywords: Asymmetric Alkyl Substituent Glycolide, Biodegradability, Biocompatibility, Thermosensitivity, Local Drug Delivery Systems.

GİRİŞ

Etkili kanser terapisi için en yaygın stratejiler kemoterapi, radyoterapi gibi çoklu kemoterapötik ajanların birlikte uygulanmasıdır [1, 2, 3]. Fakat kanser tedavisindeki en büyük problemlerden biri kemoterapötiklerin sağlıklı dokulara da giderek sistemik toksisiteye neden olması ve tedavinin etkin olabilmesi için yüksek dozda ilaç alımını gerektirmesidir [1, 2]. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için son zamanlarda ilgi lokal ilaç salım sistemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Lokal ilaç salım sistemleri, ilacın önceden belirlenebilen bir zaman periyodu içerisinde sadece istenen bölgeye kontrollü salımını sağlamaktadır. Böylece geleneksel ilaç formülasyonlarının sistemik toksisitesini azaltarak ilacın terapötik etkisini ve hastanın yaşam kalitesini geliştirmektedir [4, 5, 6]. Ayrıca lokal ilaç salım sistemleriyle beyin-kan bariyerinden dolayı tedavi edilmesi zor olan beyindeki katı tümörlerin de tedavisi etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir [7, 8, 9].

Son zamanlarda sıcaklık, pH, elektromanyetik alan gibi dış uyarılara yanıt olarak anında jel oluşturan enjekte edilebilir polimerik hidrojeller üzerine geniş ölçüde araştırmalar yapılmıştır [10]. Bu hidrojeller arasından ısıya hassas hidrojellerin kullanımı ise ekstra hiçbir kimyasal işlem gerektirmeden vücut sıcaklığı gibi bir uyarıya bağlı olarak kendiliğinden jelleşebildiğinden özellikle önemlidir [11]. Bu sistemlerde kullanılan polimerlerin sulu çözeltileri sol(akışkan) fazda ilaç, protein gibi terapötik ajanlarla karıştırılarak basit bir şırınga yardımıyla ilaç salım deposu oluşturmak üzere vücuda enjekte edilebilir [12]. Çeşitli biyobozunur ve biyobozunur olmayan ısıya hassas polimerler bu sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [13]. Pluronik veya polokzamer olarak adlandırılan poli(etilen oksit)-poli(propilen oksit)-poli(etilen oksit)'in sulu çözeltileri %20-%30 konsantrasyon aralığında 5-30 °C arasında sol-jel geçişi ve 35-50°C arasında jel-sol geçişi göstermektedir [13, 14]. Sol-jel geçişi polokzamer'i ilaç salım uygulamalarında anında jel oluşturabilirliği açısından çekici kılmaktadır. Fakat miseller arasındaki fiziksel çapraz bağlanma çok zayıftır ve bu nedenle polokzamerin jel bütünlüğü enjekte edilen bölgede birkaç saatten fazla sürmez. İn vitro deneyler %25 polokzamer 407 jelinin PBS ortamında 4 saatte

tamamen çözüldüğünü ve %35 polokzamer 407 jelinin ise 4 saatte %50 çözüldüğünü göstermiştir [13, 15]. Bu nedenle daha uzun salım için daha dirençli hidrojeller gereklidir [13]. Ayrıca in vivo deneyler sulu polokzamer 407 çözeltisinin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra kolesterol ve trigliserit seviyesinde artış olduğunu göstermiştir [16, 17]. Polokzamerin biyobozunur olmaması da ilaç salım sistemlerinde kullanımını problemlili kılan bir nedendir [18]. Bu nedenle jellerin dayanıklılığını ve biyouyumluluğunu geliştirmek için poli (L-laktik asit) (PLLA), poli (DL-laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur poliesterlerin PEG ile oluşturduğu blok kopolimerlerin kullanıldığı özgün enjekte edilebilir depo sistemleri geliştirilmiştir [12, 13]. Örneğin poli(etilen glikol)-poli(DL-laktik asit-ko-glikolik asit)-poli(etilen glikol) (PEG-PLGA-PEG) triblok kopolimerlerinin sulu çözeltileri oda sıcaklığında sol fazında serbestçe akabilir ve vücut sıcaklığında jel oluşturur [13, 19]. İn vivo deneylerle bu triblok kopolimer sulu çözeltilerinin (%33 konsantrasyonda) deri altı enjeksiyonu ile jel oluşturduğu kanıtlanmıştır. Oluşturulan şeffaf jel iyi bir mekanik güce sahiptir ve bütünlüğünü sıçanlar üzerinde 1 aydan daha uzun bir süre korumuştur [20]. Bu özellikler PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerlerinin enjekte edilebilen ilaç salım sistemleri olarak uzun süreli kullanımına olanak sağlamaktadır [13].

Çevresel ve biyomedikal uygulamalarda bozunur materyaller olarak poli (laktid)'lerde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Fakat aslında poli (laktid)'ler yüksek kristalinite, hidrofobisite ve fonksiyonel grup eksikliğinden dolayı pek çok uygulamada kullanılmak için uygun değildir [21]. Özellikle bozunma hızını azaltan hidrofobisiteyi biyomedikal uygulamalarda kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle poliester iskeletini bozmadan poli(laktid) yapısını değiştirerek istenen biyobozunurluğu sağlayan poli(laktid) türevleri elde edilebilir [22]. Ayrıca literatürde poli (laktid)'le ilgili geniş kapsamlı çalışmalar olmasına rağmen, poli (laktid)'deki metil grubunun basit bir alkil ya da aril grubu ile yer değiştirmesi ile elde edilen analogları üzerine çok az çalışma vardır [23-27]. Bu nedenle biyomedikal ve farmasötik endüstrinin geleceği için süstitüye laktik asitten türetilen polimerlerin sentezi önemlidir.

Beyindeki katı tümörlerin ve lokal bölgelerdeki tümörlerin tedavisinde kullanılabilecek, literatürde sıkça çalışılan PLGA-PEG, PLLA-PEG gibi biyobozunur malzemelere iyi bir alternatif oluşturabilecek, uygulamadan önce (40-44°C'de) sol

fazında fakat vücuda enjekte edildiğinde fizyolojik koşullar altında (37°C'de) hedef dokuda anında jel oluşturabilen ısıya hassas, yeni poli (izobütil metil glikolid)-PEG blok kopolimerlerinin hazırlanması bu tezin kapsamını oluşturmaktadır.

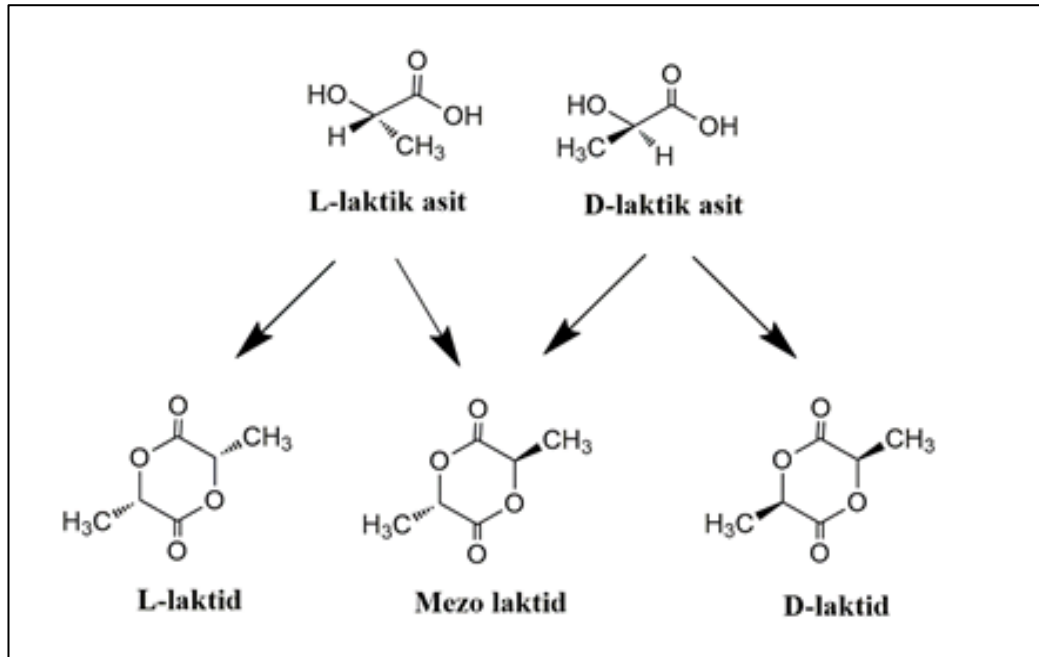
Tezin ilk bölümünde PLLA ve PEG bazlı kopolimerleri ile PLGA ve PEG bazlı kopolimerlerinden ve asimetrik alkil sübstitüye glikolidlerle ilgili genel bilgilerden bahsedilmektedir. İkinci bölümde deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler, cihazlar ve yöntem anlatılmaktadır. Üçüncü bölümde elde edilen bulgular ve bunların sonuçları literatür bilgileri ile birlikte verilmektedir. Son bölümde ise ulaşılan sonuçların değerlendirilmesi ve çalışma ile ilgili öneriler sunulmaktadır.

Tezin amacı bir asimetrik alkil sübstitüye glikolid olan izobütil metil glikolid monomerinden PEG ile halka açılma reaksiyonu ile her bir bileşenin uzunluğu özenle ayarlanmış çeşitli diblok ve triblok kopolimerler sentezleyerek karakterizasyonlarını spektroskopik (NMR, FTIR), termal (DSC, TGA) ve kromatografik (GPC) metotları kullanarak gerçekleştirmek, ısıya hassaslık özelliklerini detaylı bir şekilde incelemek ve kopolimerlerin biyobozunurluk ve biyouyumluluk testlerini gerçekleştirmektir. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirmek istenen hedef ise genel kemoterapinin eksikliklerini kapatan lokal ilaç salım sistemlerine fiziksel özellikleri geniş yeni, biyobozunur ve biyouyumlu malzemeler kazandırmaktır.

1. GENEL BİLGİLER

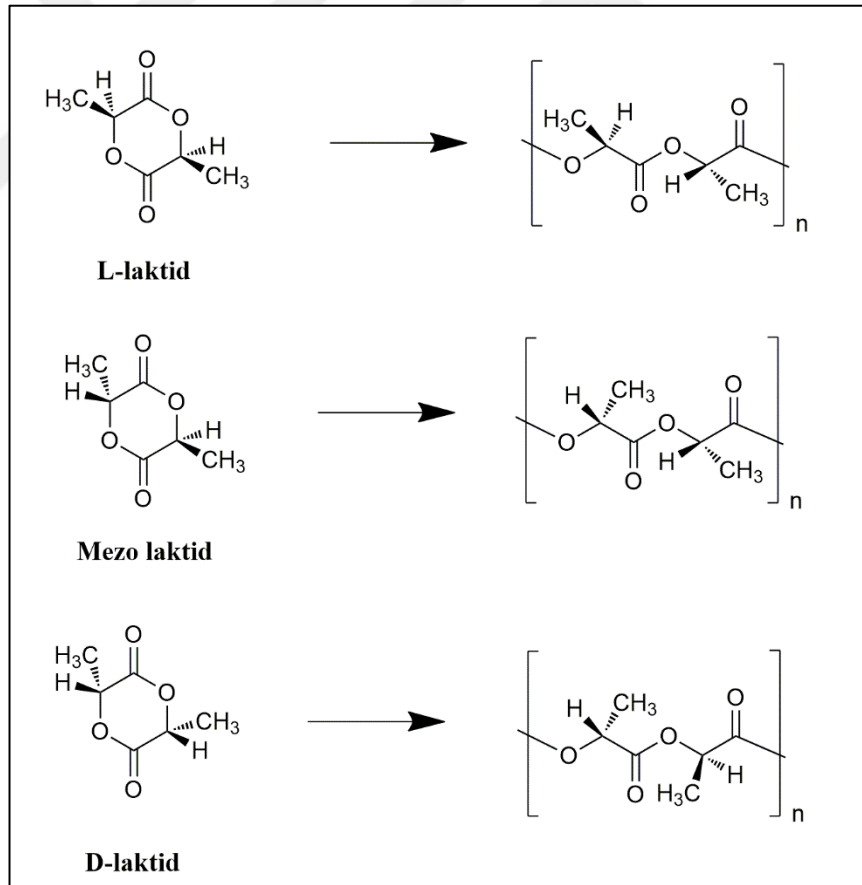
1.1. PLLA Homopolimerleri ve PLLA-PEG Kopolimerleri

Poli(laktid) mısır ve şeker kamışı gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyobozunur bir poliesterdir [28-31]. Laktik asit klasik stereokimyasal terimlerde D veya L formu olarak tanımlanan asimetrik bir α karbonu içerir. Homopolimerleri için enantiyometrik formları poli (L-Laktik asit) (PLLA) ve poli (D-Laktik asit) (PDLA)'dır. Optikçe aktif PDLA ve PLLA'nın fizikokimyasal özellikleri neredeyse aynıdır. Fakat rasemik PLA çok farklı özelliklere sahiptir [32, 33]. Poli(L-laktid) 76°C camsı geçiş sıcaklığı ve 180°C erime sıcaklığı ile yarı kristalin bir polimerken, poli(DL-laktid) 58°C camsı geçiş sıcaklığı ile amorf bir polimerdir [34, 35]. DL-PLA ilaçların kontrollü salımına yönelik formülasyonlarda olduğu gibi aktif türlerin tek fazlı matrikste homojen bir şekilde dağılmasının önemli olduğu durumlarda kullanılır. L-PLA, dikişler ve ortopedik aletler gibi mekanik güç ve sertliğin gerekli olduğu uygulamalar için tercih edilir [34].



Şekil 1.1. Laktidin stereofomları

Yüksek molekül ağırlıklı poli(laktik asit) elde etmenin en genel yolu laktid monomerinin halka açılma polimerizasyonudur. Halkalı laktik asit dimeri olan ara ürün laktid ilk adımda oligomerizasyon sırasında buharlaşma ile kondenzasyon ürünü olan su uzaklaştırıldığında oluşturulur. L-laktik asit, D-laktik asit veya karışımları sonrasında iç transesterifikasyon sayesinde katalitik olarak depolimerize edilebilen düşük molekül ağırlıklı poli(laktik asit) oligomerlerine polimerize edilebilir. Laktid monomerinin L-laktid, D-laktid ve mezo laktid olmak üzere 3 stereoformu mevcuttur (Şekil 1.1). İkinci adımda saflaştırılmış L-laktid, D-laktid, DL-laktid (L ve D izomerlerinin 50:50 karışımı) veya mezo-laktid monomeri katalitik halka açılma polimerizasyonu yoluyla yüksek molekül ağırlıklı poliesterlere dönüştürülür. Halka açılması polimerizasyonunda kullanılan katalizörler genellikle kalay oktoat ve kalay(II) klorürdür [36]. L-laktid, D-laktid ve mezo-laktid'in halka açılma polimerizasyonu Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. L-laktid, d-laktid ve mezo-laktid'in halka açılma polimerizasyonu

Diğer biyopolimerlerle kıyaslandığında PLA'nın sahip olduğu avantajlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir: Yenilenebilir kaynaklardan (mısır gibi) üretildiği için çevre dostudur. Biyobozunur, geri dönüşümlü, biyolojik olarak tamamen bozunabilen bir polimerdir [37-39]. Biyoyumlu olduğu için lokal dokuda toksik etki yaratmaz. Aynı zamanda bozunma ürünleri de doku iyileşmesine müdahale etmez [37, 40]. PLA vücuda implant edildiğinde kendisini oluşturan α -hidroksi asitlere hidroliz olur. Daha sonra trikarboksilik asit döngüsüne katılarak vücuttan dışarı atılır [37, 40]. Ayrıca biyolojik sıvılarla doğrudan teması konusunda FDA onaylı bir polimerdir [37, 41].

Yukarıda bahsedilen tüm bu olumlu özelliklerine rağmen özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanımını sınırlandıran en büyük neden yavaş bozunmasıdır. PLA ester grubu iskeletin hidrolizi ile bozunur ve bozunma hızı PLA'nın kristalinitesine, moleküler ağırlığı dağılımına, morfolojisine, polimere suyun difüzyon hızına ve stereoisomerik içeriğe bağlıdır [37, 42]. Yavaş bozunması bazı durumlarda yıllarca sürebilen (çoğunlukla 3-5 yıl) uzun bir in vivo yaşam süresine neden olur [37, 40]. Bu da uzun vadede sistemik toksisiteye neden olabilir.

PLA'nın yüksek derecedeki hidrofobik karakteri de biyomateryal olarak uygulamalarını önemli derecede sınırlandırmaktadır. Bu nedenle poliester zincirine poli (etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik polieter bloklarının girişi sağlanır. Blok kopolimerin hazırlanmasında PEG makro-başlatıcı olarak kullanılmaktadır [43, 44]. PEG biyoyumluluk, düşük immunojenite, suda çözünürlük gibi eşsiz fizikokimyasal ve biyolojik özellikler sunmaktadır [43, 45]. Ayrıca biyomedikal kullanım için bazı PEG bazlı malzemeler FDA onaylıdır [43].

PEG-PLLA diblok kopolimerleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada bu blok kopolimerlerin aynı molekül ağırlığındaki PLLA homopolimerlerinden daha hızlı bozunduğu gözlemlenmiştir [46].

İlk ısıya hassas PLA-PEG hidrojel (PEG-PLLA-PEG) 1997'de hazırlanmıştır [18, 47]. Bu çalışmada PEG-PLLA-PEG triblok kopolimerleri iki adımda sentezlenmiştir. İlk adımda MePEG ve PLLA'dan oluşan diblok kopolimerler MePEG üzerinden L-laktidin halka açılma polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Ardından triblok PEG-PLLA-PEG kopolimerleri, MePEG-PLLA diblok kopolimerlerinin hekza metilen diizosiyanat (HMDI) ile bağlanmasıyla elde edilmiştir. Sulu fazdaki geniş

hidrodinamik çapından dolayı 10.000 molekül ağırlığının üzerindeki PEG'lerin insan böbreğinden filtrasyonu uygun olmadığı için çalışmada 5000 molekül ağırlığındaki PEG'ler kullanılmıştır. Konsantre PEG-PLLA-PEG çözeltileri sıcaklık arttıkça jel-sol geçişi göstermiştir. Bu çalışmada flöresin izotiyosiyanat etiketli dekstran ilacının in vitro salımı araştırılmıştır. Bu ilaç polimer çözeltisi ile 45°C'de karıştırılıp, ardından sıcaklık 37°C'ye düşürülerek ilaç yüklü hidrojel oluşturulmuştur. Dekstranın suda çözünürlüğü yüksek olduğundan 12 günde %23'lük jelden %70, %35'lik jelden %40 salınmıştır [18, 48].

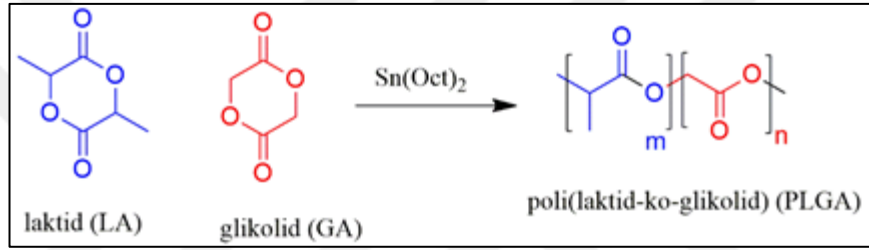
Yine başka bir çalışmada PEG-PLA-PEG triblok kopolimerlerinin sentezi ve jelleşme özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada öncelikle çinko tozunun katalizör olarak kullanılmasıyla MePEG üzerinden D, L-laktidin halka açılma polimerizasyonu ile çeşitli diblok kopolimerler sentezlenmiştir. Sonrasında adipoil klorürün bağlanma ajanı olarak ve DMAP'nin katalizör olarak kullanılmasıyla MePEG-PLA diblok kopolimerlerinden PEG-PLA-PEG triblok kopolimerleri sentezlenmiştir. Literatürde genellikle bağlanma ajanı olarak hekza metilen diizosiyanat (HMDI) kullanılmasına rağmen bu triblok kopolimerlerin sentezinde adipoil klorürün tercih edilmesinin sebebi PLA ve PEG blokları arasında ester bağlarının oluşumuna yol açmasıdır. Çünkü ester bağları HMDI kullanılarak oluşturulan üretan bağlarından hidrolize daha hassastır. Sentezlenen bütün kopolimerlerin PEG tipi kristal yapısı ile yarı kristalin olduğu gözlemlenmiştir. PLA blok uzunluğunun artışına bağlı olarak PEG'in kristalinitesi ve erime sıcaklığı azalmıştır. Sıcaklığın artışı ile jel-sol geçişi gözlemlenmiştir ve jelleşme tersinirdir. Kopolimer çözeltisi jel noktasının üzerinde viskoelastik bir sıvı gibi davranırken jel noktasının altında viskoelastik bir katı gibi davranır. Kritik jelleşme konsantrasyonu, verilen konsantrasyondaki jel-sol geçiş sıcaklığı ve karşılık gelen modül hem etilen oksit/laktid oranına hem de kopolimerin molekül ağırlığına bağlıdır. Jelleşmenin düşük sıcaklıkta PEG blokları arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı ve sıcaklığın yükselmesiyle bu etkileşimlerin bozulduğu düşünülmektedir. Artan sıcaklık ile PEG bloklarının küçülmesi, jel sol geçiş sıcaklıklarının değişimi ile uyumlu görünmektedir [49].

Son zamanlarda PEG-PLLA diblok kopolimerlerinin termojelleşme davranışı üzerine zincir uzunluğun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada daha uzun PLLA parçalarının düşük polimer konsantrasyonunda termojelleşme etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir.

Tersine PEG bloklarının uzunluğu arttıkça daha yüksek polimer konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur [47, 50].

1.2. PLGA Homopolimerleri ve PLGA-PEG Kopolimerleri

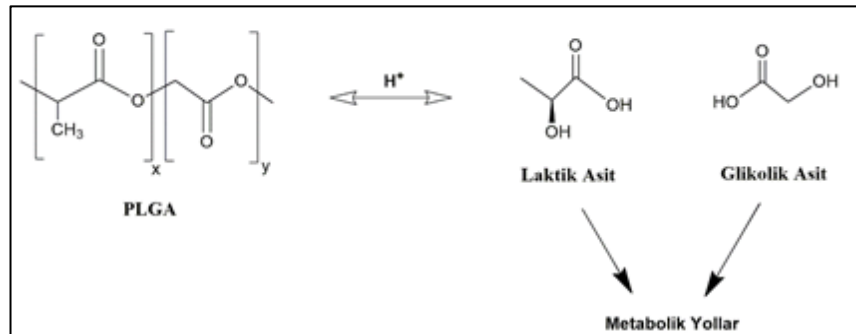
PLGA genellikle laktid ve glikolid monomerlerinin halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenen bir kopolimeridir [51]. Bu kopolimerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan katalizörler kalay(II) 2-etilhekzanoat, kalay(II) alkoksit ve alüminyum izopropoksit'tir [52]. Polimerizasyon boyunca ardışık monomer birimleri ester bağları ile bağlanır ve böylece doğrusal, amorf, alifatik poliester ürünü olan PLGA'yi verir (Şekil 1.3) [52, 53].



Şekil 1.3. PLGA'in sentezi

Polimerizasyonda kullanılan laktidin glikolide oranına göre farklı formda PLGA'ler elde edilebilir. (Örneğin; PLGA 75:25 %75 laktik asit ve %25 glikolik asitten oluşan bir kopolimeri tanımlar) [54].

PLGA polimeri laktik asit ve glikolik asite bozunur. Laktik asit trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize olup vücuttan CO_2 ve H_2O olarak elimine edilir. Glikolik asit ise ya değişmeden böbrekte atılır ya da trikarboksilik asit döngüsüne girerek vücuttan CO_2 ve H_2O olarak elimine edilir (Şekil 1.4) [55].



Şekil 1.4. PLGA'in hidrolizi

PLGA'in bozunma hızı büyük ölçüde moleküler ağırlık, hidrofobisite, stereokimya gibi faktörlere bağlıdır. Moleküler ağırlığının artmasına bağlı olarak bozunma hızının birkaç haftadan aya değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca metil yan gruplarının mevcudiyetinden dolayı laktidce zengin PLGA kopolimerinin hidrofiliği daha düşüktür, suyu daha az absorplar ve daha yavaş bozunur. D ve L laktik asit monomerlerinin karışımı ise PLGA kopolimerinin sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü su amorf D, L bölgelerine daha hızlı nüfuz eder ve bu da kopolimerin bozunmasını hızlandırır [54, 56]. Ayrıca 50:50 oranında laktik asit ve glikolik asit içeren PLGA polimerinin yarılanma ömrü diğerlerinden kısadır. Bu nedenle en hızlı şekilde bozunur [57].

PLGA kopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) fizyolojik sıcaklığın (37°C) üzerinde olduğu raporlanmıştır. Bu nedenle doğada camsı halde bulunur ve oldukça sert bir zincir yapısı sergiler. Ayrıca PLGA'nın T_g 'si kopolimer kompozisyonundaki laktid içeriğinin azalması ve moleküler ağırlığın azalması ile azalmaktadır [58, 59].

İlaç salım sistemleri tasarlanırken sol-jel geçiş sıcaklığının dikkatli bir şekilde kontrolü önemlidir. Geçiş sıcaklığı sistemin uygulanabilirliğini, formülasyon sıcaklığını ve enjekte edilebilirliğini belirler. PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerlerinin sol-jel geçiş sıcaklığı PLGA uzunluğu, PEG uzunluğu, orta bloktaki DLLA'in GA'ya oranı gibi moleküler parametrelerini değiştirerek kontrol edilebilir. PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerinin PEG uzunluğu sabit tutularak, hidrofobik blok (PLGA) uzunluğu arttırıldığında sol-jel geçiş sıcaklığı ve kritik jel konsantrasyonu azalmıştır. Bu veri geçişin hidrofobik kuvvetler tarafından sağlandığını ortaya koymaktadır. Ayrıca hidrofobik blok uzunluğunun artışıyla jel-sol geçiş sıcaklığı artmıştır. PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerindeki PLGA uzunluğu sabit tutularak PEG uzunluğu 230 Da arttırıldığında ise faz diyagramı yüksek sıcaklığa kaymıştır. Jel bölgesi neredeyse sabit kalmıştır. Bu da jelin gücünün ağırlıklı olarak hidrofobik bloklar tarafından belirlendiğini göstermektedir [60, 19].

PLGA-g-PEG kopolimer sulu çözeltilerinin sol-jel geçişinin in vivo incelendiği bir çalışmada bu çözeltinin deri altı enjeksiyonu ile hidrojel deposu oluşturulmuştur. İlginç bir şekilde, hidrofilik PEG omurgasına sahip olan PEG-g-PLGA jel depoları bir hafta içerisinde absorplanırken, PLGA-g-PEG jel depoları 2 aydan daha uzun bir süre

in vivo ortamda kalmıştır. Anında oluşturulan jelin hızlı absorpsiyonu, esnek PEG omurgasının ve PLGA'in kendine özgü küçük parçacıklarının jel deposundan kolayca difüzyonunun neden olduğu nispeten zayıf mekanik özelliğinden kaynaklanabilir. Bu nedenle jelin absorplanma süresinin kontrolü polimer yapısını hidrofilik omurga-hidrofobik graft'tan hidrofobik omurga-hidrofilik grafta dönüştürme gibi basit topolojik değişimlerle gerçekleştirilebilir [61].

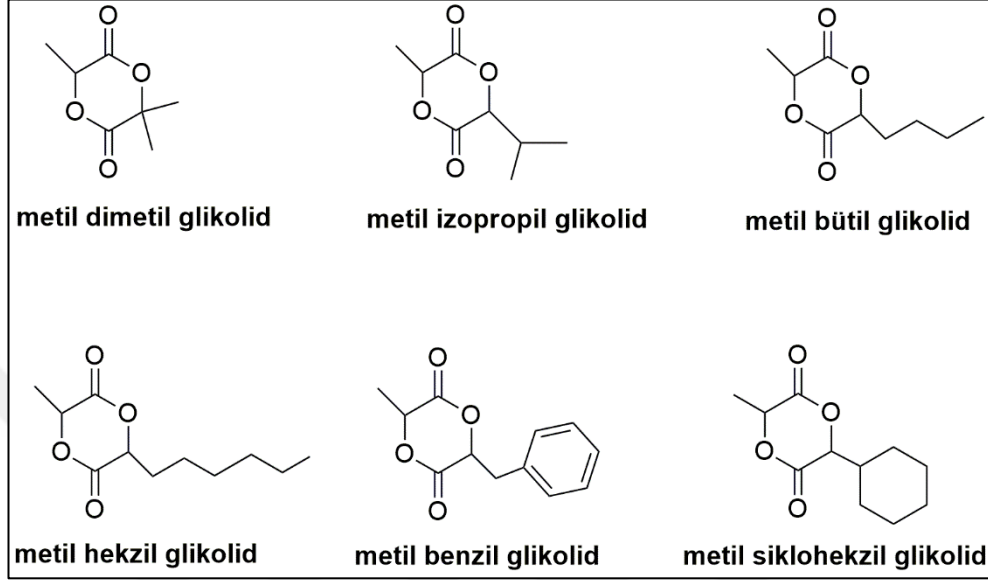
En popüler biyobozunur termojelleşen polimerler PLGA-PEG-PLGA triblok kopolimerleridir [62]. Bu termojelleşen sistemler lokal antikanser ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmıştır [62-65]. Örneğin paklitaksel yüklü PLGA-PEG-PLGA hidrojel (ReGel), ticari paklitaksel ürünü taxol ile karşılaştırıldığında meme tümöründe daha yüksek fayda sağlamıştır [62, 64]. Ayrıca bu formülasyonun klinik denemesi (oncogel) katı tümörlere karşı güvenilirliğini ve etkinliğini göstermiştir [62, 66].

1.3. Asimetrik Alkil Sübstitüye Glikolidler

PLA'nın polimer omurgasındaki fonksiyonel grup çeşitliliğinin eksikliğinden kaynaklanan dezavantajlarını iyileştirmek için yan zincirlerine çeşitli fonksiyonel gruplar ilave edilir. Böylece bozunma hızı, hidrofilitesi ve mekanik özellikleri daha iyi kontrol edilebilir [67]. Bu amaçla bir çalışmada çeşitli asimetrik glikolid monomerlerinin (monoalkil sübstitüye laktid'lerin) sentezi ve halka açılma polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle α -hidroksi asitin 2-bromopropiyonil bromür ile reaksiyonu ile ara ürün ester oluşturulmuş, ardından Et_3N ile bazik reaksiyon koşulları altında halka kapatılmıştır. Sonrasında halka açılma polimerizasyonu yöntemi ile benzil alkol varlığında çeşitli katalizörler ile polimerizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Klasik kalay(II) 2- etilhekzanoat [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] katalizörü bulk olarak veya toluen içerisinde 100°C 'de sentezlenen polimerlerin tahmin edilebilir molekül ağırlığı ve dar bir dağılım göstermesini sağlamıştır. Polimerizasyon hızı bütül, hekzil, benzil, izopropil ve dimetil grupları gibi alkil sübstituentlerinin sterik engeline karşılık gelmiştir. 1 saatlik polimerizasyondan sonra hekzil sübstitüye laktid'le elde edilen verim %83'tür. Alternatif bir katalizör olarak DMAP'nin kullanımı ile mükemmel bir dönüşüm (%97) gerçekleştirilmiştir. Bu katalizör kalay (II) 2-etilhekzanoat ve kalay (II) triflorometan sülfonatla [$\text{Sn}(\text{OTf})_2$]

karşılaştırıldığında daha fazla sterik engelli laktid'leri iyi bir molekül ağırlığı ve polidispersite kontrolü ile polimerize etmekte daha etkilidir [26].

Sentezlenen çeşitli asimetrik glikolid monomerleri Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Çeşitli asimetrik glikolid monomerleri

Sikloheksil sübstitüye glikolidlerin camsı geçiş sıcaklıklarının incelendiği bir çalışmada öncelikle asimetrik metil sikloheksil glikolid monomerini hazırlamak için 2-sikloheksil-2-hidroksiasetik asit, 2-bromopropiyonil bromür ile kondense edilmiştir. Sonrasında halka kapanması ω -bromo karboksilik asitin hafif baz ile muamelesi ile sağlanmıştır. Bu yöntem minör bileşen olarak mezo diastereomerler ile rasemik ürünlerin oluşumunu desteklemektedir. Çalışmada rac-metil sikloheksil glikolidin polimerizasyon hızı rac-disikloheksil glikolidin polimerizasyon hızından 10 kat fazla bulunmuştur. Bu sonuç metil grubuna komşu karbonilde halka açılmasının öncelikli olduğuna ve polimer omurgası boyunca sikloheksil ve metil gruplarının değişen dizilimini işaret etmektedir. Çalışmada poli (rac-laktid)'in Tg'si ise 55°C iken poli (rac-metil sikloheksil glikolid)'in Tg'si 73°C olarak ölçülmüştür. Bu yüksek Tg büyük hacimli sikloheksil grubunun polimer omurgasında sertleşme yaratmasından kaynaklanmaktadır [23].

pH=7,4'te, 37°C'de, fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen bir bozunma çalışmasında asimetrik poli (mono heksil sübstitüye laktid)'in heksil yan grubundan dolayı sterik engeli poli(laktid)'den daha fazla olmasına rağmen bozunma hızı

poli(laktid)'den biraz daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise fizyolojik sıcaklıkta PLA sert ve camsı bir yapı sergilerken ($T_g \sim 40$), heksil sübstitüye polimerlerinin kauçuksu ve viskoz bir yapıda ($T_g \sim 15$) olmasıdır. Bu çalışmada kullanılan tetrasiklin ilacının poli (heksil-sübstitüye laktid) matriksinden PLA'ya göre daha hızlı ve daha yüksek miktarda salındığı gözlemlenmiştir [68].

Lokal bölgelerdeki tümörlerin tedavisinde kullanılan biyobozunur polimerlerin bozunma yüzdeleri ve bozunma hızları tedavinin etkinliğini ve sistemin toksisitesini etkileyen en önemli parametrelerdendir. Bu nedenle sentezlediğimiz yeni ısıya hassas asimetric yeni poli (izobütül metil glikolid)-PEG blok kopolimerlerinin amorf yapısı gereği mevcut PLLA-PEG gibi yarı kristalin malzemelerden daha hızlı vücutta metabolitlerine bozunup, daha kısa sürede vücuttan uzaklaştırılarak minimum toksisite yaratacağını düşünmekteyiz. Ayrıca bu polimerler eşsiz özellikleriyle literatürde sıkça çalışılan PLGA-PEG ve PLA-PEG blok kopolimerlerine iyi bir alternatif oluşturarak biyobozunur polimerler için fiziksel özellikleri geniş bir yelpaze sağlayacaktır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

L-lösin (L-2-amino-4-metilpentanoik asit) (Sigma-Aldrich, %98), sodyum nitrit (NaNO_2) (Sigma-Aldrich) L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezinde kullanıldı. Trietilamin (Et_3N) (Sigma-Aldrich %99), 2-bromopropiyonil bromür (Sigma-Aldrich, %97), NaHCO_3 (Sigma-Aldrich %99,7) izobütil metil glikolid monomerinin sentezinde kullanıldı. Sodyum sülfat (Sigma-Aldrich), L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ve izobütil metil glikolid monomerinin sentezi sırasında saflaştırma işlemi basamağında kullanıldı. Kalay(II) 2-etilhekzanoat ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) (Aldrich, %95) katalizörü, MePEG-2000 homopolimeri (Fluka) ve PEG-2000 homopolimeri (Sigma) diblok ve triblok kopolimerlerin sentezinde kullanıldı. Sodyum klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich), potasyum klorür (KCl) (Riedel-de Haen, %99,5), disodyum hidrojen ortofosfat (Na_2HPO_4) (BDH Chemicals) ve potasyum dihidrojen ortofosfat (KH_2PO_4) (BDH Chemicals) fosfat tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı. Ethidium homodimer (ölü hücre boyası) ve calcein-AM (canlı hücre boyası) polimerlerin hücreler üzerindeki in vitro toksisitesini belirleyebilmek için Live-dead analizinde kullanıldı.

2.2. Kullanılan Çözücüler

Sülfürik Asit (H_2SO_4) (Sigma-Aldrich, %95-97) ve hekzan (Sigma-Aldrich, %95) L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezinde kullanıldı. Dietil eter (Sigma-Aldrich, %99,5) L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ve izobütil metil glikolid monomerinin sentezinde ve saflaştırılmasında kullanıldı. N,N-dimetilformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, %99) izobütil metil glikolid monomerinin sentezinde kullanıldı. Toluen (Sigma-Aldrich, %99,7) MePEG-2000 homopolimerini (Fluka) ve PEG-2000 homopolimerini kurutmak için azeotropik destilasyonda kullanıldı. THF (Sigma-Aldrich, %99,9) GPC analizlerinde hareketli faz olarak ve numune hazırlamak için kullanıldı.

2.3. Kullanılan Cihazlar

2.3.1. Azaltılmış toplam reflektans-fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR)

ATR Bruker-Tensor 27 model spektrofotometre ile 4000-600 cm^{-1} aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlüğünde 30 tarama yapılarak sentezlenen maddelerin ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi.

2.3.2. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR)

Sentezlenen bileşiklerin yapısal tayini için NMR analizlerinin bir kısmı Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında Bruker Avance III 400 MHz NMR spektrometresi ile diğer kısmı Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde Bruker Avance III 500 MHz spektrometresi ile alındı. Ayrıca ^1H -NMR ile kopolimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları da belirlendi.

2.3.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)

Jel geçirgenlik kromatografisi cihazı (GPC) ile polimerlerin molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları saptandı. Ölçümler bir pompa, bir refraktif indeks detektör (VE 3580 RI Detector) ve 3 adet kolon içeren (iki adet kolon 300x8 mm Viscotec LT4000L Mixed, Low Org ve bir ön kolon 10x4,6 mm Viscotec TGuard, Org Guard Col) kolon fırını ile donatılmış Viscotec GPCmax Autosampler sistemli cihaz ile 35°C'de gerçekleştirildi. 1 mL/dk akış hızı ile hareketli faz olarak THF (HPLC saflıkta) kullanıldı. Numuneler 5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı ve enjeksiyon hacmi 100 μL 'dir. Kalibrasyon eğrisi 1,200–400 kDa aralığındaki dokuz tane polistiren standardı ile yapıldı. Datalar OmniSEC 5,12 programı yardımıyla alındı.

2.3.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Mettler Toledo DSC1 Star System cihazı kullanılarak diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri gerçekleştirildi. Analizler -60-140°C aralığında, 10°C/dk ısıtma ve soğutma hızında iki ısıtma basamaklı olarak azot atmosferi altında yapıldı. Elde edilen veriler Mettler Toledo cihazında bulunan paket program yardımıyla hesaplandı.

2.3.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

TGA 1 STAR System cihazı kullanılarak termogravimetrik analizler gerçekleştirildi. Bunun için numuneler 40°C/dk hızla oda sıcaklığından 600°C'ye kadar ısıtıldı. Deney sırasında sisteme 20 mL/dk hacimsel akış hızında azot beslenmiştir.

2.3.6. İnkübatör

VWR Incubator Microplate Shaker 37°C'de, 200 rpm karıştırma hızı ile kopolimer jellerinin biyobozunurluk testleri için kullanıldı.

2.3.7. Liyofilizatör

Labconco FreeZone Plus Cascade Freeze Dry Systems 2,5 L cihazı biyobozunurluk testi sonrasında polimerlerin içinde kalan eser miktarda suyu uzaklaştırmak için kullanıldı.

2.3.8. CO₂ inkübatör

N-Biotek inkübatör cihazı 37°C'de, %5 CO₂ ortamı ile biyoyumluluk çalışmalarında kullanıldı.

2.3.9. Mikroplaka okuyucu

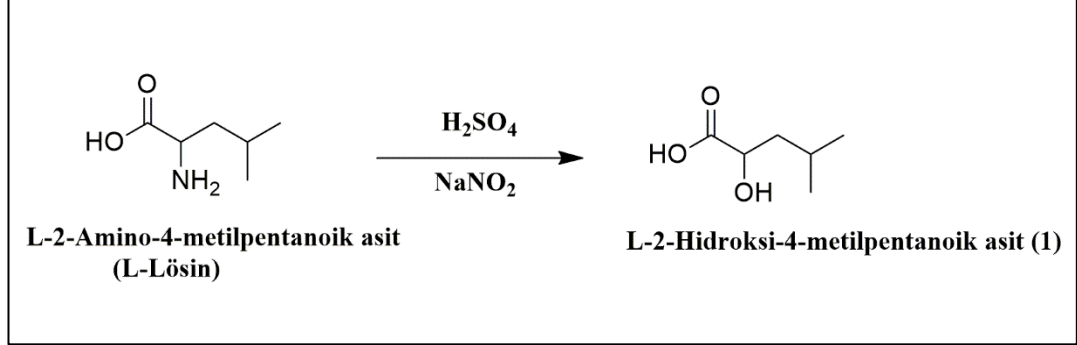
FlexStation3 molecular devices cihazı 440 nm dalga boyu ile WST-1 testi sırasında kuyucuklardaki örneklerin absorbans değerlerini okumak için kullanıldı.

2.3.10. Optik mikroskop

Olympus optik mikroskop kullanılarak Live-dead analizleri sırasında canlı ve ölü hücrelerin 20x'de görüntüleri alındı.

2.4. Yöntem

2.4.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi



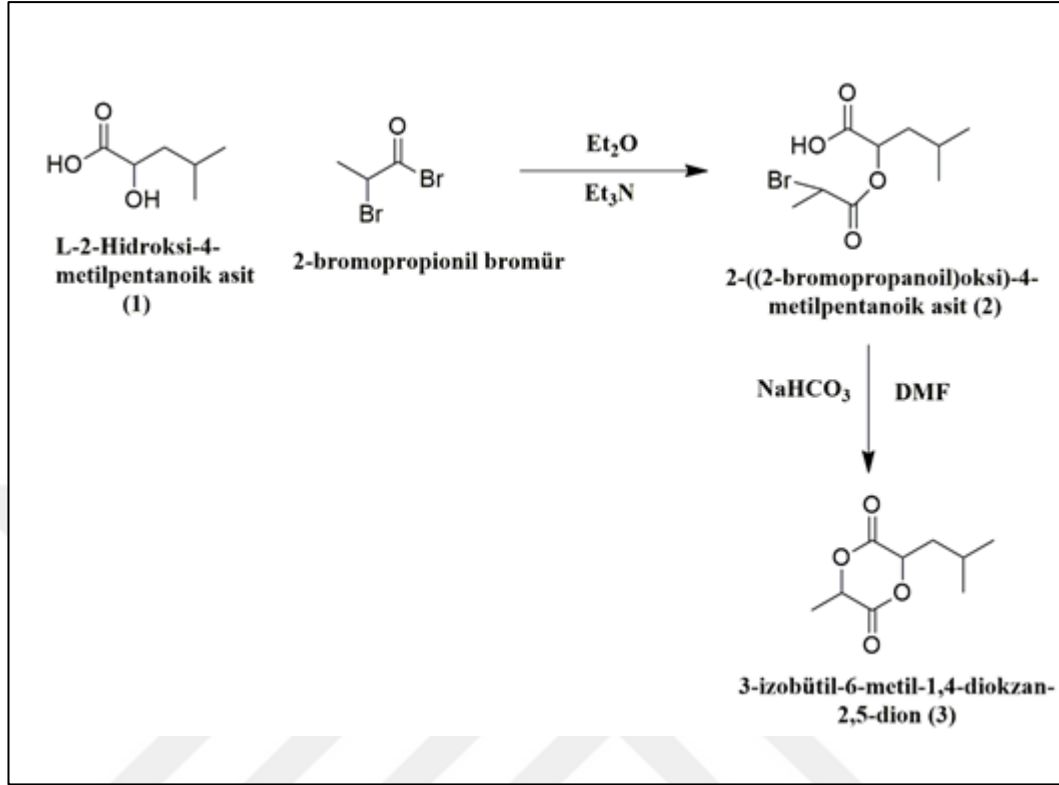
Şekil 2.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi

Öncelikle L-lösin (L-2-amino-4-metilpentanoik asit) (13,38 g, 0,1 mol) 2,5 M H₂SO₄ (80 mL, 0,2 mol) içerisinde çözüldü ve hazırlanan bu solüsyonun sıcaklığı 0°C'ye düşürüldü. Ardından 80 ml deiyonize su içerisinde NaNO₂ (41,4 g, 0,6 mol) çözeltisi hazırlandı ve hazırlanan bu çözelti sıcaklık 0°C'de tutularak bir damlatma hunisi ile karışmakta olan solüsyona damla damla eklendi. Ardından reaksiyon 3 saat daha 0°C'de karıştırıldı. 3 saat sonra reaksiyon oda sıcaklığına getirilerek 24 saat daha karıştırıldı. Reaksiyon karışımı dietil eter (3x80 ml) ile ekstrakte edildi ve organik fazlar birleştirilerek susuz sodyum sülfat ile kurutuldu. Kurutulan faz filtre edildi ve dietil eter evaporatörde vakum altında uçuruldu. Elde edilen viskoz kalıntı eterle çözüldü, hekzan ile çöktürülerek kristallendirildi ve bir süre -20°C'de bekletildi. Sonuç olarak L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (1) beyaz kristalleri %52 verim ile elde edildi (Şekil 2.1) [69].

ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3420 (OH), 2955, 2934, 2905, 2878 (CH), 1701 (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,92-1,08 (d, 6H, CH₃, CH₃); 1,58-1,72 (t, 2H, CH₂); 1,82-2,02 (m, 1H, CH); 4,26-4,38 (t, 1H, CH); 6,4-8,2 (b, 2H, OH, OH). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 21,4; 23,15; 24,44; 43,11; 68,97; 179,98.

2.4.2. 3-izobütil-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion (izobütil metil glikolid) sentezi



Şekil 2.2. 3-izobütil-6-metil-1,4-diokzan-2,5-dion (izobütil metil glikolid) sentezi

Asimetrik izobütil metil glikolid monomerinin (3) sentezi iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada α -bromo alkil bromürün α -hidroksi asitle kondenzasyon tepkimesiyle Et_2O ve Et_3N varlığında ara ürün esteri (2) oluşturuldu [70]. Ardından DMF ve NaHCO_3 varlığında halka kapatılarak bir asimetrik alkil substitüye glikolid olan izobütil metil glikolid monomeri (3) sentezlendi (Şekil 2.2) [70].

Sentez reaksiyonlarını ayrıntılı bir şekilde açıklarsak;

Çalışmanın ilk kısmında L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2,5 g, 18,91 mmol) oda sıcaklığında 150 ml dietil eterle çözüldü. Tuz/buz banyosuna konuldu ve argon gazı altında 0°C 'de çözeltiliye 2-bromopropionil bromür (2,6 ml, 24,15 mmol) eklendi. 24 ml dietil eterde çözülmüş olan 4,4 ml trietil amin (Et_3N) çözeltiliye 1 saatin üzerinde damla damla eklendi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 0°C 'de yarım saat daha karışmaya devam etti. Sonrasında elde edilen beyaz renkli kalıntı 15 ml, 15 ml, 10 ml deiyonize su ile 3 kez yıkanıp Na_2SO_4 ile kurutuldu. Kurutulan faz filtre edildi ve eter evaporatörde vakum altında uçuruldu. Sonuç olarak açık sarı renkli 2-((2-

bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit (2) viskoz sıvısı %95 verim ile elde edildi (Şekil 2.2) [70].

ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2960, 2871 (CH), 1722 (C=O).

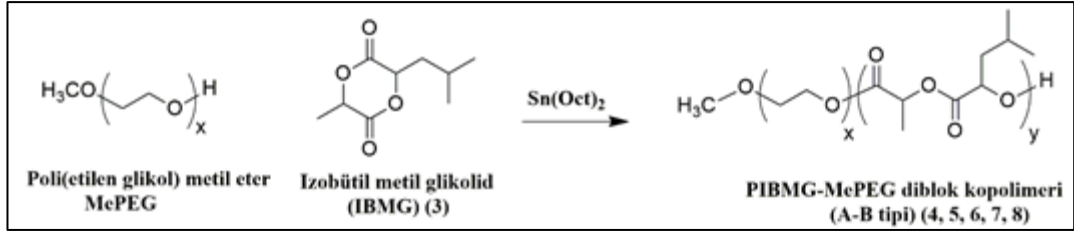
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,91-0,98 (d, 3H, CH_3); 0,98-1,04 (d, 3H, CH_3); 1,67-1,79 (m, 1H, CH); 1,8-1,96 (m, 5H, CH_3 , CH_2); 4,37-4,52 (m, 1H, CH); 5,06-5,18 (m, 1H, CH); 8,7-9,7 (b, 1H, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : (21,31-21,42); (21,45-21,67); (22,98-23); (24,59-24,66); (39,04-39,39); (39,48-39,53); (71,62-71,65); (169,67-169,98); (175,84-175,97-176,12).

Çalışmanın ikinci kısmında 140 ml DMF içerisinde NaHCO_3 (2,54 g, 30,25 mmol) süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu süspansiyon 40°C 'de şiddetli bir şekilde karıştırılırken 20 ml DMF içerisindeki 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit (4,78 g, 17,89 mmol) çözeltisi süspansiyona 4 saat boyunca damla damla eklendi. Ekleme bittikten sonra reaksiyon 3 saat daha 40°C 'de karıştırıldı ve ardından DMF düşük basınç altında evaporatörde uçuruldu. Sarı-beyaz katı bir ürün oluştu. Oluşan bu ürün 3x40 ml dietil eterle yıkanarak organik faza alındı ve bu faz ayırma hunisine eklendi. Organik fazda 15 ml, 15 ml, 10 ml deiyonize su ile 3 kez yıkanıp Na_2SO_4 ile kurutuldu. Kurutulan faz filtre edildi ve eter evaporatörde vakum altında uçuruldu. Sonuç olarak %77 verim ile beyaz renkli katı bir ürün elde edildi. Elde edilen bu ürün sıcak-soğuk kristallendirme yöntemi ile dietil eterle kristallendirildi ve kristaller hekzanla yıkandı. Sonuç olarak %50 verim ile izobütil metil glikolid monomeri (3) elde edildi (Şekil 2.2) [70].

ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2961, 2880 (CH), 1749 (C=O).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,88-1,06 (m, 6H, CH_3 , CH_3); 1,64-1,7 (d, 3H, CH_3); 1,8-2,04 (m, 3H, CH, CH_2); 4,89-4,97 (dd, 1H, CH); 5,02-5,09 (q, 1H, CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : (15,84-17,37); (21,31-21,51); (22,7-23); (23,86-24,22); (38,69-40,45); (72,25-72,37); (74,33-75,61); 166,24; (167,32-167,51).

2.4.3. PIBMG-MePEG diblok kopolimer sentezi



Şekil 2.3. PIBMG-MePEG diblok kopolimer sentezi

Çeşitli molekül ağırlıklarındaki PIBMG-MePEG diblok kopolimerleri sentezlenmeden önce, MePEG-2000 homopolimeri 160°C’de, toluen’de azeotropik destilasyonla kurutuldu.

PIBMG-MePEG 6 sentezlenirken öncelikle 21,32 mg Sn(Oct)₂ (0,05 mmol) deney tüpünün çeperlerine bulaştırmadan dikkatli bir şekilde tüpe eklendi. Ardından 240 mg MePEG (0,12 mmol) ve 558,63 mg izobütül metil glikolid (3 mmol) tüpe eklendi. Reaksiyon argon gazı altında 120°C’de 3 saat süreyle karıştırılarak gerçekleştirildi. Krem rengi diblok kopolimer elde edildi (Şekil 2.3).

PIBMG-MePEG 4, 5, 7, 8’de aynı yöntemle sentezlendi. Deneysel koşullar Tablo 2.1’de gösterildi.

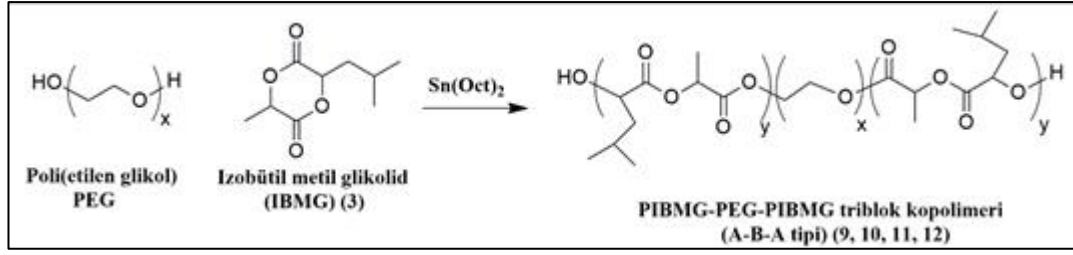
ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2958, 2821 (CH); 1755 (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,93-0,95 (d, 3H, CH₃); 0,96-0,98 (d, 3H, CH₃); 1,57-1,59 (d, 3H, CH₃); 1,78-1,87 (m, 3H, CH, CH₂); 3,65 (s, 2H, CH₂); 5,10-5,13 (dist. dd, 1H, CH); 5,15-5,17 (dist. q, 1H, CH). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 16,69; 21,36; 23,00; 24,55; 39,27; 68,98; 70,57; 71,41; (169,47-169,56); (169,77-169,87).

Tablo 2.1. PIBMG-MePEG sentezi için deneysel koşullar

No	MePEG-2000 (mmol)	IBMG (mmol)	Sn(Oct) ₂ (mmol)	Süre (saat)	Sıcaklık (°C)
4	0,12	1	0,05	3	120
5	0,12	2	0,05	3	120
6	0,12	3	0,05	3	120
7	0,12	4	0,05	3	120
8	0,12	8	0,05	3	120

2.4.4. PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimer sentezi



Şekil 2.4. PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimer sentezi

PIBMG-PEG-PIBMG 11 sentezlenirken öncelikle 21,32 mg Sn(Oct)₂ (0,05 mmol) deney tüpünün çeperlerine bulaştırmadan dikkatli bir şekilde tüpe eklendi. Ardından 240 mg PEG (0,12 mmol) ve 558,63 mg izobütül metil glikolid (3 mmol) tüpe eklendi. Reaksiyon argon gazı altında 120°C’de 3 saat süreyle karıştırılarak gerçekleştirildi. Krem rengi jelimsi triblok kopolimer elde edildi (Şekil 2.4).

PIBMG-PEG-PIBMG 9, 10, 12’de aynı yöntemle sentezlendi. Deneysel koşullar Tablo 2.2’de gösterildi.

ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2958, 2821 (CH); 1752 (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,93-0,95 (d, 3H, CH₃); 0,96-0,98 (d, 3H, CH₃); 1,57-1,59 (d, 3H, CH₃); 1,78-1,87 (m, 3H, CH, CH₂); 3,65 (s, 2H, CH₂); 5,10-5,13 (dist. dd, 1H,CH); 5,15-5,17 (dist.q, 1H, CH). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 16,69; 21,37; 23,00; 24,55; 39,28; 68,98; 70,56; 71,41; (169,47-169,56); (169,77-169,87).

Tablo 2.2. PIBMG-PEG-PIBMG sentezi için deneysel koşullar

No	PEG-2000 (mmol)	IBMG (mmol)	Sn(Oct) ₂ (mmol)	Süre (saat)	Sıcaklık (°C)
9	0,12	1	0,05	3	120
10	0,12	2	0,05	3	120
11	0,12	3	0,05	3	120
12	0,12	4	0,05	3	120

2.4.5. Kopolimerlerin ısıya hassaslık özelliklerinin incelenmesi

Her bir bileşenin uzunluğu özenle ayarlanmış çeşitli konsantrasyonlardaki diblok 4, 5 ve triblok 9 kopolimerlerinin ısıya hassaslık özellikleri uygun jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi ile incelendi. Bunun için kopolimerler oda koşullarında belirli hacimlerde deiyonize su ile vorteks kullanarak karıştırıldı ve çeşitli

konsantrasyonlarda süspansiyonlar hazırlandı (Tablo 2.3). Ardından bu süspansiyonlardan homojen karışım gösterenler +4°C’de yarım saat bekletildikten sonra uygun jel-sol geçiş sıcaklıkları ısı kontrollü su banyosunda 4-48°C aralığında ikişer derece arttırılarak ve her bir sıcaklık noktasında 2 dakika bekletilerek kopolimerin bulunduğu vialin ters çevrilmesiyle belirlendi.

Tablo 2.3. Jel-sol geçiş sıcaklığının belirlenmesi için test edilen kopolimer konsantrasyonları

No	Kopolimer	% Konsantrasyon (mg/μL)
4	Diblok	31, 31,5, 32,5, 33
5		30,5, 31, 31,5, 32
9	Triblok	38, 39, 40, 41

Sonuç olarak enjeksiyon için gerekli olan sıcaklıkta (40-41°C) sol (akışkan) formunda olan, vücuda enjekte edildiğinde ise fizyolojik koşullar altında (37°C) hızla hedef dokuda jel oluşturabilen uygun molekül ağırlığı ve konsantrasyondaki kopolimerler belirlendi.

2.4.6. Fosfat tampon çözeltisinin (PBS) hazırlanması

2 g NaCl, 0,05 g KCl, 0,36 g Na₂HPO₄ ve 0,06 g KH₂PO₄ 200 ml deiyonize su içerisinde çözüldü ve homojen bir karışım elde edene kadar karıştırıldı. Çözeltinin pH’ı pH_{metre} ile 7,4 olarak okundu. Bu nedenle seyreltik HCl çözeltisi ile pH ayarı yapılmasına gerek duyulmadı. Ardından son hacim 250 mL’ye tamamlandı.

2.4.7. Biyobozunurluk

Öncelikle 250 μL toplam hacimle %31,5 konsantrasyonunda diblok (5) ve %26 konsantrasyonunda triblok (10) kopolimerleri viallerin içerisine tartıldı. Ardından üzerlerine pH’ı 7,4 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklenerek son hacim 250 μL’ye tamamlandı. Ayrıca %31,5 konsantrasyonundaki diblok (5) kopolimeri üzerine deiyonize su eklenerek de son hacim 250 μL’ye tamamlandı. Her bir numune homojen bir jel elde edene kadar vortekslenerek üzerlerine 1’er ml fosfat tampon çözeltisi jeli kaldırmadan yavaş yavaş eklendi. Deiyonize su ile hazırlanan %31,5 konsantrasyonundaki diblok (5) kopolimeri üzerine ise 1 ml deiyonize su jeli kaldırmadan yavaş yavaş eklendi. Vialler inkübatör içerisine 37°C’de 200 rpm karıştırma hızı ile yerleştirildi. Her 5, 6 günde bir numunelerin üzerlerindeki PBS bir

mikropipet yardımıyla tazelendi. 10. günün sonunda deiyonize su ile hazırlanan %31,5 konsantrasyonundaki diblok (5) kopolimerinin bulunduğu vialler inkibatörden çıkarıldı ve ardından -20°C’de buzdolabında dondurularak polimerin içerisinde su liyofilizatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Molekül ağırlıklarındaki kayıp GPC kullanılarak belirlendi. 20. günün ve 30. günün sonunda ise diğer vialler inkibatörden çıkarılarak üzerlerindeki PBS alındı. Ortamdaki tuzlardan tamamen kurtulmak için deiyonize su ile 4 kez yıkandı. Ardından -20°C’de buzdolabında donduruldu ve polimerlerin içerisinde kalan eser miktardaki su liyofilizatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Yine molekül ağırlıklarındaki kayıp GPC kullanılarak belirlendi.

2.4.8. Biyouyumluluk

Çeşitli konsantrasyonlardaki diblok (5) ve triblok (9) kopolimerlerinin in vitro biyouyumluluğu L-929 fare fibroblast hücre hattı ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde test edildi. Bunun için öncelikle hücre kültürü çalışmaları yapıldı ve ardından hücre çoğalmasını ve polimerlerin potansiyel sitotoksitesini değerlendirebilmek için çeşitli testler uygulandı.

2.4.8.1. Hücre kültürü

Polimerlerin biyouyumluluğu L-929 hücreleri ve dermal fibroblast hücreleri üzerinde değerlendirildi. L-929 hücreleri 37°C’de %5 CO₂’li ortamda DMEM (yüksek glikoz) + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B çoğalma besiyeri ile kültürlendi. Dermal fibroblast hücreleri ise DMEM/F12 + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B + bFGF (1 ng/mL) çoğalma besiyeri ile yine 37°C’de %5 CO₂’li ortamda kültürlendi.

2.4.8.2. Biyouyumluluk değerlendirmeleri

Bütün çalışmalar 96 kuyucuklu doku kültürü polistiren plakalarda gerçekleştirildi. Kültürlenmiş olan L-929 hücrelerinin sayımı ($1,4 \times 10^6$ hücre) yapıldıktan sonra plakaya ekilerek (her bir kuyucuk için 2×10^4 hücre, 200 µL) yüzeye tutunmaları ve uzanmaları için inkibatör içerisinde 24 saat, 37°C’de %5 CO₂’li ortamda tutuldu. Aynı şekilde kültürlenmiş olan dermal fibroblast hücrelerinin de sayımı ($3,45 \times 10^6$ hücre) yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu başka bir plakaya ekilerek (her bir kuyucuk için 7500

hücre, 200 µL) yüzeye tutunmaları ve uzanmaları için yine inkibatör içerisinde 24 saat, 37°C'de %5 CO₂'li ortamda tutuldu. 24 saat sonra seri seyreltme yöntemi ile çeşitli konsantrasyonlarda (3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL) diblok (5) ve triblok (9) kopolimer çözeltileri hazırlanarak hücrelerin üzerindeki tüm besiyer hızlı bir şekilde atılıp kuyucuklara ekildi ve 48 saat boyunca inkibatör içerisinde %5 CO₂'li ortamda 37°C'de tutuldu. Kontrol grubu (TCP) olarak kullanılabilmesi için kuyucukların bazılarındaki hücrelerin üzerine sadece taze besiyeri eklendi.

2.4.8.3. Sitotoksosite testleri

Polimerlerin hücreler üzerindeki in vitro toksisitesi WST-1 çoğalma ve sitotoksosite testi ve Live-dead analizi ile değerlendirilmiştir.

2.4.8.4. WST-1 testi

Öncelikle karanlıkta %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren fenol red'siz L-DMEM besiyeri ile %5'lik WST-1 solüsyonu hazırlandı. Ardından bu solüsyon çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan diblok (5) ve triblok (9) kopolimer çözeltileri ile 48 saat boyunca inkübe edilmiş olan L-929 hücreleri üzerine her bir kuyucukta 200 µL olacak şekilde eklendi. Her bir örnekten 5'er tane çalışıldı. Işık almaması için alüminyum folyo ile kapatılan plaka 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 1 saat bekletildi. Ardından mikropilaka okuyucu (FlexStation3, Molecular Devices) kullanılarak 440 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri okundu.

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan diblok (5) ve triblok (9) kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitelerini belirleyebilmek için yine 48 saat sonra hazırlanan WST-1 solüsyonundan her bir kuyucuğa 200 µL konuldu. Her bir örnekten 4'er tane çalışıldı. Işık almaması için alüminyum folyo ile kapatılan plakalar 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 1 saat bekletildi. Ardından mikropilaka okuyucu (FlexStation3, Molecular Devices) kullanılarak 440 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri okundu.

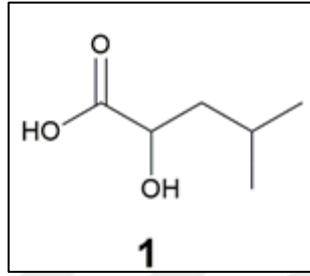
2.4.8.5. Live-dead analizi

Bu analizde floresans özellikteki ethidium homodimer (ölü hücre boyası) ve calcein-AM (canlı hücre boyası) kullanılarak canlı hücreler yeşile, ölü hücreler ise kırmızıya boyanmıştır. Bunun için öncelikle 14 ml'lik bir tüp alüminyum folyo ile sarıldı. Bu tüpe 2,5 mL fenol red'siz LDMEM besiyeri, 5 µL ethidium homodimer ve 1,25 µL calcein-AM konularak bir karışım hazırlandı.

Calcein-AM boyası FBS'den etkilendiği için yıkama yapıldı. Bunun için analiz için ayrılan kuyucuklardaki (her bir plaka için 22 kuyucuk) eski besiyer atılarak her bir kuyucuğa 100 µL fenol red'siz L-DMEM besiyeri konuldu. Sonra bu 100 µL atılarak boyaların bulunduğu karışımdan 100 µL eklendi. Ardından alüminyum folyo ile kuyucuklar örtülerek yarım saat oda koşullarında bekletildi. Net görüntü alabilmek için yarım saat sonra tekrar yıkama yapıldı. Bunun için kuyucuklara tekrardan fenol red'siz L-DMEM besiyeri konuldu. Ardından floresan ataçmanlı mikroskopta 20x büyütme sağlayan objektif kullanılarak görüntüleri alındı.

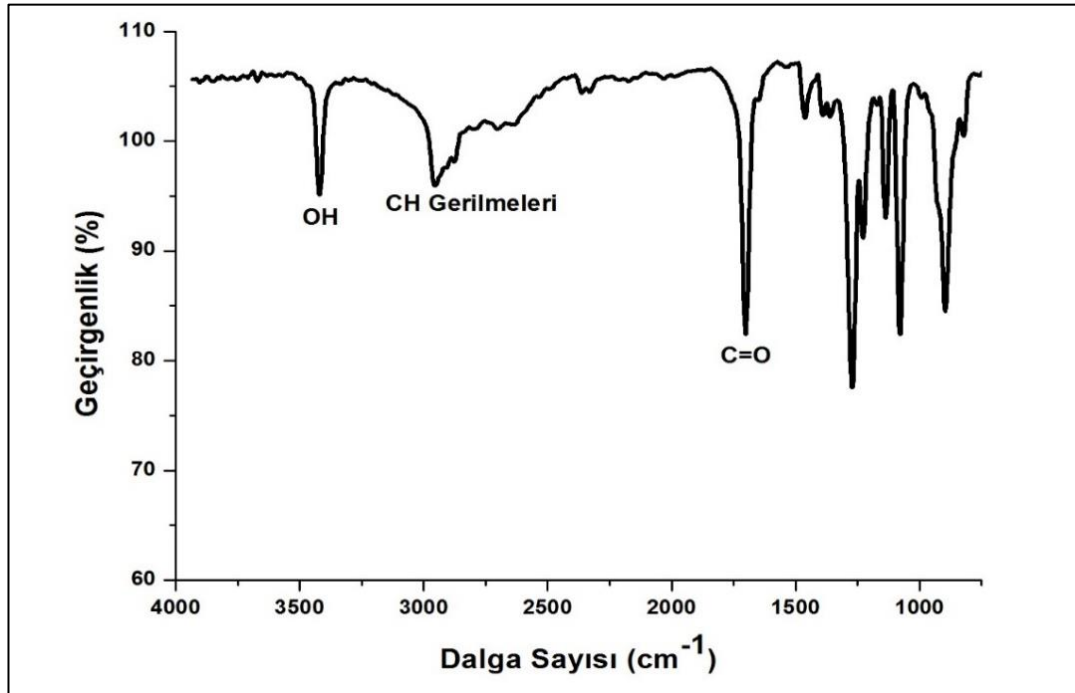
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. L-2-Hidroksi-4-Metilpentanoik Asit (1)



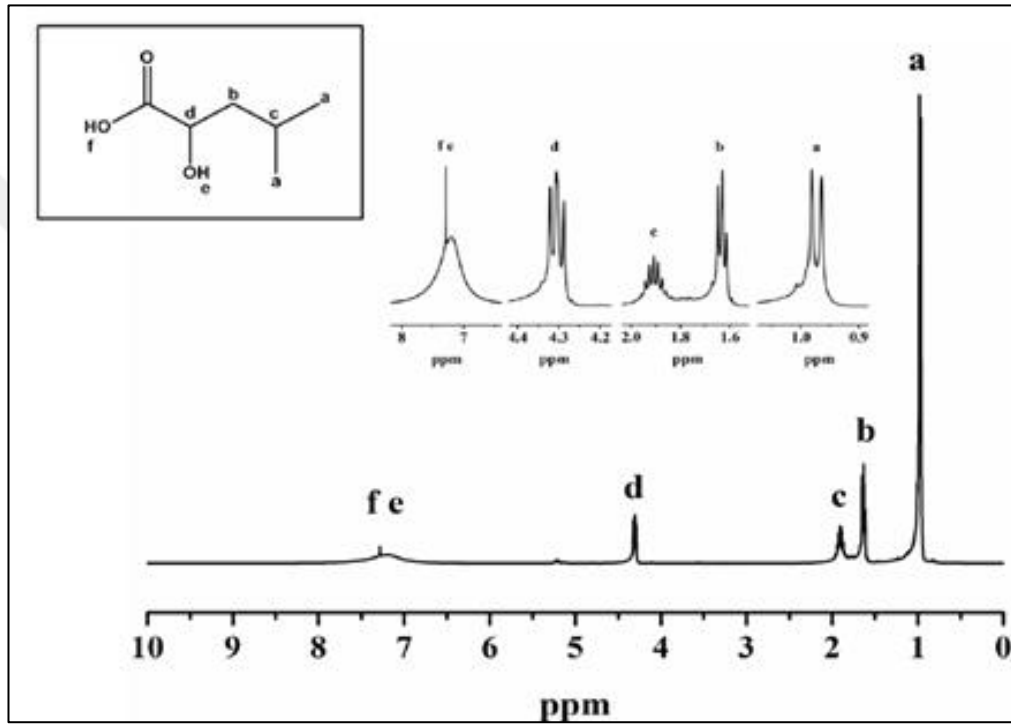
Şekil 3.1. 1 bileşiği

L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi L-2-amino-4-metilpentanoik asit (L-Lösin) başlangıç maddesi kullanılarak NaNO_2 ve H_2SO_4 varlığında 0°C 'de gerçekleştirildi (Şekil 3.1). 1 bileşiğinin karakterizasyonu spektroskopik ATR-FTIR, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ teknikleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ve değerlendirmeleri aşağıda verilmektedir.



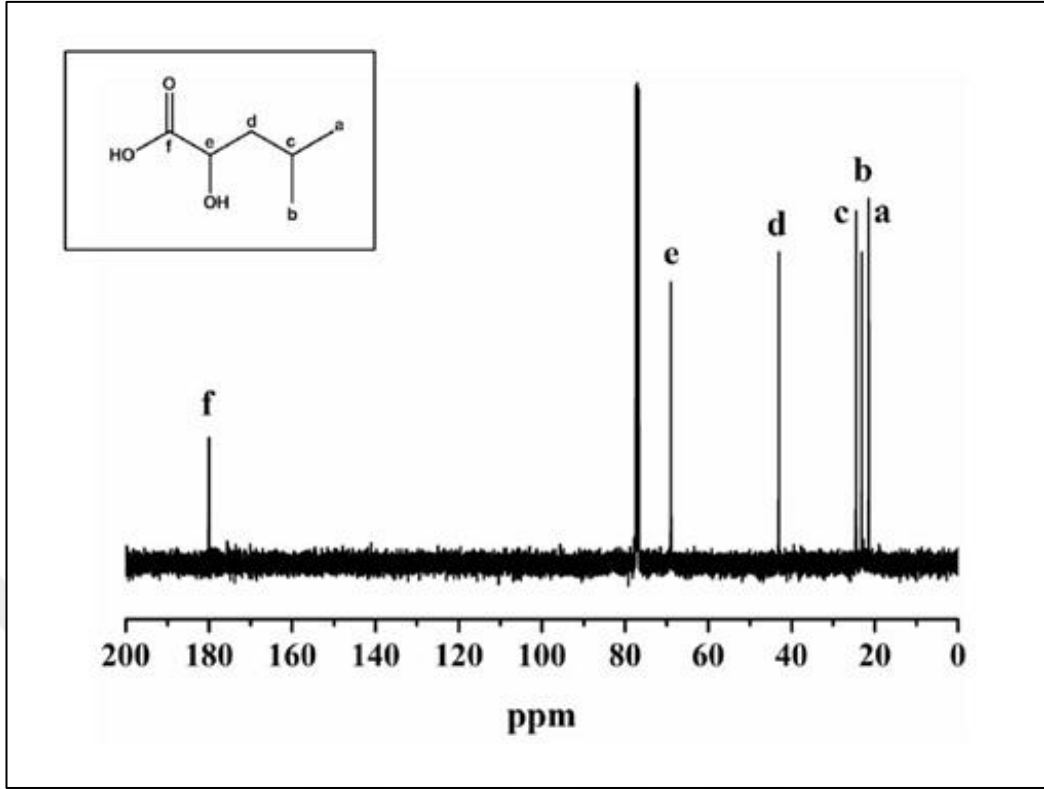
Şekil 3.2. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ATR-FTIR spektrumu

1 bileşiminin ATR-FTIR spektrumu (Şekil 3.2) incelendiğinde 1701 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik karboksilik asit grubunun karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 2955 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 2905 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} 'de gözlenen pikler C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. 3420 cm^{-1} 'de gözlenen pik ise hidroksil (OH) grubuna aittir ve başlangıç maddesinde (L-Lösin) görünmemektedir. (Başlangıç maddesi L-Lösinin ATR-FTIR spektrumu EK-A'da verilmiştir.) Bu da L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.3. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ^1H -NMR spektrumu

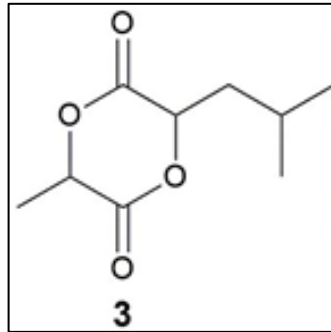
1 bileşiminin ^1H -NMR spektrumu (Şekil 3.3) literatürdeki değerlendirmeler [69] ve teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlanmıştır. A ile gösterilmiş 2 tane CH_3 protonuna ait altı protonluk ikili bir pik 0,92-1,08 ppm'de gelmiştir. B ile gösterilmiş CH_2 protonuna ait üçlü bir pik 1,58-1,72 ppm'de gelmiştir. C ile gösterilmiş CH protonuna ait çoklu bir pik 1,82-2,02 ppm'de gelmiştir. D ile gösterilmiş CH protonununa ait üçlü bir pik 4,26-4,38 ppm'de gelmiştir. E ve F ile gösterilmiş OH protonlarına ait yayvan pik ise 6,4-8,2 ppm arasında gelmiştir. Ayrıca piklerin altında kalan alanlarında proton sayıları ile doğru orantılı olduğu görüldü.



Şekil 3.4. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asitin ¹³C-NMR spektrumu

1 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (Şekil 3.4) literatürdeki bilgiler [69] ve teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlanmıştır. A kodlu karbona ait pik 21,4 ppm'de, b kodlu karbona ait pik 23,15 ppm'de, c kodlu karbona ait pik 24,44 ppm'de, d kodlu karbona ait pik 43,11 ppm'de, e kodlu karbona ait pik 68,97 ppm'de ve f kodlu karbona ait pik 179,98 ppm'de gelmiştir. Elde edilen verilerin literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir [69].

3.2. 3-İzobütil-6-Metil-1,4-Diokzan-2,5-Dion (3) (İzobütil Metil Glikolid) Monomerinin Sentez ve Karakterizasyonu

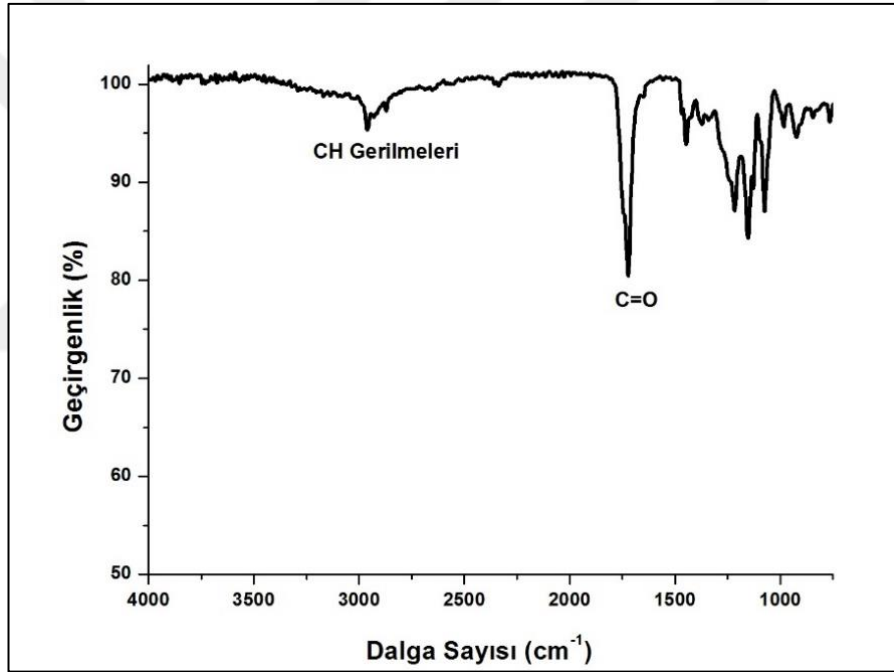


Şekil 3.5. 3 bileşiği

Asimetrik izobütil metil glikolid monomerinin (Şekil 3.5) sentezi iki aşamada gerçekleştirildi.

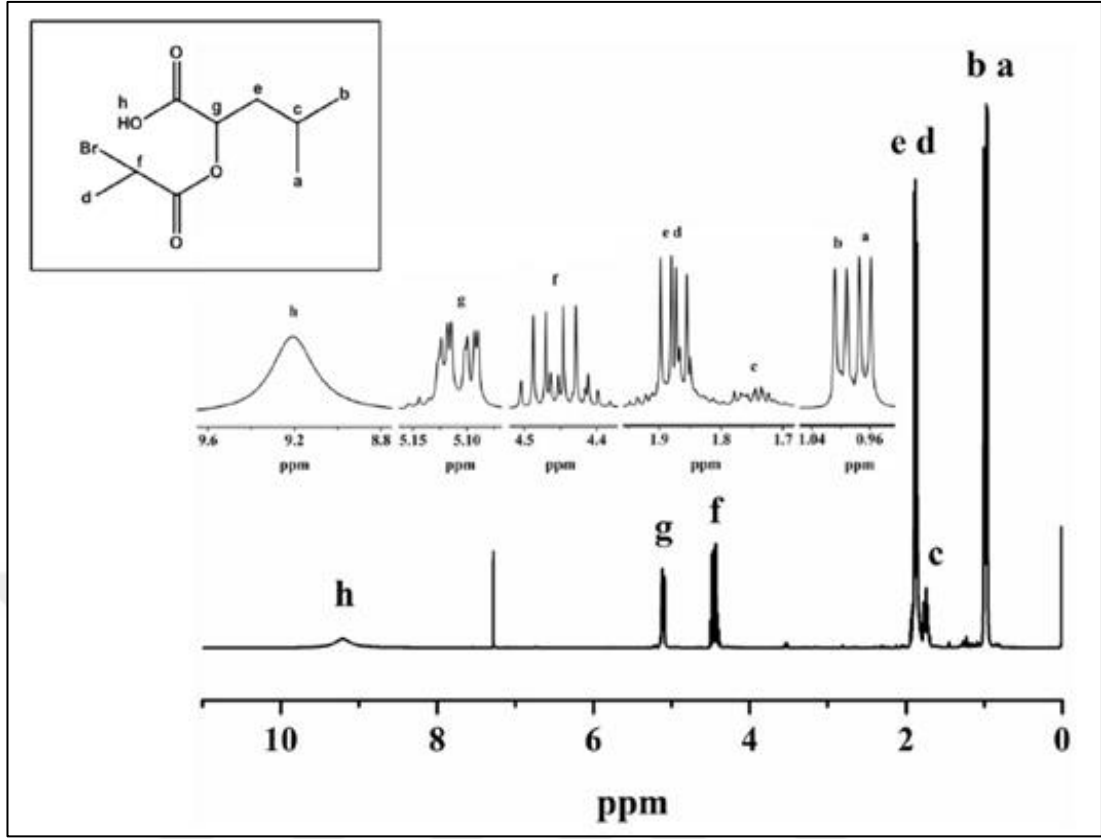
İlk aşamada α -bromo alkil bromürün (2-bromopropionil bromür) α -hidroksi asitle (L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit) kondenzasyon tepkimesiyle Et_2O ve Et_3N varlığında bir ara ürün esteri olan 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit (2) elde edildi [70].

2 bileşiğinin karakterizasyonu spektroskopik ATR-FTIR, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ teknikleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ve değerlendirmeleri aşağıda verilmektedir.



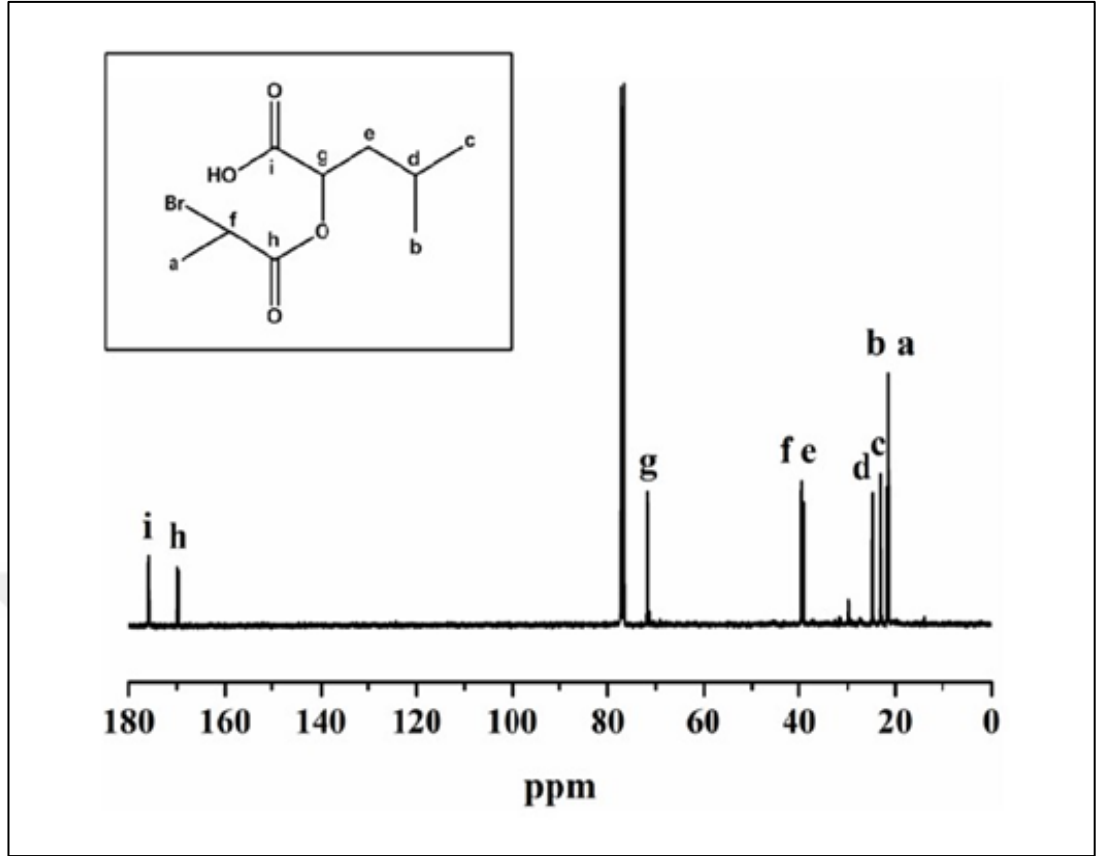
Şekil 3.6. 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asitin ATR-FTIR spektrumu

2 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.6) 1722 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik karbonil (C=O) gerilmesine aittir. 2960 cm^{-1} ve 2871 cm^{-1} 'de gözlenen pikler C-H gerilmelerine aittir. Ayrıca L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (1) başlangıç maddesindeki karboksilik asit grubunun karbonil gerilmesi 1701 cm^{-1} 'de görülmüştü. Fakat 2 bileşiğinin karbonil gerilmesi ise 1722 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu da reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.7. 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asitin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

2 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.7) teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlanmıştır. A ile gösterilmiş CH_3 protonuna ait ikili bir pik 0,91-0,98 ppm'de gelmiştir. B ile gösterilmiş CH_3 protonuna ait ikili bir pik 0,98-1,04 ppm'de gelmiştir. C ile gösterilmiş CH protonuna ait çoklu bir pik 1,67-1,79 ppm'de gelmiştir. D ve E gösterilmiş CH_3 ve CH_2 protonlarına ait beş protonluk çoklu bir pik 1,8-1,96 ppm'de gelmiştir. F ile gösterilmiş CH protonuna ait iki ayrı iç içe geçmiş dörtlü bir pik 4,37-4,52 ppm'de gelmiştir. G ile gösterilmiş CH protonuna ait iki ayrı iç içe geçmiş ikilinin ikilisi (doublet of doublet) bir pik 5,06-5,18 ppm'de gelmiştir. F ve G ile gösterilmiş piklerde diastomer karışımının varlığı görüldü. Ayrıca L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (1) başlangıç maddesindeki 4,26-4,38 ppm'de gelen CH protonuna ait pikin, 2 bileşiğinde 5,06-5,18 ppm'e kayması sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (1) başlangıç maddesindeki yayvan OH piki iki protona denk gelirken, 2 bileşiğinde yayvan OH pikine ait alan bir proton olarak gelmiştir. Bu da halkanın bir tarafının kapandığını göstermektedir. Ayrıca piklerin altında kalan alanların da tüm proton sayıları ile orantılı olduğu görüldü.

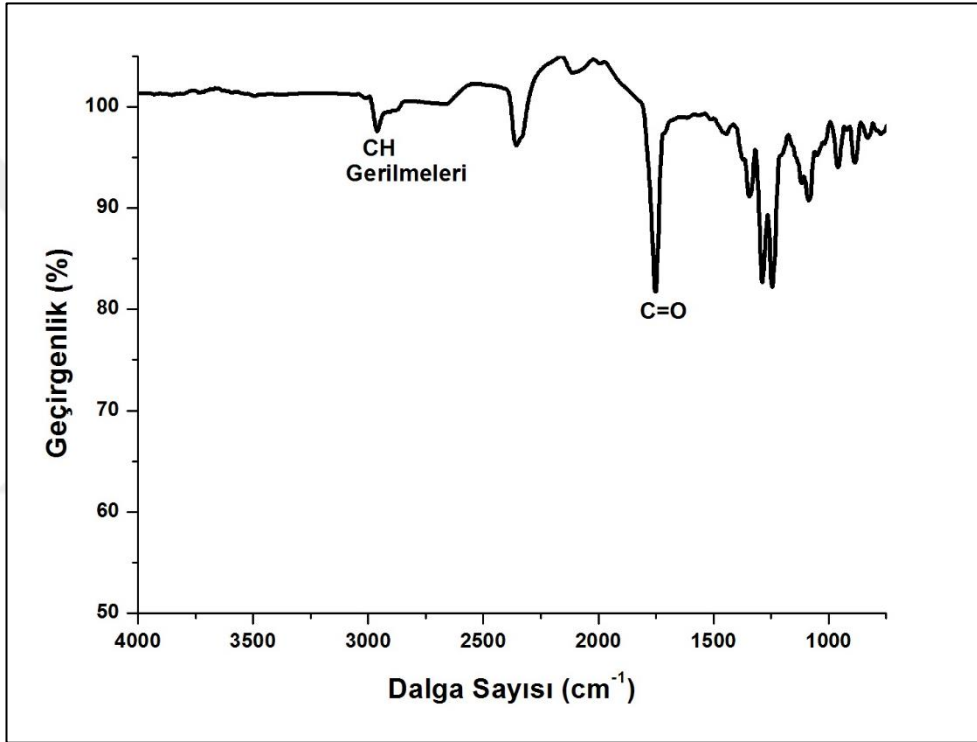


Şekil 3.8. 2-((2-bromopropanoil)oksi)-4-metilpentanoik asitin ^{13}C -NMR spektrumu

2 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (Şekil 3.8) teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlandı. A kodlu karbona ait pik 21,31 ve 21,42 ppm'de, b kodlu karbona ait pik 21,45 ve 21,67 ppm'de, c kodlu karbona ait pik 22,98 ve 23 ppm'de, d kodlu karbona ait pik 24,59 ve 24,66 ppm'de, e kodlu karbona ait pik 39,04 ve 39,39 ppm'de ve f kodlu karbona ait pik 39,48 ve 39,53 ppm'de, g kodlu karbona ait pik 71,62 ve 71,65 ppm'de, h kodlu karbona ait pik 169,67 ve 169,98 ppm'de ve i kodlu karbona ait pik 175,84, 175,97 ve 176,12 ppm'de gelmiştir. Her bir karbon atomu için bulunan 2 farklı değer ile sentezlenen bileşiğin rasemik karışım halinde olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (1) başlangıç maddesinde karbonil karbonuna ait tek bir kimyasal kayma değeri gözlemlenirken, 2 bileşiğinde ise karbonil karbonuna ait iki farklı kimyasal kayma değerinin gözlemlenmesi ve başlangıç maddesinde (1) 68,97 ppm'de gelen pikin 2 bileşiğinde halkanın bir tarafının kapanması ile 71,62-71,65 ppm'e kayması reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

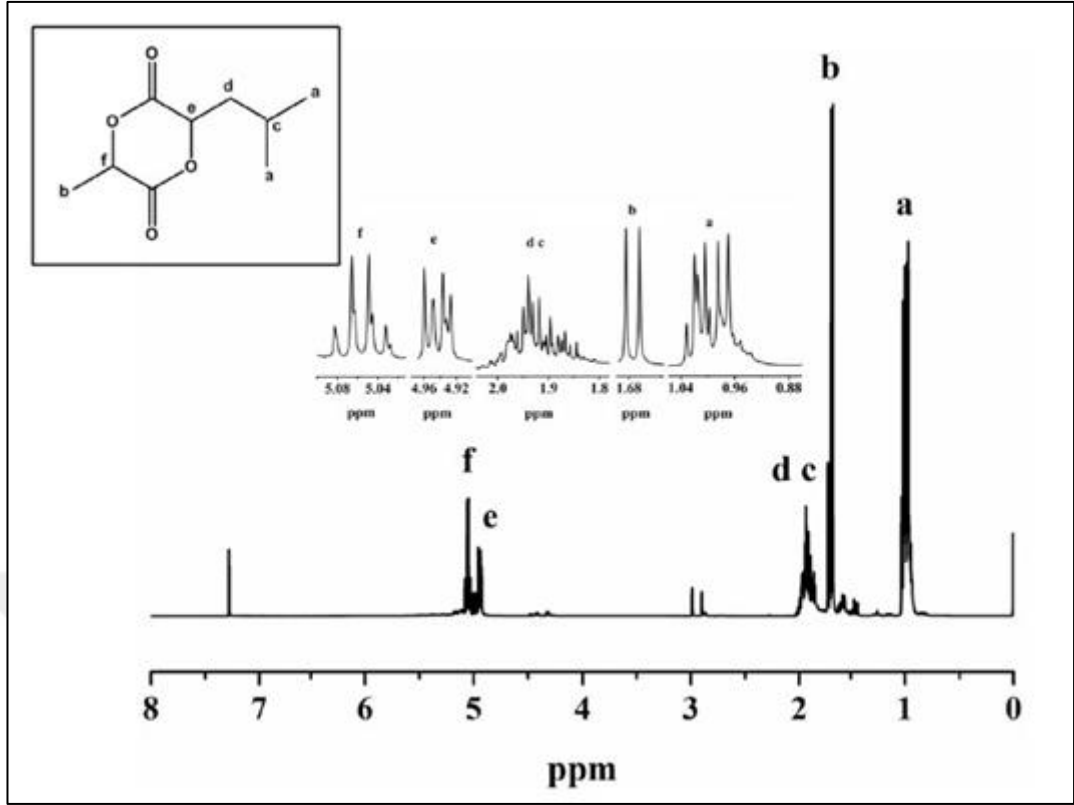
Çalışmanın ikinci aşamasında 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit başlangıç maddesi ile DMF ve NaHCO₃ varlığında halka kapatılarak bir asimetrik alkil substitüye glikolid olan izobütil metil glikolid monomeri (3) sentezlendi (Şekil 3.5) [70].

Sentezlenen 3 bileşiğinin karakterizasyonu spektroskopik ATR-FTIR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR teknikleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ve değerlendirmeleri aşağıda verilmektedir.



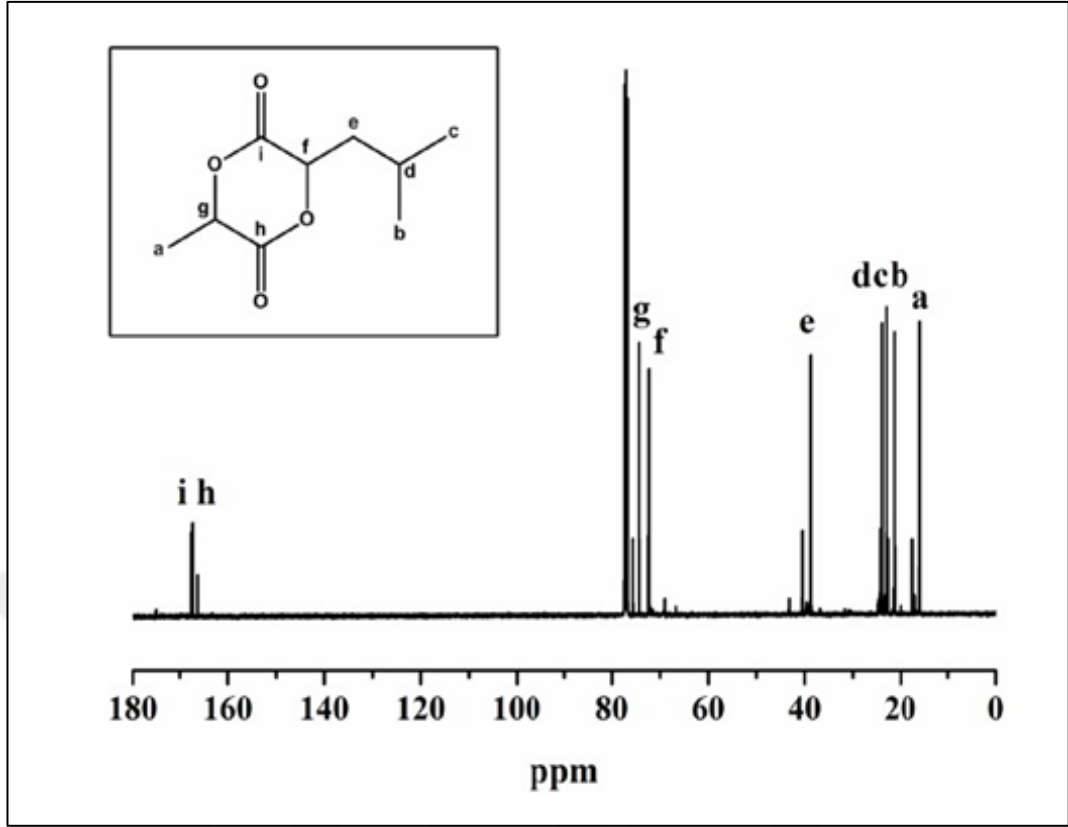
Şekil 3.9. İzobütil metil glikolid monomerinin ATR-FTIR spektrumu

3 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu (Şekil 3.9) incelendiğinde 1749 cm⁻¹'de gözlemlenen keskin pik ester grubundaki karbonil (C=O) gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 2961 cm⁻¹ ve 2880 cm⁻¹'de gözlemlenen pikler C-H gerilmelerine aittir. Ayrıca 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit (2) başlangıç maddesindeki karboksilik asit grubunun karbonil gerilmesi 1722 cm⁻¹'de görülmüştü. Fakat 3 bileşiğinin karbonil gerilmesi ise halkanın kapanması ile oluşan ester grubu sayesinde 1749 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu da reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.10. İzobütül metil glükolid monomerinin ¹H-NMR spektrumu

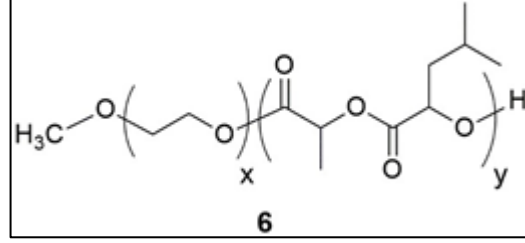
3 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (Şekil 3.10) teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlanmıştır. A ile gösterilmiş CH₃ protonlarına ait çoklu pik 0,88-1,06 ppm'de gelmiştir. B ile gösterilmiş CH₃ protonuna ait ikili bir pik 1,64-1,7 ppm'de gelmiştir. C ve D ile gösterilmiş CH ve CH₂ protonlarına ait üç protonluk çoklu bir pik 1,8-2,04 ppm'de gelmiştir. E ile gösterilmiş CH protonuna ait ikilinin ikilisi (doublet of doublet) bir pik 4,89-4,97 ppm'de gelmiştir. F ile gösterilmiş CH protonuna ait dörtlü bir pik 5,02-5,09 ppm'de gelmiştir. Ayrıca 2-((2-bromopropanoil) oksi)-4-metilpentanoik asit (2) başlangıç maddesindeki CH protonunununa ait 4,37-4,52 ppm arasında gelen pikin 5,02-5,09 ppm'de gelmesi halkanın kapanarak sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca piklerin altında kalan alanlarında proton sayıları ile orantılı olduğu görüldü.



Şekil 3.11. İzobütül metil glükolid monomerinin ¹³C-NMR spektrumu

3 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (Şekil 3.11) teorik hesaplamalar dikkate alınarak yorumlandı. A kodlu karbona ait pik 15,84 ve 17,37 ppm’de, b kodlu karbona ait pik 21,31 ve 21,51 ppm’de, c kodlu karbona ait pik 22,7 ve 23 ppm’de, d kodlu karbona ait pik 23,86 ve 24,22 ppm’de, e kodlu karbona ait pik 38,69 ve 40,45 ppm’de, f kodlu karbona ait pik 72,25 ve 72,37 ppm’de, g kodlu karbona ait pik 74,33 ve 75,61 ppm’de, h kodlu karbona ait pik 166,24 ppm’de ve i kodlu karbona ait pik 167,32 ve 167,51 ppm’de gelmiştir. Her bir karbon atomu için bulunan 2 farklı değer ile sentezlenen bileşiğin rasemik karışım halinde olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca 2-((2-bromopropanoil)oksi)-4-metilpentanoik asit (2) başlangıç maddesinde “39,48-39,53” ve “175,84-175,97-176,12” ppm’de gelen pikler 3 bileşiğinde sırasıyla “74,33-75,61” ve “167,32-167,51” ppm’e kaymıştır. Bu da halkanın kapandığını göstermektedir.

3.3. Yeni PIBMG-MePEG (6) Diblok Kopolimerlerinin Sentez ve Karakterizasyonları



Şekil 3.12. 6 bileşiği

PIBMG-MePEG diblok kopolimerinin sentezi Sn(Oct)₂ katalizörü varlığında, 120°C'de, argon gazı altında poli(etilen glikol) metil eter (MePEG) ile izobütil metil glikolid (IBMG) monomerinin reaksiyona girmesiyle halka açılması polimerleşmesi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12). Kopolimer sentezinde 2000 g/mol molekül ağırlığındaki MePEG homopolimeri kobaşlatıcı olarak kullanılmıştır. Çünkü sulu fazdaki geniş hidrodinamik çapından dolayı 10.000 molekül ağırlığının üzerindeki PEG'lerin insan böbreği membranından filtrasyonu uygun değildir [18].

Katalizör olarak kalay oktoat'ın tercih edilmesinin ise çeşitli sebepleri vardır. Bu katalizörün en önemli özelliği biyolojik olarak güvenli olması ve FDA onayına sahip olmasıdır [71]. Çünkü diğer ağır metal tuzları ile karşılaştırıldığında düşük toksisiteye ve tamamen polimerleşme dönüşümlerine sahiptir [72, 73, 74].

Hidrofobik amino asitlerden türetilen biyobozunur poli(esterler) α-hidroksi asitin doğrudan esterifikasyonu yoluyla kondenzasyonla veya halka açılma polimerizasyonu yoluyla sentezlenebilir. Halka açılma polimerizasyonu yönteminin avantajı polimerin zincir uzunluğunun kontrol edilebilmesini sağlaması ve düşük heterojenlik indeksleri yaratmasıdır [75]. Bu nedenle blok kopolimerler sentezlenirken halka açılması polimerizasyonu yöntemi tercih edilmiştir.

Isıya duyarlı jelleşen kopolimer sistemlerinde hidrofilik ve hidrofobik kısımların uzunluğu faz geçiş davranışını güçlüce etkilemektedir. Hidrofobik poliester parçaları çok fazla uzun olduğunda kopolimer sulu çözeltide çözünmez. Hidrofilik PEG blokları çok fazla uzun olduğunda ise sol-jel geçiş sıcaklığı (T_{gel}) artar ve vücut sıcaklığından daha yüksek olur ya da sol-jel geçişi görünmez. Bu nedenle blok kopolimerin

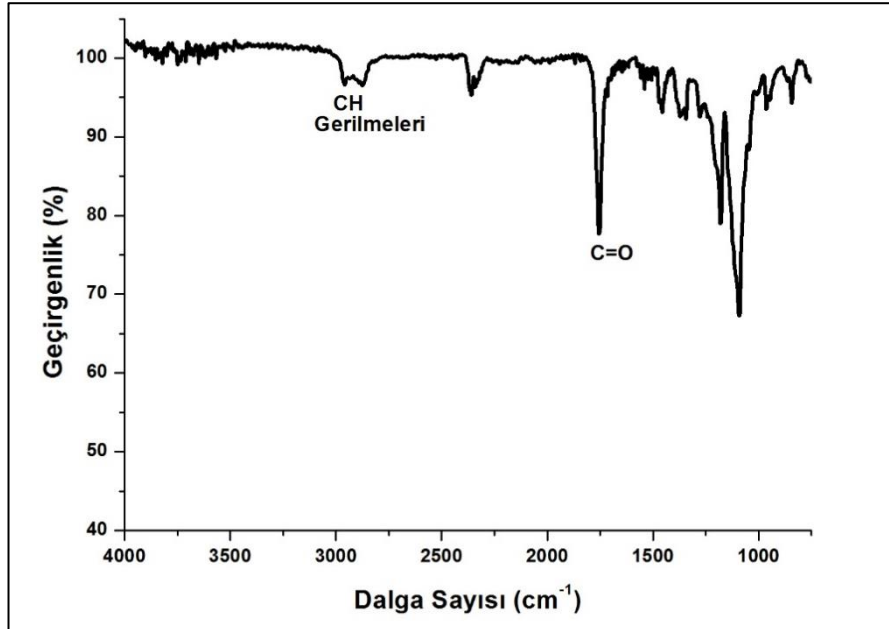
hidrofobik-hidrofilik dengesi sıcaklığa duyarlı faz geçiş davranışı için çok önemlidir [76]. Sentezlenen blok kopolimerlerde bu husus dikkate alınarak hidrofilik MePEG bloklarının kütleleri sabit tutulup, hidrofobik IBMG parçaları farklı kütlelerde kullanıldı. Ayrıca ^1H NMR spektrumundaki izobütil metil glikolidin CH protonlarının alanlarından ve MePEG'in CH_2 protonlarının alanlarından yararlanılarak sentezlenen diblok kopolimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları da hesaplandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. PIBMG-MePEG diblok kopolimerlerinin molekül ağırlıkları

No	Mw ^a (g/mol)	Mn ^a (g/mol)	Mn ^b (g/mol)	Mw/Mn ^a	% Dönüşüm ^a	PIBMG'in TB'si ^b	IBMG/Sn(Oct) ₂	IBMG/MePEG
4	4550	3900	3380	1,16	97,1	7	20	8,3
5	6830	5240	4870	1,30	97,1	15	40	16,7
6	9000	6690	6490	1,34	97,4	24	60	25,0
7	10860	7590	7830	1,43	97,5	31	80	33,3
8	18290	12120	13990	1,51	97,5	65	160	66,7

TB: Tekrarlayan birim sayısı; a: GPC ile bulundu; b: ^1H NMR ile hesaplandı.

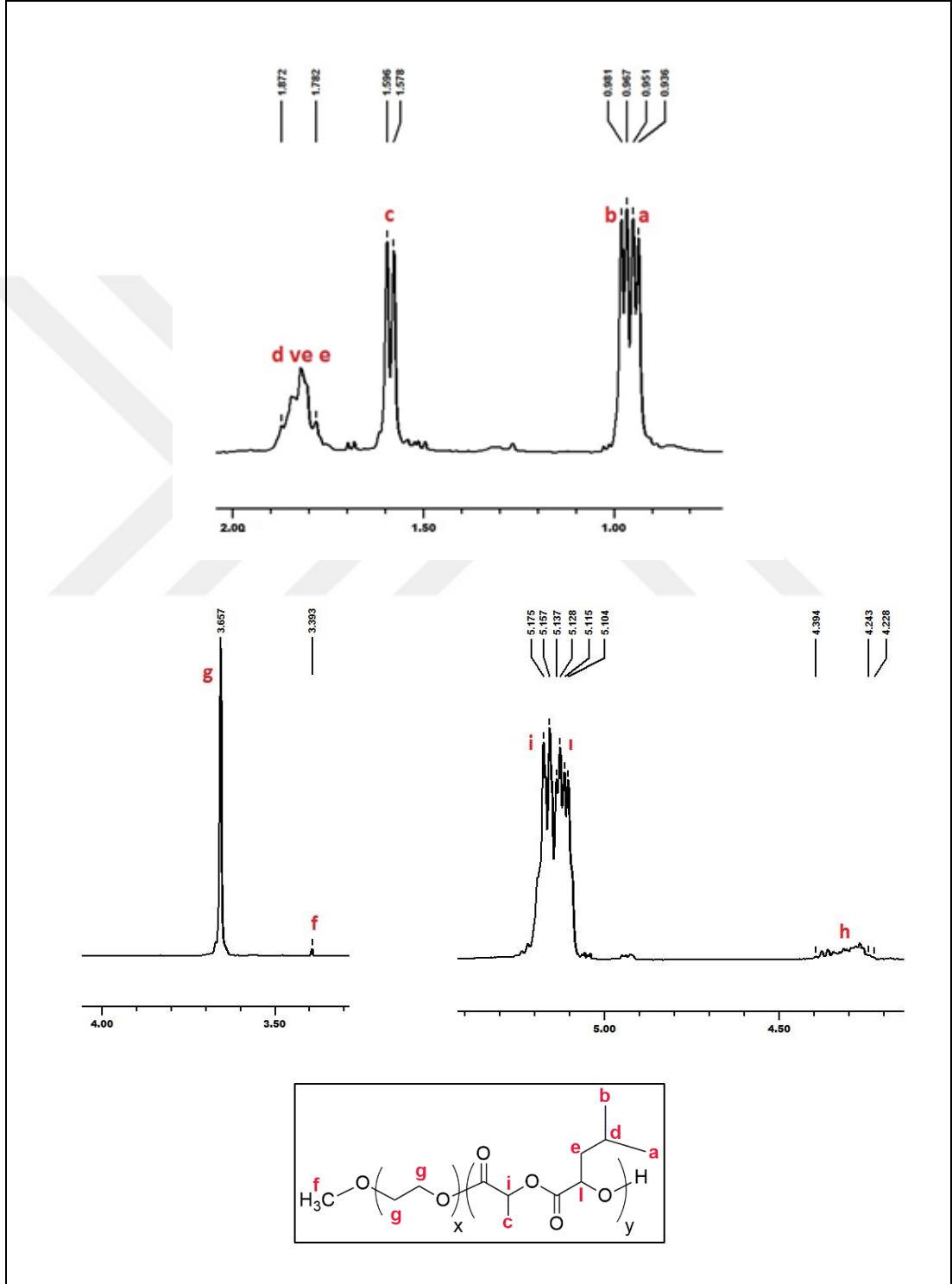
6 bileşiğinin karakterizasyonu spektroskopik (ATR-FTIR, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR) ve kromatografik (GPC) teknikler kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ve değerlendirmeleri aşağıda verilmektedir.



Şekil 3.13. 6 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu

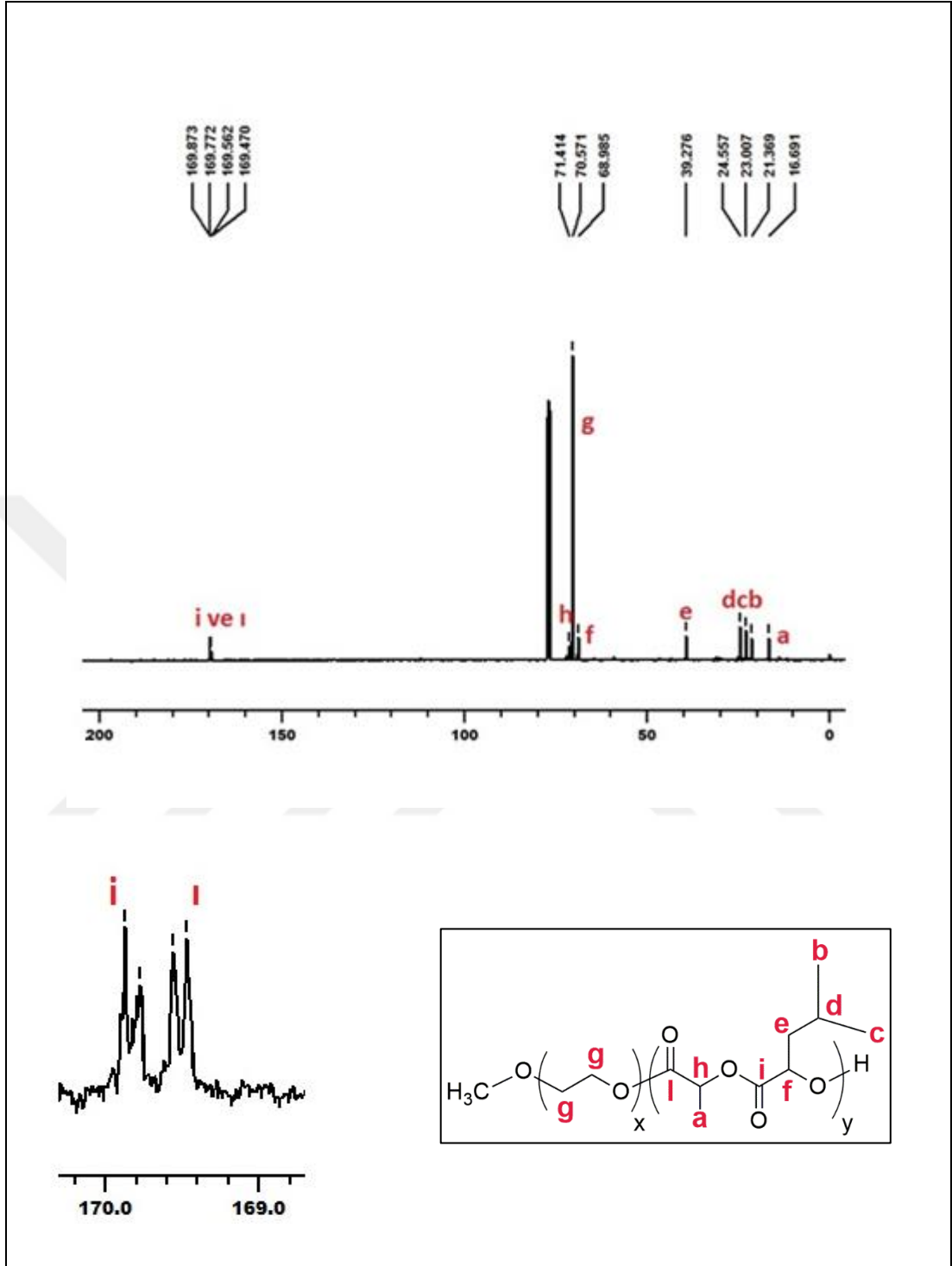
6 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu (Şekil 3.13) incelendiğinde 1755 cm^{-1} 'de gözlemlenen keskin pik ester grubunun karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesinden

kaynaklanmaktadır. 2958 cm^{-1} ve 2821 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler C-H gerilmelerine aittir. Ayrıca IBMG monomerinin karbonil gerilmesi 1749 cm^{-1} 'de görülmüştü. Halka açılması ile oluşan kopolimerin karbonil gerilmesi ise beklenildiği gibi 1755 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu da halka açılması ile kopolimerin oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 3.14. 6 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6 bileşiminin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.14) yorumlandığında 0,93-0,95 ppm'de a kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 0,96-0,98 ppm'de b kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 1,57-1,59 ppm'de c kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 1,78-1,87 ppm'de d ve e kodlu CH ve CH_2 protonlarına ait çoklu bir pik, 3,39 ppm'de f kodlu MePEG'in sonundaki metoksi(OCH_3) protonuna ait tekli bir pik, 3,65 ppm'de g kodlu CH_2 protonlarına ait tekli bir pik, 5,10-5,13 ppm'de ı kodlu CH protonuna ait bozulmuş ikilinin ikilisi (distorted doublet of doublet) bir pik ve 5,15-5,17 ppm'de i kodlu CH protonuna ait bozulmuş dörtlü (distorted quarted) bir pik görülmektedir. Ayrıca 4,2-4,4 ppm arasında görülen h kodlu çoklu pik ise MePEG bloğunun α metilen birimlerinin PIBMG'e bağlanmasını ve PIBMG uç birimlerinin CH protonlarını temsil etmektedir. Bununla birlikte IBMG monomerinde sırasıyla 4,89-4,97 ve 5,02-5,09 ppm'de gelen CH protonlarına ait piklerin 6 bileşiminde halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak 5,10-5,13 ve 5,15-5,17 ppm'de gelmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Piklerin integrasyonları alınarak hesaplanan alanların da 6 bileşiminin proton sayıları ile doğru orantılı olduğu görülmüştür.



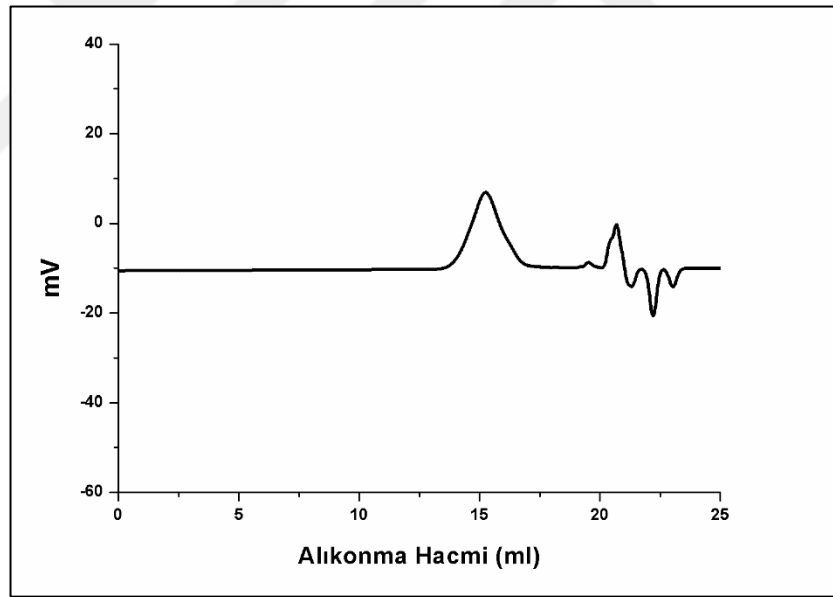
Şekil 3.15. 6 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

6 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (Şekil 3.15) incelendiğinde 16,69 ppm'de a kodlu karbona ait pik, 21,36 ppm'de b kodlu karbona ait pik, 23,00 ppm'de c kodlu karbona ait pik, 24,55 ppm'de d kodlu karbona ait pik, 39,27 ppm'de e kodlu karbona ait pik, 68,98 ppm'de f kodlu karbona ait pik, 70,57 ppm'de g kodlu karbona ait pik, 71,41 ppm'de h kodlu karbona ait bir pik, 169,47 ve 169,56 ppm'de l kodlu karbona ait pikler

ve 169,77 ve 169,87 ppm'de i kodlu karbona ait pikler görülmektedir. Bununla birlikte IBMG monomerinde CH karbonlarına ait 72,25-72,37 ve 74,33-75,61 ppm'de gelen pikler halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak sırasıyla 68,98 ve 71,41 ppm'de gelmiştir. Yine IBMG monomerinde 166,24 ile 167,32-167,51 ppm'de gelen karbonil karbonlarına ait pikler halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak 169,47-169,56 ile 169,77-169,87 ppm'de gelmiştir. Bu da reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

4 ve 5 diblok kopolimerlerinin ATR-FTIR spektrumları Ek-A, 4, 5, 7, 8 diblok kopolimerlerinin NMR spektrumları Ek-B kısmında verildi.

Polimer dönüşümleri ile ilgili destekleyici bilgiler GPC analizlerinden elde edildi (Şekil 3.16, Tablo 3.2). 3 saatlik kısa bir sentez süresi ile yüksek dönüşüme sahip diblok kopolimerler elde edildi.



Şekil 3.16. 6 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo 3.2. 6 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)	mmol	M _n (g/mol)
1	15,25	97,4	3	6690
2	19,5	2,6		90

PIBMG-MePEG diblok 6 kopolimerinin GPC kromatogramında görülen alıkonma hacmi 15,25 ml olan birinci pik molekül ağırlığı 6690 g/mol olarak gelen %97,4

dönüşüme sahip diblok kopolimeri göstermektedir. Alıkonma hacmi 19,5 ml olan ikinci pik molekül ağırlığı 90 g/mol gelen monomeri ve alıkonma hacmi 20 ml'den sonra gelen pikler ise hareketli faz olan tetrahidrofurana aittir (Tablo 3.2).

4, 5, 7 ve 8 diblok kopolimerlerinin GPC kromatogramları Ek-C kısmında verildi.

3.4. Yeni PIBMG-PEG-PIBMG (11) Triblok Kopolimerlerinin Sentez ve Karakterizasyonları



Şekil 3.17. 11 bileşiği

PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimerinin sentezi $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ katalizörü varlığında, 120°C 'de, argon gazı altında poli(etilen glikol) (PEG) ile izobütil metil glikolid (IBMG) monomerinin reaksiyona girmesiyle halka açılması polimerleşmesi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.17). Kopolimer sentezinde 2000 g/mol molekül ağırlığındaki PEG homopolimeri kobaşlatıcı olarak kullanılmıştır.

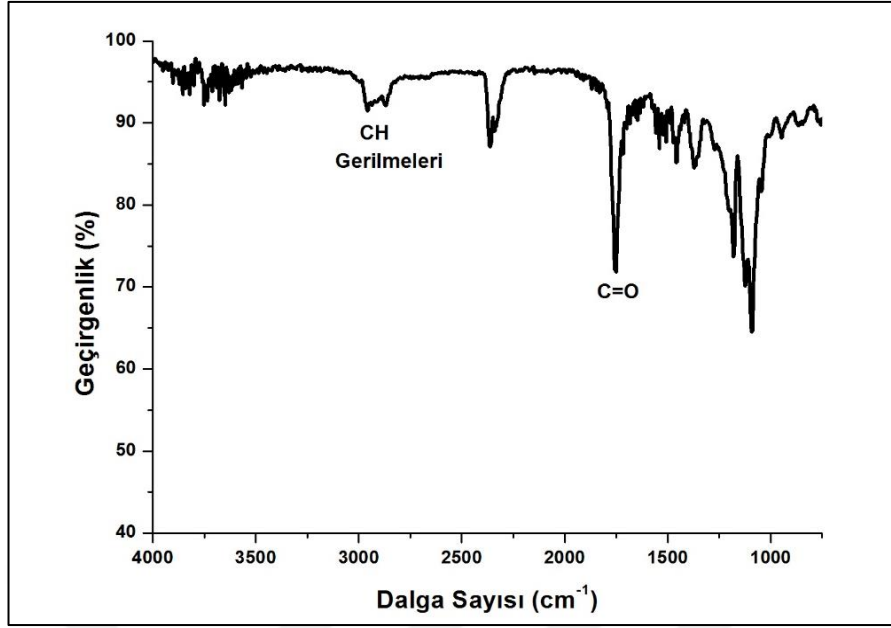
Triblok kopolimerleri sentezlerken hidrofilik PEG bloklarının kütleleri sabit tutulup, hidrofobik IBMG parçaları farklı kütlelerde kullanıldı. Ayrıca diblok kopolimerlerde olduğu gibi ^1H NMR spektrumundan ve GPC analizlerinden yararlanılarak kopolimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları hesaplandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimerlerinin molekül ağırlıkları

No	Mw ^a (g/mol)	Mn ^a (g/mol)	Mn ^b (g/mol)	Mw/Mn ^a	% Dönüşüm	PIBMG'in TB'si ^b	IBMG/Sn(Oct) ₂	IBMG/PEG
9	4970	4660	3330	1,06	95,0	7	20	8,3
10	6560	5280	4780	1,24	97,1	15	40	16,7
11	8520	6860	6360	1,24	97,4	24	60	25,0
12	9720	7680	7860	1,27	97,4	32	80	33,3

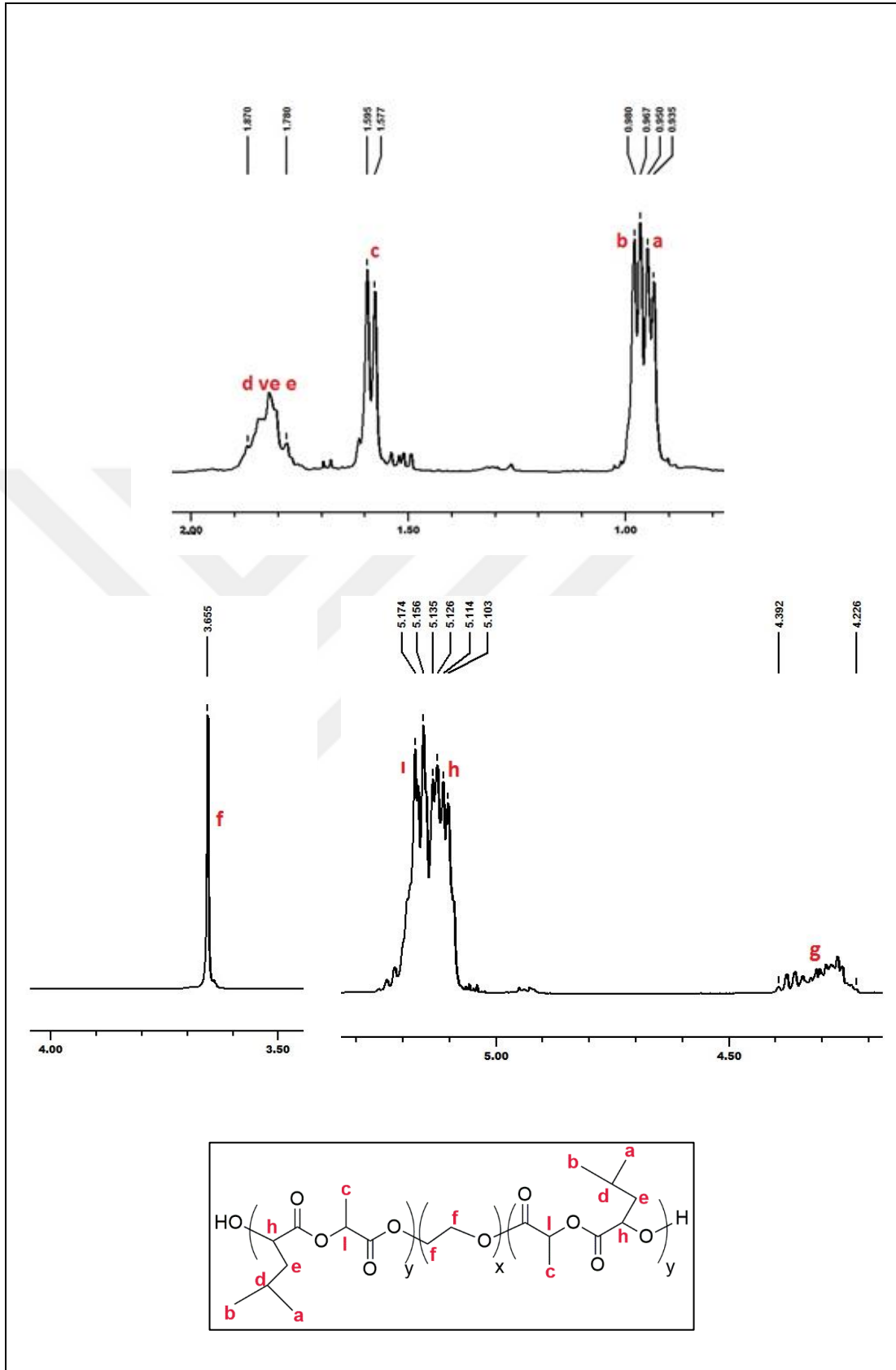
TB: Tekrarlayan birim sayısı; a: GPC ile bulundu; b: ^1H NMR ile hesaplandı.

11 bileşiğinin karakterizasyonu spektroskopik (ATR-FTIR, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR) ve kromatografik (GPC) teknikleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ve değerlendirmeleri aşağıda verilmektedir.



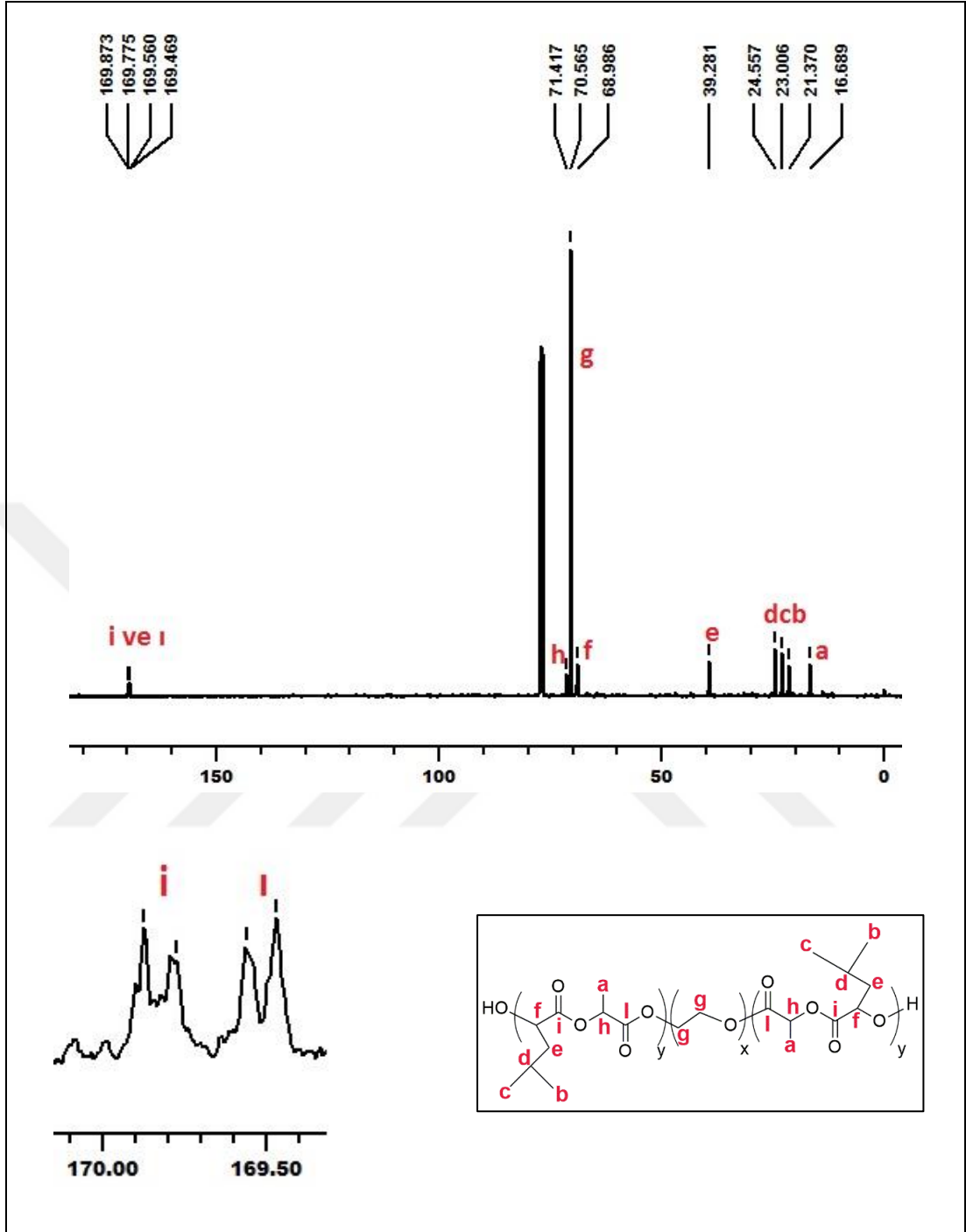
Şekil 3.18. 11 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu

11 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu (Şekil 3.18) incelendiğinde 1752 cm^{-1} 'de gözlemlenen keskin pik ester grubuna ait karbonil (C=O) gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 2958 cm^{-1} ve 2821 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler C-H gerilmelerine aittir. Ayrıca IBMG monomerinin karbonil gerilmesi 1749 cm^{-1} 'de görülmüştü. Halka açılması ile oluşan kopolimerin karbonil gerilmesi ise beklenildiği gibi 1752 cm^{-1} 'e kaymıştır.



Şekil 3.19. 11 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

11 bileşiminin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.19) yorumlandığında 0,93-0,95 ppm'de a kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 0,96-0,98 ppm'de b kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 1,57-1,59 ppm'de c kodlu CH_3 protonuna ait ikili bir pik, 1,78-1,87 ppm'de d ve e kodlu CH ve CH_2 protonlarına ait çoklu bir pik, 3,65 ppm'de f kodlu CH_2 protonlarına ait tekli bir pik, 5,10-5,13 ppm'de h kodlu CH protonuna ait bozulmuş ikilinin ikilisi (distorted doublet of doublet) bir pik ve 5,15-5,17 ppm'de ı kodlu CH protonuna ait bozulmuş dörtlü (distorted quarted) bir pik görülmektedir. Ayrıca 4,2-4,4 ppm arasında görülen g kodlu çoklu pik ise PEG bloğunun α metilen birimlerinin PIBMG'e bağlanmasını ve PIBMG uç birimlerinin CH protonlarını temsil etmektedir. Bununla birlikte IBMG monomerinde sırasıyla 4,89-4,97 ve 5,02-5,09 ppm'de gelen CH protonlarına ait piklerin 11 bileşiminde halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak 5,10-5,13 ve 5,15-5,17 ppm'de gelmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Piklerin integrasyonları alınarak hesaplanan alanların da 11 bileşiminin proton sayıları ile doğru orantılı olduğu görülmüştür.



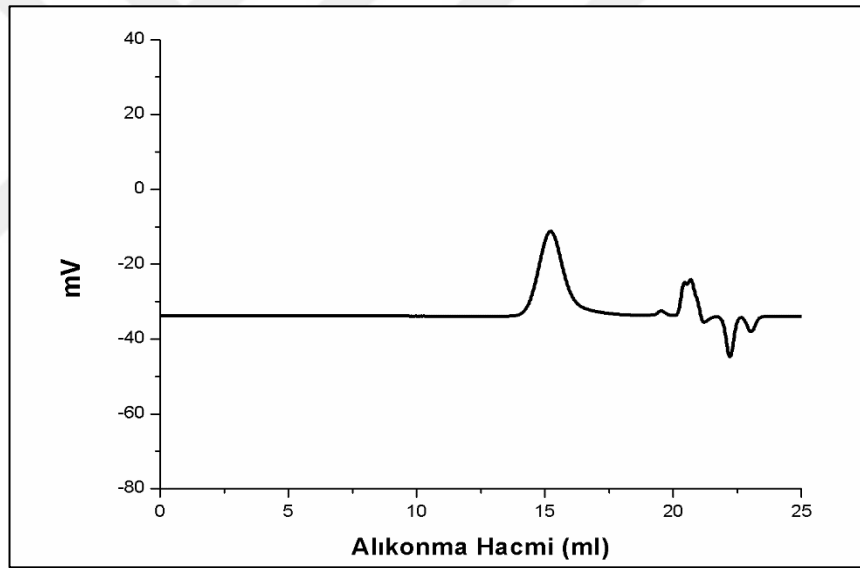
Şekil 3.20. 11 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

11 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (Şekil 3.20) incelendiğinde 16,69 ppm'de a kodlu karbona ait pik, 21,37 ppm'de b kodlu karbona ait pik, 23,00 ppm'de c kodlu karbona ait pik, 24,55 ppm'de d kodlu karbona ait pik, 39,28 ppm'de e kodlu karbona ait pik, 68,98 ppm'de f kodlu karbona ait pik, 70,56 ppm'de g kodlu karbona ait pik, 71,41 ppm'de h kodlu karbona ait bir pik, 169,47 ve 169,56 ppm'de ı kodlu karbona ait pikler ve 169,77 ve 169,87 ppm'de i kodlu karbona ait pikler görülmektedir. Bununla birlikte

IBMG monomerinde CH karbonlarına ait 72,25-72,37 ve 74,33-75,61 ppm'de gelen pikler halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak sırasıyla 68,98 ve 71,41 ppm'de gelmiştir. Yine IBMG monomerinde 166,24 ile 167,32-167,51 ppm'de gelen karbonil karbonlarına ait pikler halkanın açılması ile birlikte kimyasal kaymaya uğrayarak 169,47-169,56 ile 169,77-169,87 ppm'de gelmiştir. Bu da reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

9, 10, 12 diblok kopolimerlerinin ATR-FTIR spektrumları Ek-A, NMR spektrumları Ek-B kısmında verildi.

Polimer dönüşümleri ile ilgili destekleyici bilgiler GPC analizlerinden elde edildi (Şekil 3.21, Tablo 3.4). 3 saatlik kısa bir sentez süresi ile yüksek dönüşüme sahip triblok kopolimerler elde edildi.



Şekil 3.21. 11 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo 3.4. 11 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)	mmol	M _n (g/mol)
1	15,18	97,4	3	6860
2	19,5	2,6		90

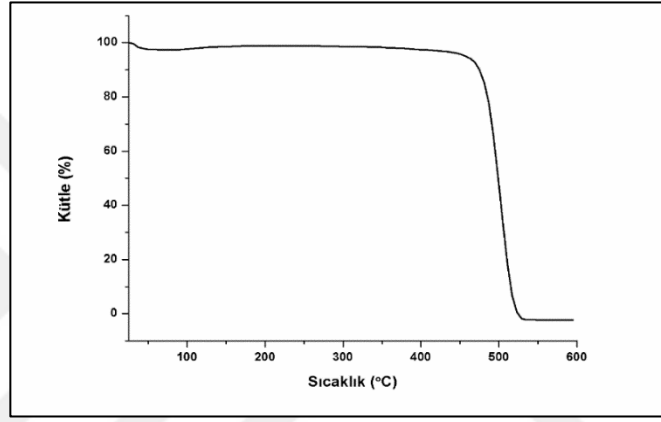
PIBMG-PEG-PIBMG triblok 11 kopolimerinin GPC kromatogramında görülen alıkonma hacmi 15,18 ml olan birinci pik molekül ağırlığı 6860 g/mol olarak gelen %97,4 dönüşüme sahip triblok kopolimeri göstermektedir. Alıkonma hacmi 19,5 ml

olan ikinci pik molekül ağırlığı 90 g/mol gelen monomeri ve alıkonma hacmi 20 ml'den sonra gelen pikler ise hareketli faz olan tetrahidrofurana aittir (Tablo 3.4).

9, 10, 12 triblok kopolimerlerinin GPC kromatogramları Ek-C kısmında verildi.

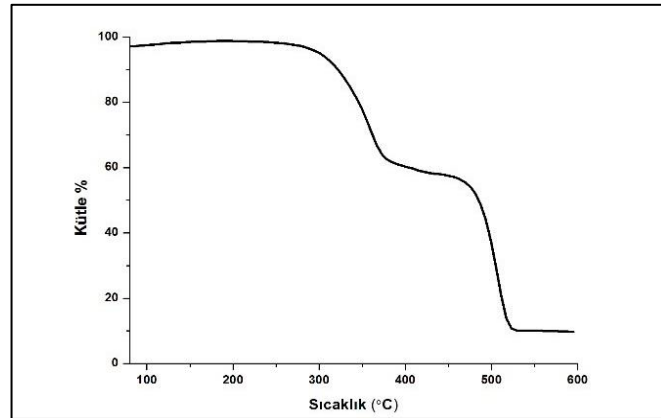
3.5. Kopolimerlerin Termal Karakterizasyonu

TGA analizi ile diblok 4 ve diblok 6 kopolimerlerinin dekompozisyon özelliği incelendi. Sonuçlar MePEG homopolimerinin termal kararlılığı ile karşılaştırılarak yorumlandı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi aşağıda verilmektedir.



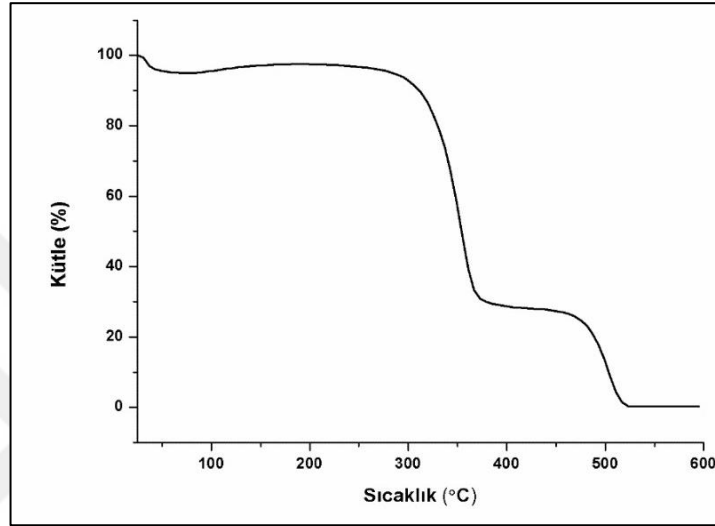
Şekil 3.22. MePEG-2000 homopolimerinin TGA eğrisi

MePEG-2000 homopolimerinin TGA eğrisinde (Şekil 3.22) tek bir kütle kaybı görüldü. Homopolimerinin termal bozunması 482,8°C'de başladı (onset) ve 517,4°C'de tamamlandı (endset). Ayrıca birinci türevinde büküm noktası (inflection point) 501,0°C olarak bulundu.



Şekil 3.23. PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimerinin TGA eğrisi

PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimerinin TGA eğrisinde (Şekil 3.23) iki farklı kütle kaybı gözlemlendi. İlk %36'lık kütle kaybının büküm noktası 349,6°C olarak bulunan PIBMG'in bozunmasından kaynaklandığı düşünüldü. İkinci %54,5'lik kütle kaybının ise büküm noktası 501,4°C (saf MePEG 501,0°C) olarak bulunan MePEG'in bozunmasından kaynaklandığı düşünüldü. 600°C ısıtmadan sonra ise diblok kopolimerin %9,49'unun bozunmadan kaldığı gözlemlendi.

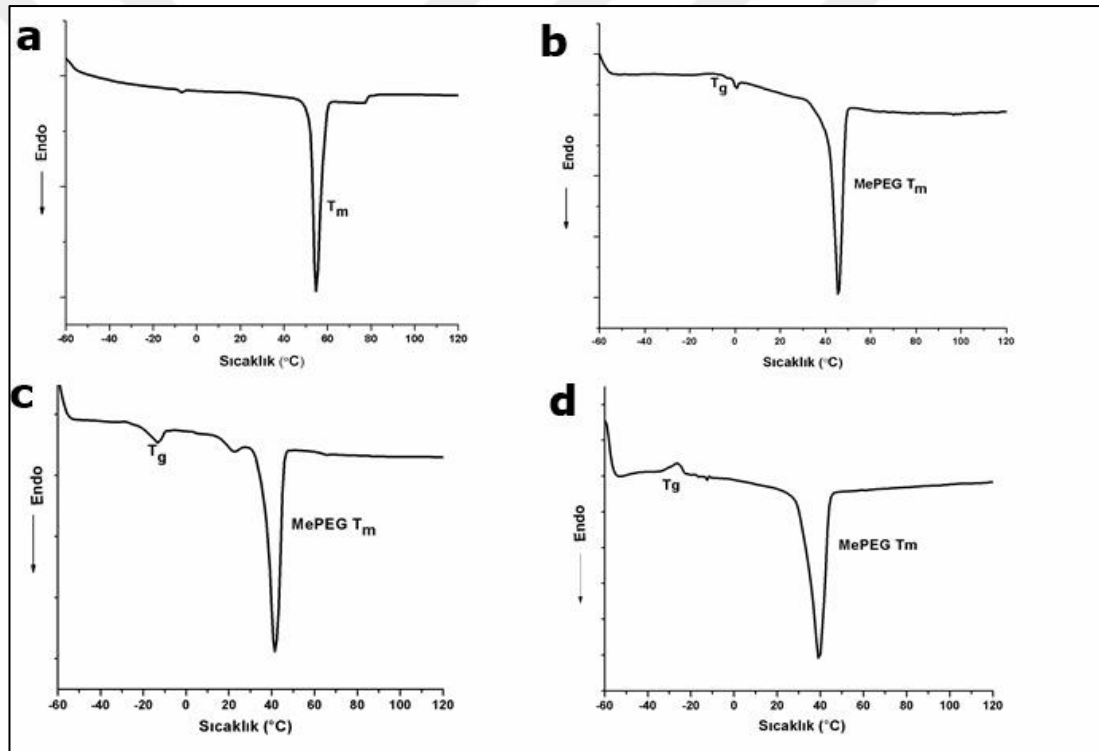


Şekil 3.24. PIBMG-MePEG diblok 6 kopolimerinin TGA eğrisi

PIBMG-MePEG diblok 6 kopolimerinin TGA eğrisinde (Şekil 3.24) iki farklı kütle kaybı gözlemlendi. Kopolimerdeki PIBMG'in termal bozunması 327,9°C'de başladı (onset) ve 365,5°C'de tamamlandı (endset). Kopolimerdeki MePEG'in termal bozunması ise 483,3°C'de başladı (onset) ve 515,5°C'de tamamlandı (endset). Kopolimer eğrisinin birinci türevi alındığında PIBMG'in büküm noktası 346,3°C, MePEG'in büküm noktası ise 500,6°C (saf MePEG 501,0°C) olarak bulundu. Bu nedenle kopolimerdeki ilk %65'lik kütle kaybının PIBMG'in bozunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İkinci %34,86'lık kütle kaybının ise MePEG'in bozunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 600°C ısıtmadan sonra ise triblok kopolimerin %0,14'ünün bozunmadan kaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak kopolimerdeki PIBMG birimlerinin blok uzunluklarının artışı ile PIBMG'in % bozunma oranının arttığı görüldü.

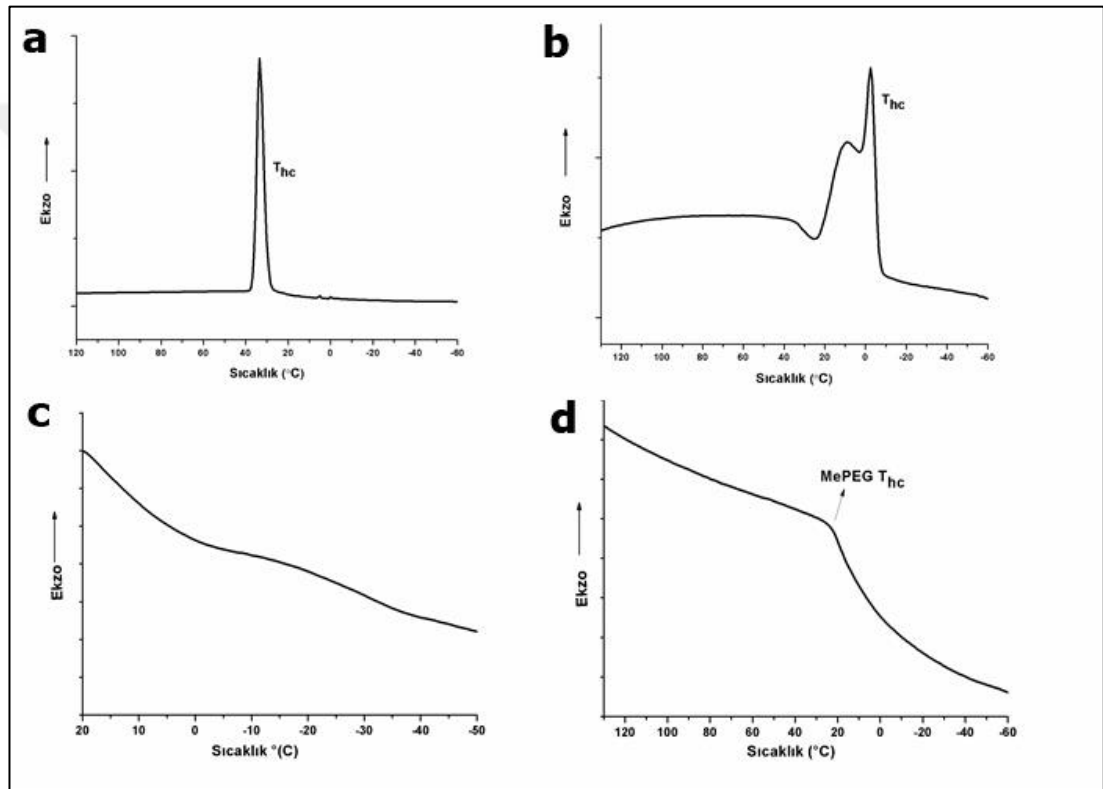
PIBMG-MePEG diblok ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimerlerinin termal karakteristik özellikleri DSC analizi ile incelendi. Sonuçlar MePEG-2000 ve PEG-2000 homopolimerlerinin DSC analizleri ile karşılaştırılarak yorumlandı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi aşağıda verilmektedir. Öncelikle saf MePEG-2000 homopolimeri ve diblok kopolimerlerin 1. ısıtma (first run) (-60 ile 140°C arası) termogramları (Şekil 3.25) verilerek sonuçlar yorumlandı. Ardından soğutma (140°C'den -60°C'ye) termogramları (Şekil 3.26) ve 2. ısıtma (second run) (-60 ile 140°C arası) termogramları (Şekil 3.27) verilerek sonuçlar yorumlandı. Saf PEG-2000 homopolimeri ve triblok kopolimerlerin sonuçları da benzer şekilde yorumlandı (Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30).



Şekil 3.25. a. MePEG-2000 homopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı

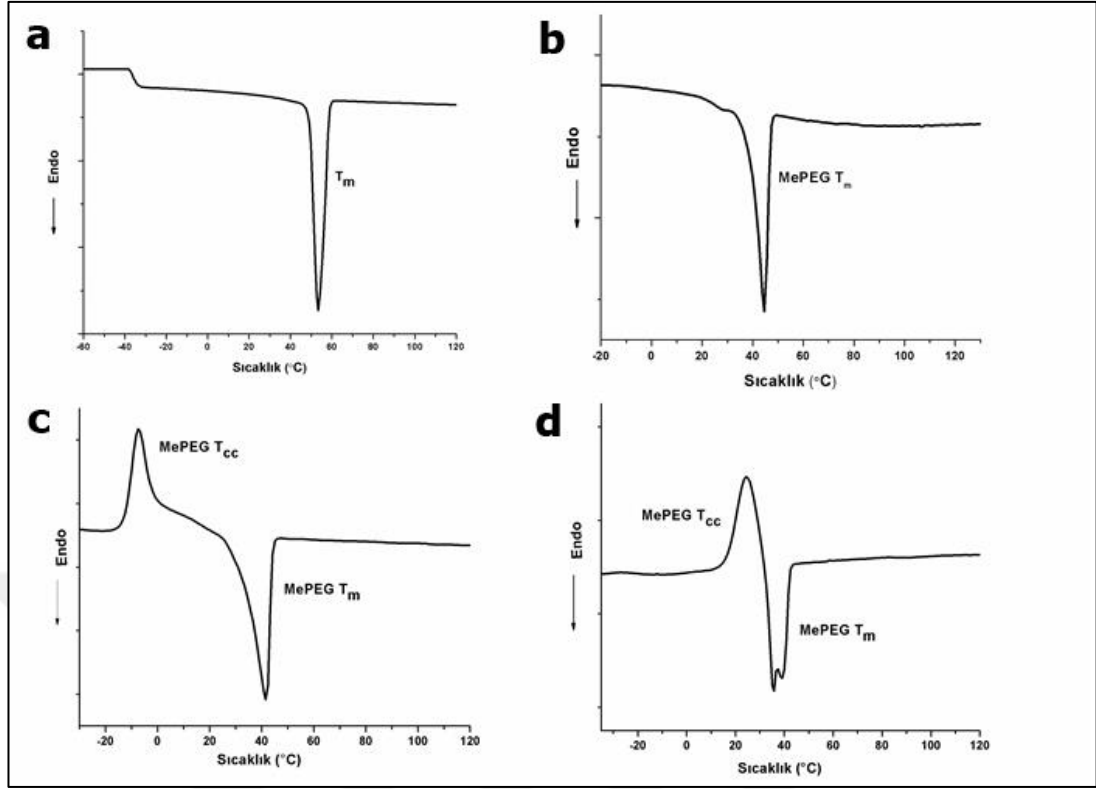
Şekil 3.25 a'da verilen saf MePEG-2000'in 1. ısıtma termogramı incelendiğinde; erime piki (T_m değeri) 55°C'de görülmektedir. Şekil 3.25 b'de verilen PIBMG-MePEG 4 kopolimerinde ise MePEG'in T_m değeri 46°C'ye düşmüştür. Bu durum MePEG bloğuna bağlanan IBMG bloklarının varlığı ile ilgilidir. Yine aynı şekilde Şekil 3.25 c'de verilen PIBMG-MePEG 5 kopolimerinde ve Şekil 3.25 d'de verilen

PIBMG-MePEG 6 kopolimerinde ise MePEG'in T_m değeri sırasıyla 41°C 'ye ve 39°C 'ye düşmüştür. Erime sıcaklıklarındaki bu düşüş kopolimer içerisindeki PIBMG'in blok uzunluğunun artışı ile orantılıdır. Bu da çeşitli molekül ağırlıklarındaki blok kopolimerlerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca PIBMG-MePEG 4 kopolimerinin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) $-1,9^\circ\text{C}$ iken kopolimerdeki PIBMG blok uzunluğunun artışına bağlı olarak PIBMG-MePEG 5 kopolimerinde ve PIBMG-MePEG 6 kopolimerinde sırasıyla $-19,6^\circ\text{C}$ ve $-25,1^\circ\text{C}$ olarak bulunmuştur.



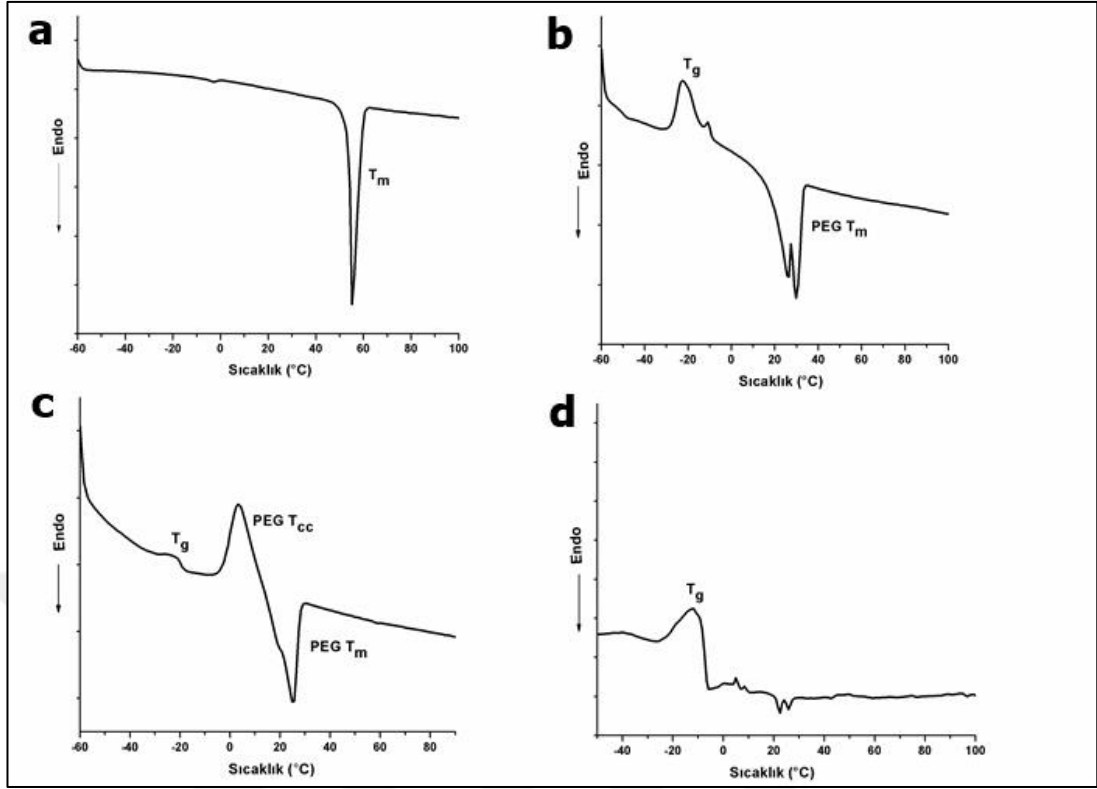
Şekil 3.26. a. MePEG-2000 homopolimeri DSC soğutma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC soğutma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC soğutma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC soğutma termogramı

Şekil 3.26 a'da verilen saf MePEG-2000'in soğutma termogramı incelendiğinde sıcak kristalizasyon pikinin (T_{hc}) 33°C 'de geldiği görülmektedir. Şekil 3.26 b'de verilen PIBMG-MePEG 4 kopolimerinde ise bu pik $-2,57^\circ\text{C}$ 'ye kaymıştır. Şekil 3.26 c ve Şekil 3.26 d'de ise blok kopolimerin molekül ağırlığının artışına bağlı olarak MePEG'in kristalizasyon piki yayvanlaştığı için net olarak görülememektedir.



Şekil 3.27. a. MePEG-2000 homopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, b. PIBMG-MePEG 4 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, c. PIBMG-MePEG 5 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, d. PIBMG-MePEG 6 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı

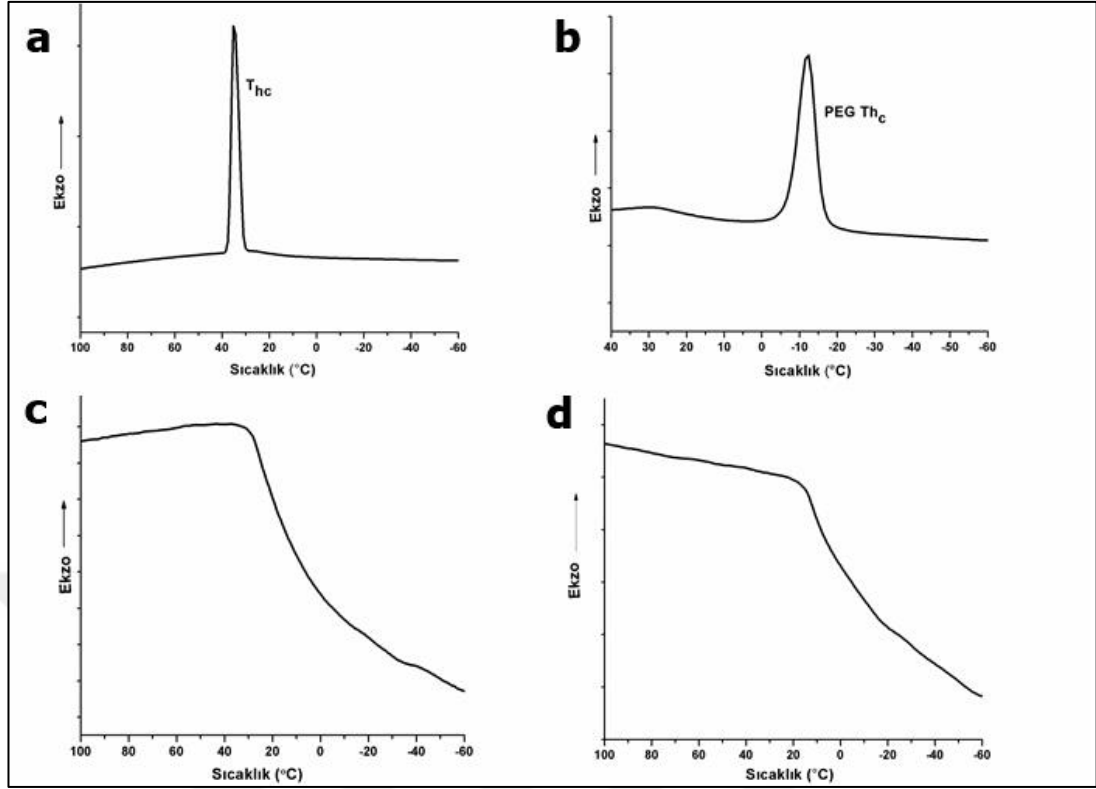
Şekil 3.27 a’da verilen saf MePEG-2000’in 2.ısıtma termogramı incelendiğinde; erime piki (T_m değeri) 53°C ’de görülmektedir. Şekil 3.27 b’de verilen PIBMG-MePEG 4 kopolimerinde ise MePEG’in T_m değeri 45°C ’ye düşmüştür. Bu durum MePEG bloğuna bağlanan IBMG bloklarının varlığı ile ilgilidir. Yine aynı şekilde Şekil 3.27 c’de verilen PIBMG-MePEG 5 kopolimerinde ve Şekil 3.27 d’de verilen PIBMG-MePEG 6 kopolimerinde ise MePEG’in T_m değeri sırasıyla 42°C ’ye ve 35°C ’ye düşmüştür. Erime sıcaklıklarındaki bu düşüş kopolimer içerisindeki PIBMG’in blok uzunluğunun artışı ile orantılıdır. Bu da çeşitli molekül ağırlıklarındaki blok kopolimerlerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca Şekil 3.27 c’de ve Şekil 3.27 d’de MePEG’in soğuk kristalizasyon piki (T_{cc}) de görülmektedir. Bu piklerin alanı erime piklerinin alanı ile orantılıdır. Bu da blok kopolimerler sentezlenirken MePEG’in kristallendiğini ve daha sonra bu kristallerin eridiğini göstermektedir.



Şekil 3.28. a. PEG-2000 homopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC 1. ısıtma termogramı

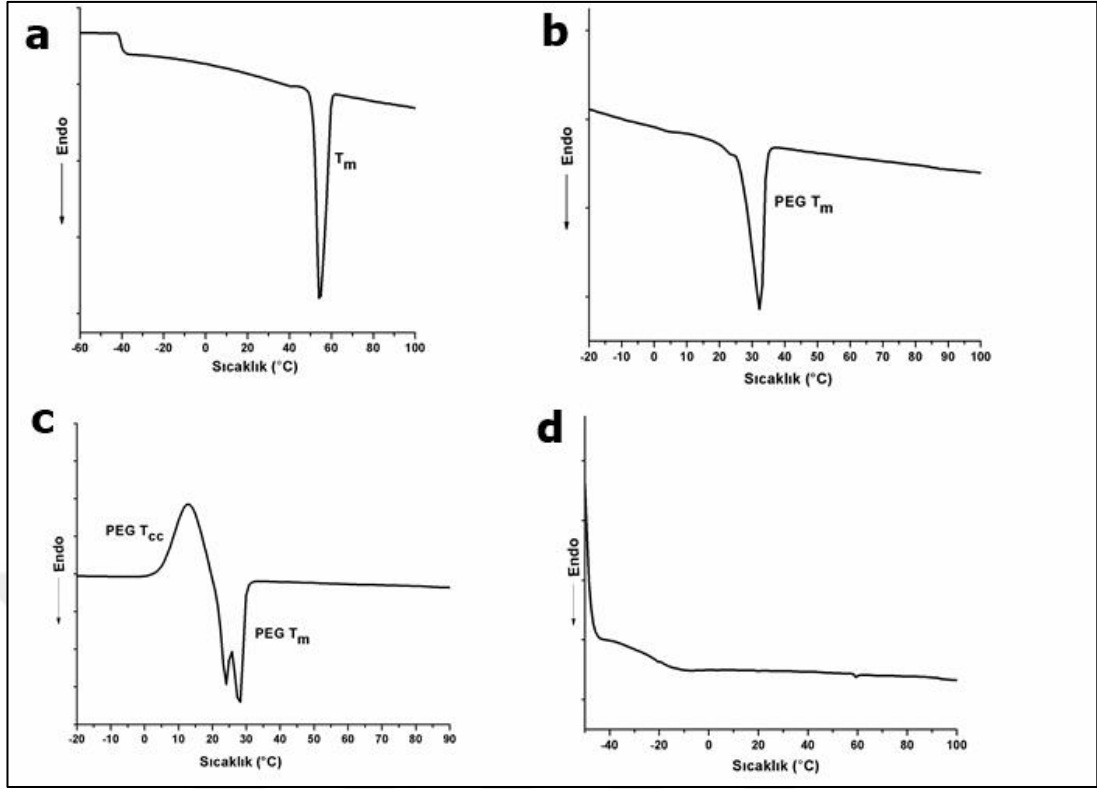
Şekil 3.28 a'da verilen saf PEG-2000'in 1. ısıtma termogramı incelendiğinde; erime piki (T_m değeri) 55°C 'de görülmektedir. Şekil 3.28 b'de verilen PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerinde ise PEG'in T_m değeri 30°C 'ye düşmüştür. Bu durum PEG bloğuna bağlanan IBMG bloklarının varlığı ile ilgilidir. Yine aynı şekilde Şekil 3.28 c'de verilen PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimerinde ise PIBMG'in blok uzunluğunun artmasına bağlı olarak PEG'in T_m değeri 25°C 'ye düşmüştür. Ayrıca Şekil 3.28 c'de PEG'in soğuk kristalizasyon piki (T_{cc}) de görülmektedir. Bu pikin alanı erime pikinin alanı ile orantılıdır. Bu da blok kopolimerler sentezlenirken PEG'in kristallendiğini ve daha sonra bu kristallerin eridiğini göstermektedir. Şekil 3.28 d'de ise blok kopolimerin molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak PEG'in kristalizasyon ve erime piki yayvanlaştığı için net olarak görülememektedir.

Ayrıca PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerinin camı geçiş sıcaklığı (T_g) $-22,5^\circ\text{C}$ olarak bulunurken PIBMG-PEG-PIBMG 10 ve PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimerleri için sırasıyla $-21,6^\circ\text{C}$ ve $-12,2^\circ\text{C}$ olarak bulundu.



Şekil 3.29. a. PEG-2000 homopolimeri DSC soğutma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC soğutma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC soğutma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC soğutma termogramı

Şekil 3.29 a’da verilen saf PEG-2000’in soğutma termogramı incelendiğinde sıcak kristalizasyon pikinin (T_{hc}) 35 °C’de geldiği görülmektedir. Şekil 3.29 b’de verilen PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerinde ise bu pik -12,0°C’ye kaymıştır. Şekil 3.29 c ve Şekil 3.29 d’de ise blok kopolimerin molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak PEG’in kristalizasyon piki yayvanlaştığı için net olarak görülememektedir.



Şekil 3.30. a. PEG-2000 homopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, b. PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, c. PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı, d. PIBMG-PEG-PIBMG 11 kopolimeri DSC 2. ısıtma termogramı

Şekil 3.30 a'da verilen saf PEG-2000'in 2.ısıtma termogramı incelendiğinde; erime piki (T_m değeri) 54°C 'de görülmektedir. Şekil 3.30 b'de verilen PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerinde ise PEG'in T_m değeri 32°C 'ye düşmüştür. Bu durum PEG bloğuna bağlanan IBMG bloklarının varlığı ile ilgilidir. Yine aynı şekilde Şekil 3.30 c'de verilen PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimerinde ise PEG'in T_m değeri 28°C 'ye düşmüştür. Erime sıcaklıklarındaki bu düşüş kopolimer içerisindeki PIBMG'in blok uzunluğunun artışı ile orantılıdır. Ayrıca Şekil 3.30 c'de PEG'in soğuk kristalizasyon piki (T_{cc}) de görülmektedir. Bu pikin alanı erime pikinin alanı ile orantılıdır. Bu da blok kopolimerler sentezlenirken PEG'in kristallendiğini ve daha sonra bu kristallerin eridiğini göstermektedir. Şekil 3.30 d'de ise blok kopolimerin molekül ağırlığının artışına bağlı olarak PEG yayvanlaştığı için pikler net olarak görülememektedir.

Sonuç olarak diblok ve triblok kopolimerlerin DSC termogramlarında MePEG ve PEG'in erime piki dışında PIBMG bloklarına ait herhangi bir erime piki görülmedi. Bu da blok kopolimerlerin poliester ünitesinin amorf yapıda olduğunu göstermektedir.

3.6. Kopolimerlerin Jel-Sol Geçiş Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Çeşitli kompozisyonlardaki kopolimerlerin ısıya hassaslık özellikleri uygun jel-sol geçiş sıcaklıklarının bulunması ile incelendi. Bunun için kopolimerler oda koşullarında deiyonize su ile karıştırılarak çeşitli konsantrasyonlarda süspansiyonlar hazırlandı. Fakat düşük konsantrasyonda hazırlanan süspansiyonlar oda sıcaklığında sol (örneğin PIBMG-MePEG 4 kopolimerinin deiyonize su ile karıştırılmasıyla hazırlanan %31 konsantrasyonundaki süspansiyon) özellik gösterdiği için polimer konsantrasyonu artırılarak oda sıcaklığında jel özellik gösterebilen yeni süspansiyonlar hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyonların jel-sol geçiş sıcaklıkları belirlendi (Tablo 3.5). Ayrıca %33 konsantrasyonundaki süspansiyon 41°C'de akarak enjeksiyon için gerekli olan uygun jel-sol geçiş sıcaklığını sağlamıştır (Tablo 3.5). Aynı şekilde PIBMG-MePEG 5 (Tablo 3.6) ve PIBMG-PEG-PIBMG 9 (Tablo 3.7) kopolimerleri içinde jel-sol geçiş sıcaklıkları bulundu.



Şekil 3.31. 9 bileşiğinin jel (a) ve sol (b) görünümü

Tablo 3.5. 4 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi

%	4°C	22°C	27°C	34°C	41°C
31	jel	sol	sol	sol	sol
31,5	jel	jel	sol	sol	sol
32,5	jel	jel	jel	sol	sol
33	jel	jel	jel	jel	sol

Tablo 3.6. 5 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi

%	4°C	26°C	28°C	40°C	48°C
30,5	jel	sol	sol	sol	sol
31	jel	jel	sol	sol	sol
31,5	jel	jel	jel	sol	sol
32	jel	jel	jel	jel	sol

Tablo 3.7. 9 bileşiğinin jel-sol geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi

%	4°C	34°C	36°C	40°C	42°C
38	jel	sol	sol	sol	sol
39	jel	jel	sol	sol	sol
40	jel	jel	jel	sol	sol
41	jel	jel	jel	jel	sol

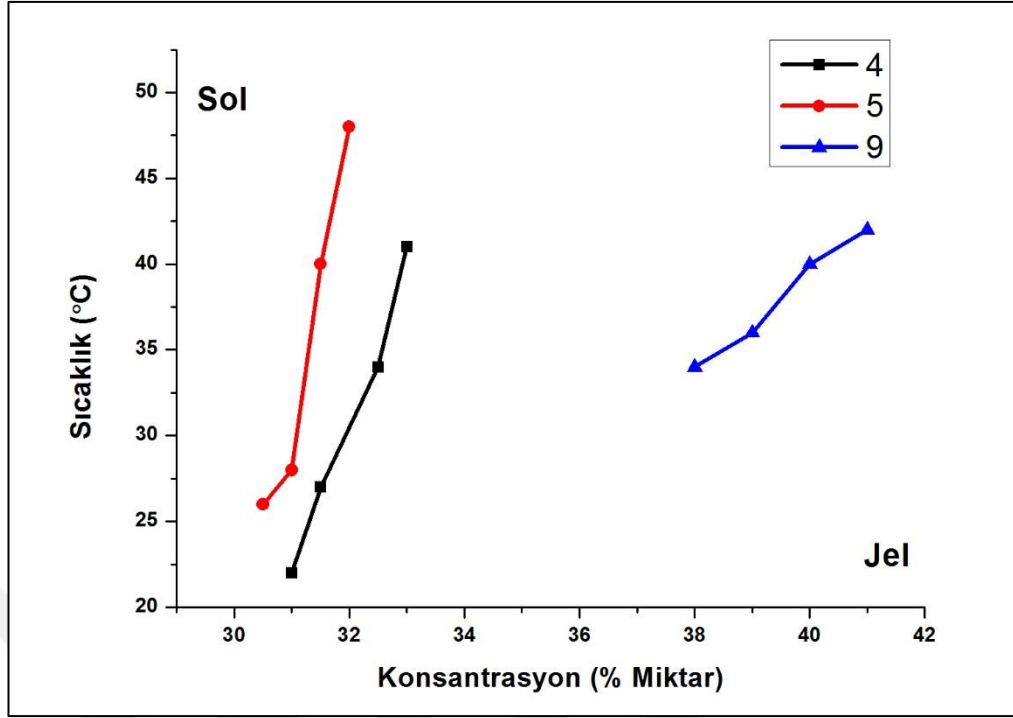
PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimeri için %33, PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimeri için %31,5 ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimeri için %40 konsantrasyon (Şekil 3.31) enjeksiyon için gerekli olan uygun jel-sol geçiş sıcaklıklarını sağlamıştır.

2 mmol PIBMG-PEG-PIBMG 10 kopolimerinin hidrofobik karakteri daha fazla olduğu için homojen bir karışım elde edilemedi ve bu nedenle jel-sol geçiş sıcaklıkları belirlenemedi.

İzobütil metil glikolid monomerinin saflaştırılması sonrasında kalan eser miktardaki safsızlık ve çözücü oranının sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıklarını ve jel-sol geçiş sıcaklıklarını büyük ölçüde etkilediği görüldü. Örneğin, PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin GPC analizi ile elde edilen M_n değeri 4660 g/mol olduğunda jel-sol geçiş sıcaklığının %41 konsantrasyon için 42°C olduğu gözlemlendi. Polimerin M_n değeri 4311 g/mol olduğunda ise aynı konsantrasyon için jel-sol geçiş sıcaklığı 9°C olarak bulundu.

Hidrofobik blok uzunluklarının değiştirilmesiyle jel-sol geçiş sıcaklıklarının kolayca ayarlanabildiği görüldü. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin uygun jel-sol geçiş sıcaklığı hidrofobik PIBMG'in blok uzunluğunun artışına bağlı olarak PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimerinden daha düşük konsantrasyonda görüldü.

Sonuç olarak sulu polimer çözeltilerinin yüksek sıcaklıkta düşük konsantrasyonda sol formunda ve düşük sıcaklıkta yüksek konsantrasyonda jel formunda olduğu kanısına varıldı (Şekil 3.32).



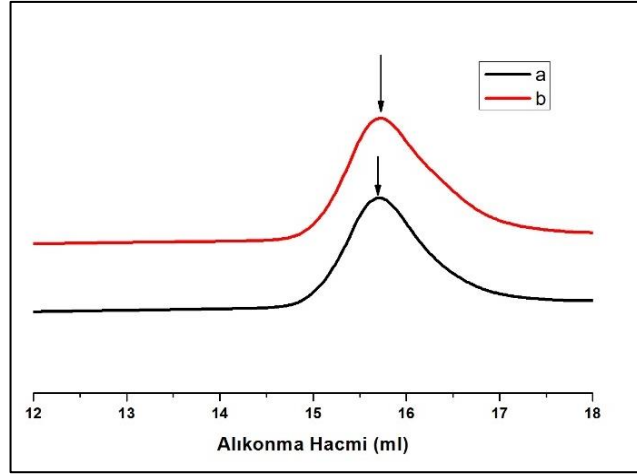
Şekil 3.32. PIBMG-MePEG 4, PIBMG-MePEG 5 ve PIBMG-PEG-PIBMG 9 kopolimerlerinin jel-sol geçiş eğrileri

3.7. Biyobozunurluk Çalışmaları

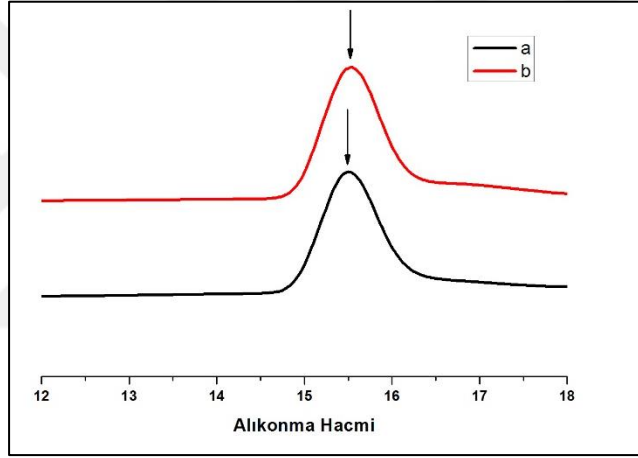
PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin hidrolitik biyobozunurluk çalışması deiyonize su içinde 10 günlük süreç için 37°C'de molekül ağırlığı değişimine göre gerçekleştirildi.

PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin hidrolitik biyobozunurluk çalışması ise pH'ı 7,4 olan PBS içinde 21 günlük süreç için 37°C'de molekül ağırlığı değişimine göre yapıldı.

PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin hidrolitik bozunması ile ana zincirin zincir uçlarından kopmaların gerçekleşmesi sonucunda tekrarlayan birim sayısının azalmış olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.33 ve Şekil 3.34). PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin 10 günlük süreç için molekül ağırlığı 4157 g/mol'den 3847 g/mol'e düşmüştür (Şekil 3.33). PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinde ise 21 günlük süreç için molekül ağırlığının 4788 g/mol'den 4424 g/mol'e azaldığı ve oligomerik türlere ait pik şiddetinin de arttığı (%2,5) gözlemlenmiştir (Şekil 3.34).

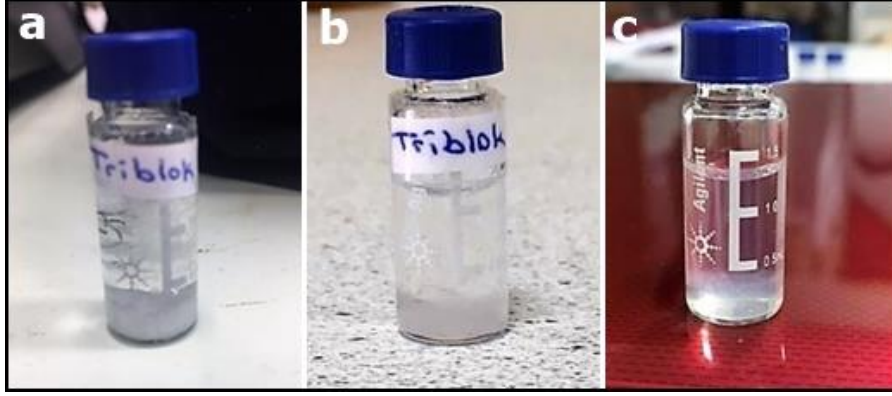


Şekil 3.33. a. 5 kopolimerinin bozunurluk öncesi,
b. 5 kopolimerinin bozunurluk sonrası



Şekil 3.34. a. 10 kopolimerinin bozunurluk öncesi,
b. 10 kopolimerinin bozunurluk sonrası

Diğer taraftan pH'ı 7,4 olan PBS içerisinde hazırlanan PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimer jelinin bir aylık süreç sonunda %85'inin çözüldüğü gözlemlendi (Şekil 3.35 b). Yine pH'ı 7,4 olan PBS içerisinde hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer jelinin ise 10. günde %75 azaldığı (Şekil 3.35 c) ve 20. günde tamamen çözüldüğü görüldü. Bu nedenle bu blok kopolimerlerin GPC ile molekül ağırlığı değişimi hesaplanmadı.



Şekil 3.35. a. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin 5. günde ki görüntüsü, b. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin 31. günde ki görüntüsü, c. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin 10. günde ki görüntüsü

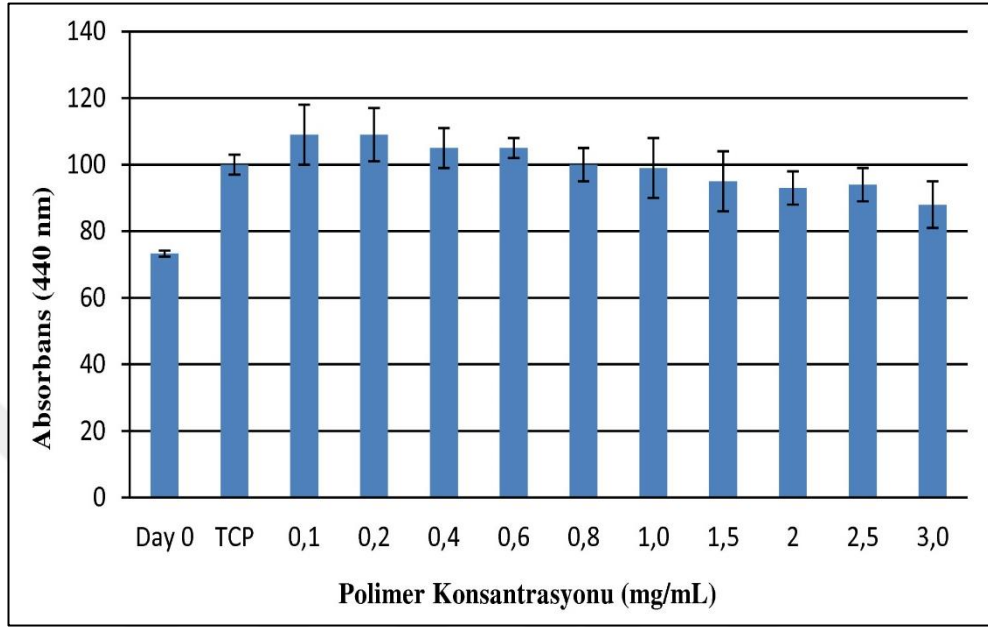
3.8. Biyouyumluluk Çalışmaları

Seri seyreltme yöntemi ile 3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan, 48 saat boyunca inkübatör içerisinde %5 CO₂'li ortamda 37°C'de tutulan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin L-929 fare fibroblast hücre hattı ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki in vitro toksisite testleri WST-1 çoğalma ve sitotoksikite testi ve Live-dead analizi ile değerlendirilmiştir. WST-1 testi çeşitli mitokondriyel dehidrogenaz enzimleri vasıtasıyla hafif kırmızı olan tetrazolyum tuzunun koyu renkli formazana dönüşümüne dayalıdır [77]. Ayrıca WST-1 testinde bazen madde enzimin aktivitesini etkileyip farklı sonuçlara sebebiyet verebildiğinden aynı polimerler için Live-dead analizleri de gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. WST-1 çoğalma ve sitotoksikite testi

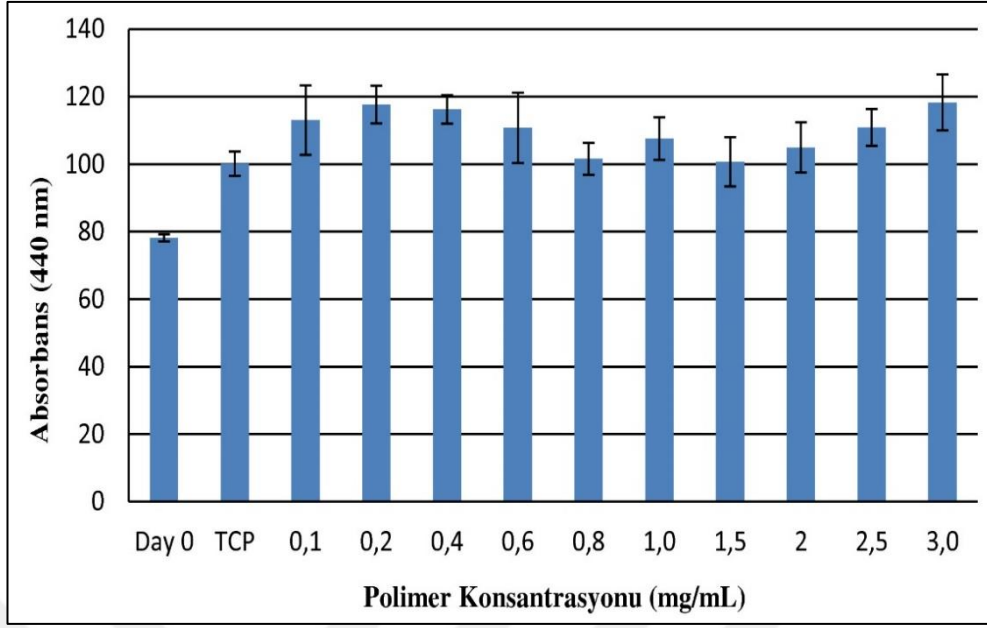
Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücreleri üzerindeki çoğalma ve sitotoksikite değerlendirmeleri için öncelikle kuyucuklara %5'lik WST-1 solüsyonu eklenerek 1 saat boyunca 37°C'de, %5 CO₂ inkübatör ortamında bekletildi ve ardından mikropłaka okuyucu (FlexStation3, Molecular Devices) kullanılarak 440 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi aşağıda verilmektedir (Şekil 3.36). Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9

kopolimer çözeltilerinin de L-929 hücreleri üzerindeki çoğalma ve sitotoksite değerlendirmeleri için aynı şekilde çalışmalar yapılarak veriler değerlendirildi (Şekil 3.37).



Şekil 3.36. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücre hattı mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi

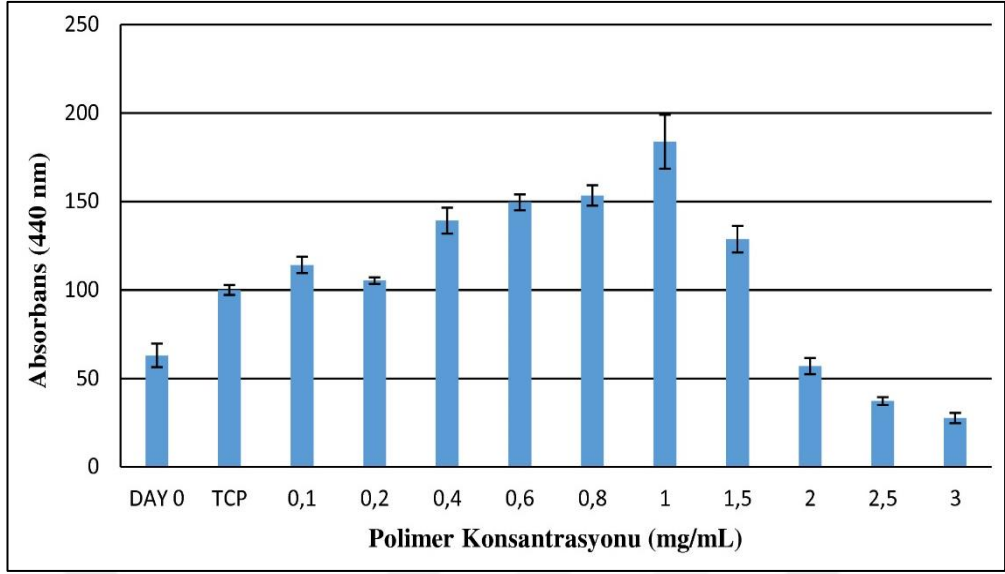
Şekil 3.36 incelendiğinde PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin düşük konsantrasyonlarda (0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL) kullanıldığında hücrelerin çoğalmasına yardımcı olduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise çok az miktarda sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir.



Şekil 3.37. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücre hattı mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi

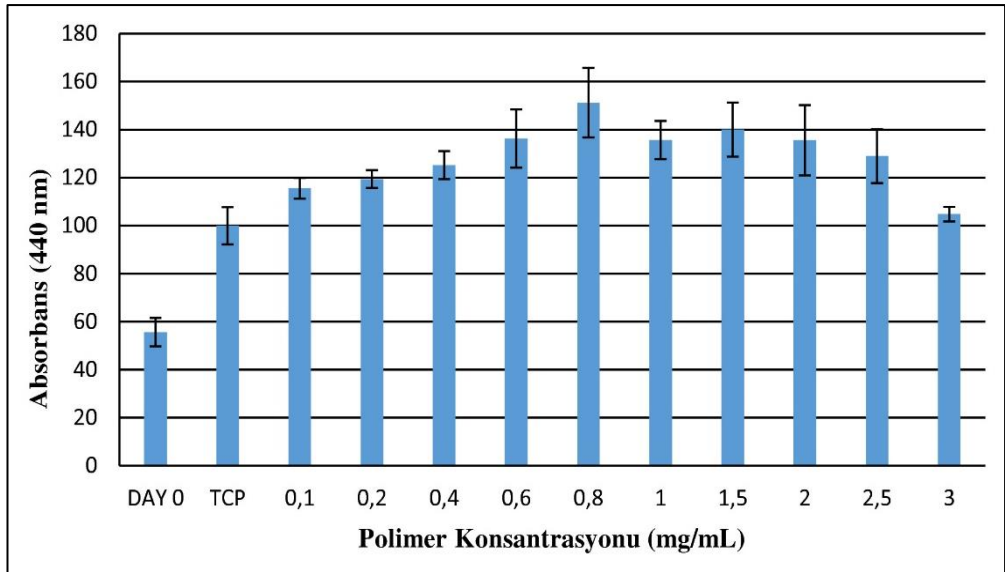
Şekil 3.37 incelendiğinde PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin L-929 hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı ve polimerin hücrelerin çoğalmasına yardımcı olduğu anlaşılmaktadır.

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri üzerindeki çoğalma ve sitotoksosite değerlendirmeleri için yine öncelikle kuyucuklara %5'lik WST-1 solüsyonu eklenerek 1 saat boyunca 37°C'de, %5 CO₂ inkibatör ortamında bekletildi ve ardından mikropilaka okuyucu (FlexStation3, Molecular Devices) kullanılarak 440 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi aşağıda verilmektedir (Şekil 3.38). Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin de dermal fibroblast hücreleri üzerindeki çoğalma ve sitotoksosite değerlendirmeleri için aynı şekilde çalışmalar yapılarak veriler değerlendirildi (Şekil 3.39).



Şekil 3.38. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 3.38 incelendiğinde PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin 1,5 mg/mL konsantrasyona kadar hücrelerin çoğalmasına yardımcı olduğu ve herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. Özellikle 1 mg/mL konsantrasyonda hücre çoğalmasının çok fazla olduğu görülmektedir. 2 mg/mL'den itibaren ise hücre ölümlerinin başladığı ve 2,5 ve 3,0 mg/mL konsantrasyonlarda ise hücre ölümlerinin arttığı anlaşılmaktadır.



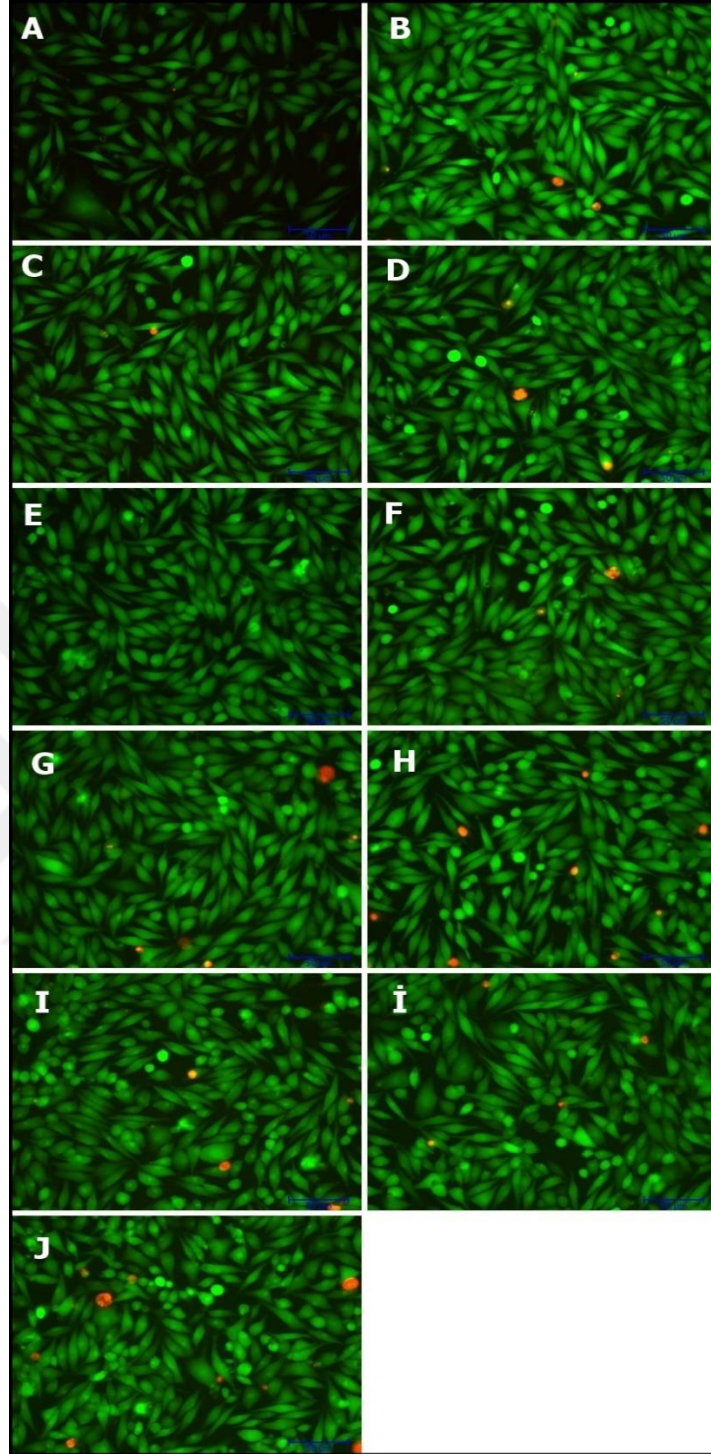
Şekil 3.39. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin dermal fibroblast hücreleri mitokondriyel aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 3.39 incelendiğinde PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı ve hücrelerin çoğalmasını hızlandırdığı anlaşılmaktadır.

3.8.2. Live-dead analizi

Seri seyreltme yöntemi ile çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimer çözeltilerinin L-929 hücreleri ve dermal fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitelerini değerlendirmek için gerçekleştirilen Live-dead analizinde ise canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanarak 20x’de çekilmiş mikroskop görüntüleri alındı.

PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini göstermek amacıyla 20x’de çekilmiş mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.40).

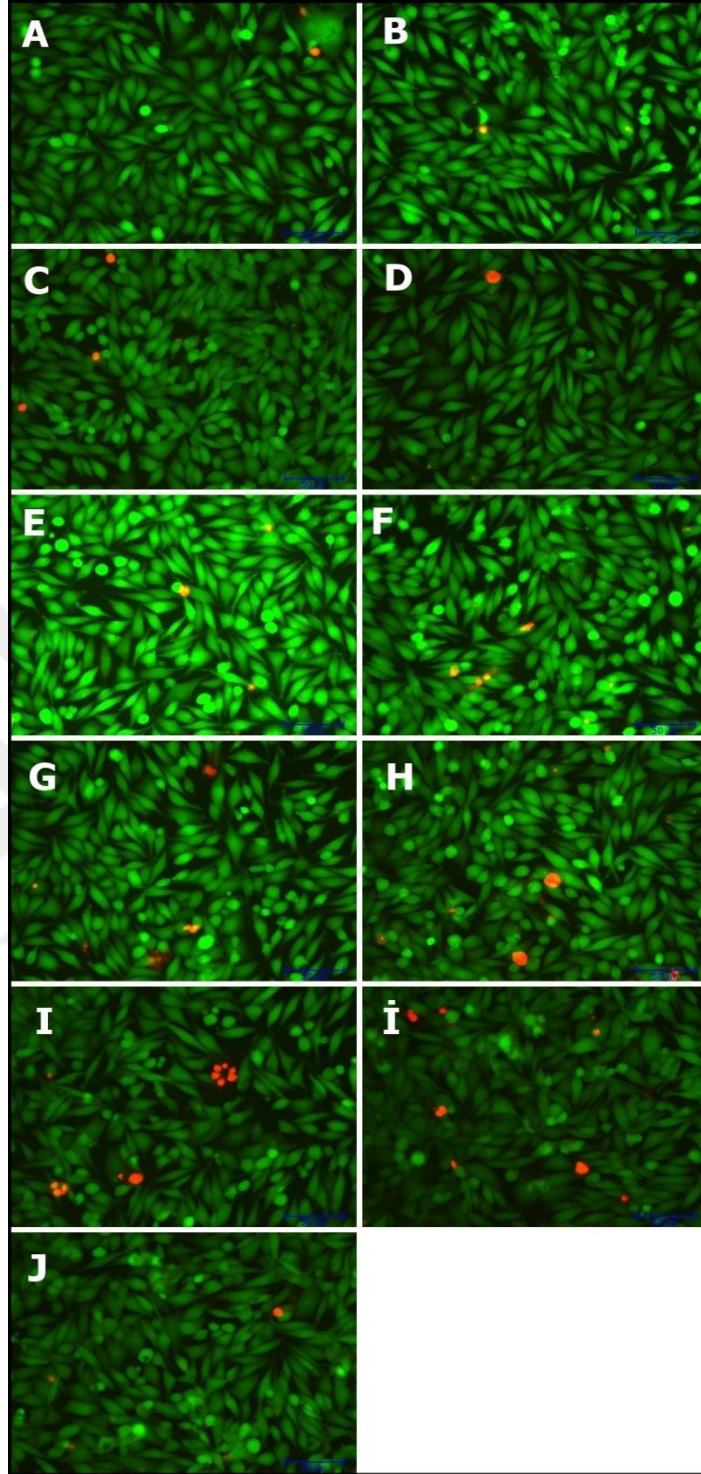


Şekil 3.40. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL

PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimeri için Live-dead analizi de WST-1 testinin sonuçlarını doğrulamaktadır. Yuvarlak olan hücreler kırmızıya boyanmadığından ve TCP’de de aynı morfolojiye rastlandığından muhtemelen bu durum hücrelerin kendi doğal yapısından kaynaklanmaktadır (Şekil 3.40).

PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini göstermek amacıyla 20x’de çekilmiş mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.41).



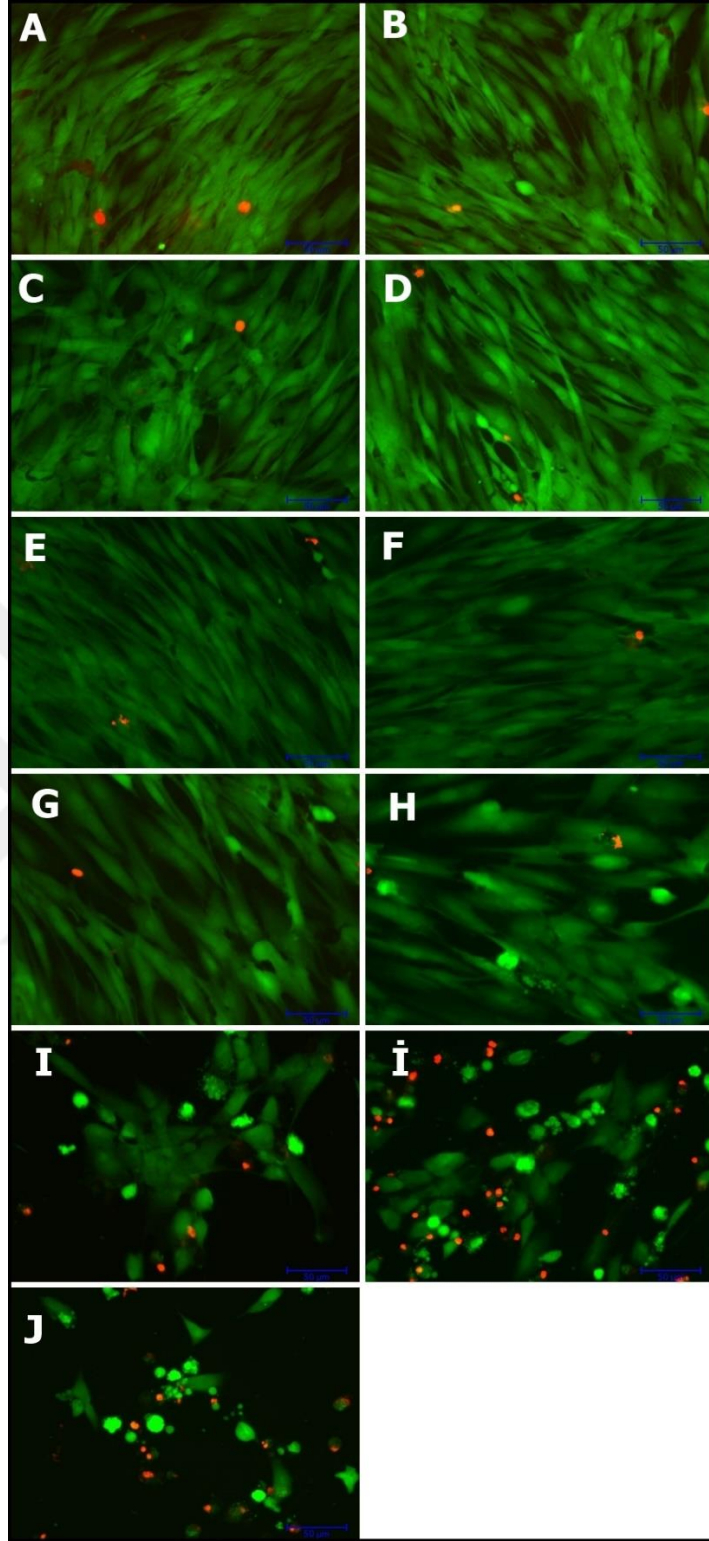


Şekil 3.41. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin L-929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL

PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin Live-dead analizinde görülen yuvarlak hücreler kırmızıya boyanmadığından ve TCP’de de aynı morfolojide olduklarından muhtemelen bu durum hücrelerin kendi doğal yapısından kaynaklanmaktadır (Şekil 3.41). Ayrıca PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimeri için gerçekleştirilen bu analiz WST-1 testinin sonuçlarını da doğrulamaktadır.

PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi de incelendi. 20x’de çekilmiş mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.42).



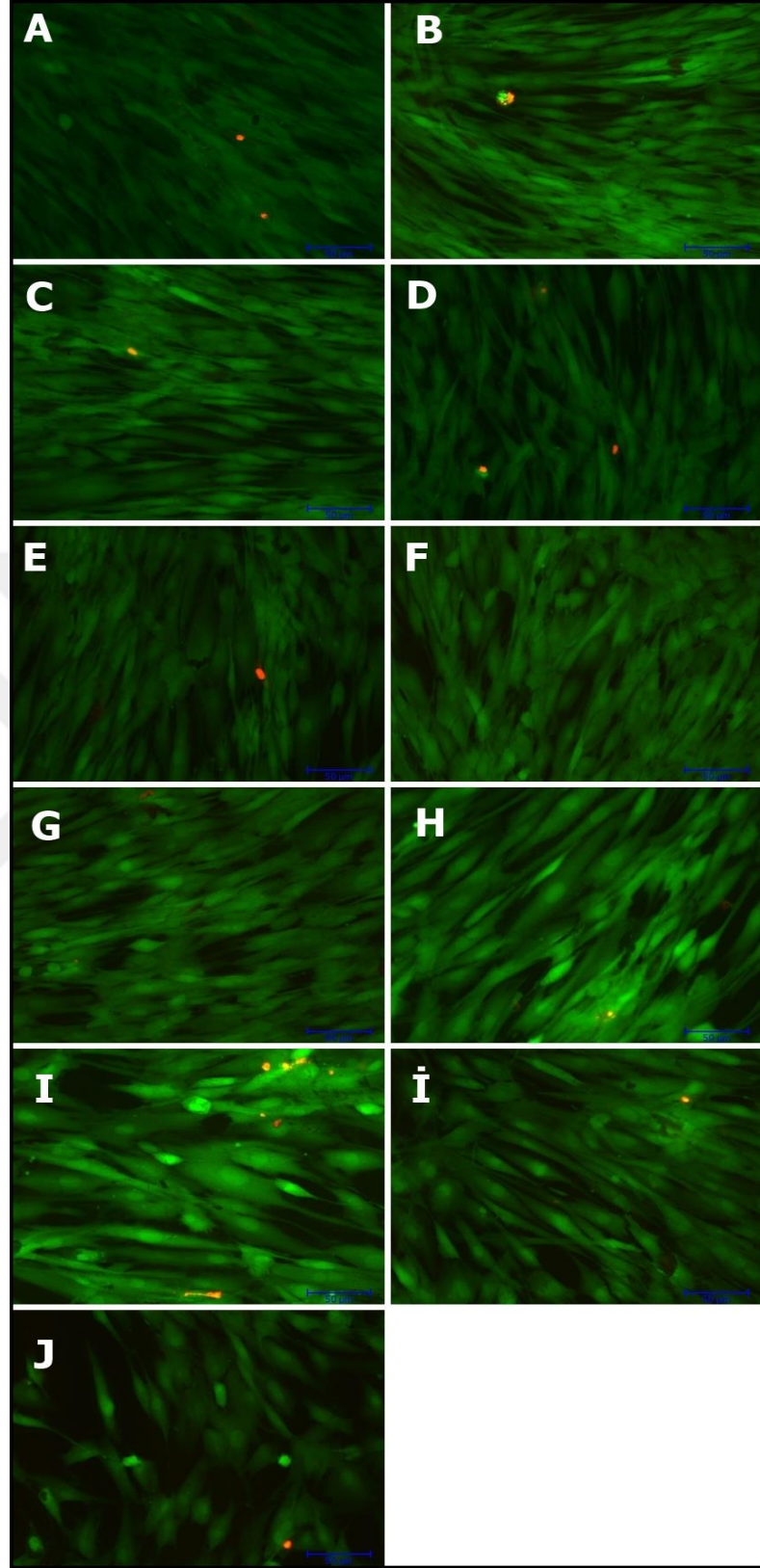


Şekil 3.42. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL

Şekil 3.42’de verilen PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin mikroskop görüntüleri incelendiğinde 1,5 mg/mL’den itibaren hücrelerin morfolojilerinin değişerek yüzeyden kalktığı ve hasar görmeye başladığı görülmektedir. 2,0 mg/mL’den itibaren ise apoptoz (programlı ölüm) başlamaktadır. Konsantrasyon arttıkça canlı hücre sayısı azalmaktadır. WST-1 sonuçlarına göre 1,5 mg/mL konsantrasyonda henüz mitokondriyel aktivite etkilenmemekle birlikte, Live-dead analizi sonuçları bu konsantrasyonda hücre hasarının başladığına işaret etmektedir.

PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi de incelendi. 20x’de çekilmiş mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.43).





Şekil 3.43. Çeşitli konsantrasyonlardaki PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. A: TCP, B: 0,1 mg/mL, C: 0,2 mg/mL, D: 0,4 mg/mL, E: 0,6 mg/mL, F: 0,8 mg/mL, G: 1 mg/mL, H: 1,5 mg/mL, I: 2,0 mg/mL, İ: 2,5 mg/mL, J: 3,0 mg/mL

Şekil 3.43’de verilen PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin mikroskop görüntüleri incelendiğinde 3 mg/mL konsantrasyon dışında hücrelerin canlı ve sağlıklı olduğu görülmektedir. 3 mg/mL konsantrasyonda ise hücrelerin çekildiği, yüzeye tutunmada azalma olduğu görülmektedir. Henüz hücre ölümlerinin gerçekleşmediği fakat hücrelerin morfolojilerinin değiştiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar WST-1 sonuçları ile uyumludur.

Sonuç olarak PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerine göre daha az olduğu bulundu. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimeri hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermedi. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimeri ise hücreler üzerinde 1,5 mg/mL sonrasında değerlendirilmiş konsantrasyonlarda sitotoksik etki yarattı.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sistemik toksisiteye neden olan genel kemoterapinin eksikliklerini gidermek için son yıllarda bilim dünyasının odaklandığı lokal ilaç salım sistemlerinde poli(laktid) PLA, poli(laktid-ko-glikolid) PLGA gibi biyobozunur poliesterler ve bunların PEG ile oluşturduğu hidrofobik ve hidrofilik bloklardan oluşan blok kopolimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Buna karşın glikolik asit türevlerinin kullanılmasıyla hazırlanan glikolid ailesi polimerleri ve sübstitüye glikolid-PEG blok kopolimerleri üzerine literatürde çok az çalışma vardır. Bu blok kopolimerlerin sentezi PLA'nın bozunma hızını yavaşlatan yüksek kristalinite gibi özelliklerini iyileştirmek ve biyomedikal ve farmasötik endüstriye fiziksel özellikleri geniş yeni biyomalzemeler kazandırmak için önemlidir.

Bu amaçla öncelikle bir asimetrik alkil sübstitüye glikolid olan izobütil metil glikolid (IBMG) monomerinin sentezi gerçekleştirildi. Ardından MePEG-2000 ve PEG-2000 homopolimerlerini kullanarak halka açılması polimerizasyonu yöntemi ile 3 saat gibi kısa bir reaksiyon süresinde çözücüsüz ortamda yeni, ısıya hassas, biyobozunur ve biyouyumlu PIBMG-MePEG diblok ve PIBMG-PEG-PIBMG triblok kopolimerleri sentezlendi. Katalizör olarak düşük toksisiteye ve tamamen polimerleşme dönüşümüne sahip olduğu için Sn(Oct)₂ katalizörü kullanıldı [72, 73, 74].

Sentezlenen diblok ve triblok kopolimerlerin DSC termogramları incelendiğinde MePEG ve PEG'in erime piki dışında PIBMG bloklarına ait herhangi bir erime piki görülmedi. Bu da sentezlenen blok kopolimerlerin poliester ünitesinin amorf yapıda olduğunu göstermektedir.

Blok kopolimerler sentezlenirken ısıya hassaslık özelliklerini inceleyebilmek için hidrofilik PEG ve MePEG bloklarının kütleleri sabit tutulup, hidrofobik poliester parçaları farklı kütlelerde kullanılarak her bir bileşenin uzunluğu özenle ayarlandı. Kopolimerlerin çeşitli konsantrasyonlarda süspansiyonları hazırlanarak jel-sol geçiş sıcaklıkları belirlendi. PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinde uygun jel-sol geçiş

sıcaklığı hidrofobik PIBMG bloklarının uzunluklarının artışına bağlı olarak PIBMG-MePEG diblok 4 kopolimerinden daha düşük konsantrasyonda görüldü.

Biyobozunurluk çalışması 37°C’de inkibatör içerisinde gerçekleştirilen deiyonize su ile hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin 10 günlük süreç için molekül ağırlığında 310 g/mol azalma (M_n : 4157 g/mol’den 3847 g/mol’e) gözlemlendi. Aynı koşullar altında biyobozunurluk çalışması gerçekleştirilen pH’ı 7,4 olan PBS ile hazırlanan PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimerinin ise 21 günlük süreç için molekül ağırlığında 364 g/mol azalma (M_n : 4788 g/mol’den 4424 g/mol’e) gözlemlendi. Diğer taraftan pH’ı 7,4 olan PBS ile hazırlanan PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimer jelinin 20. günde tamamen çözündüğü gözlemlendi. Bu bulgu diblok kopolimer jelinin böbreklerden filtrasyon yoluyla vücuttan hızlı bir şekilde uzaklaştırılabileceğini gösterdiğinden önemlidir. PIBMG-PEG-PIBMG triblok 10 kopolimer jelinin ise bir aylık süreç sonunda %85’inin çözündüğü gözlemlendi.

In vitro biyoyumluluk çalışmalarında blok kopolimerlerin L-929 fare fibroblast hücre hattı ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitelerini değerlendirmek için gerçekleştirilen WST-1 testlerinde ve Live-dead analizlerinde genel olarak PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin hücreler üzerinde herhangi bir toksisitesinin olmadığı ve hücrelerin çoğalmasını hızlandırdığı gözlemlendi.

PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin L-929 fare fibroblast hücre hattı ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitelerini değerlendirmek için gerçekleştirilen WST-1 testlerinde ise genel olarak düşük konsantrasyonlarda hücrelerin çoğalmasını hızlandırdığı ve herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görüldü. 2 mg/mL’den itibaren ise hücre ölümlerinin başladığı ve konsantrasyon arttıkça hücre ölümlerinin de arttığı gözlemlendi. Dermal fibroblast hücreleri üzerindeki Live-dead analizlerinde ise 1,5 mg/mL’den itibaren hücrelerin morfolojilerinin değişerek yüzeyden kalkmaya başladığı, 2,0 mg/mL’den itibaren ise apoptozların başladığı gözlemlendi. Özetle PIBMG-PEG-PIBMG triblok 9 kopolimerinin değerlendirilen konsantrasyonlarda hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı, PIBMG-MePEG diblok 5 kopolimerinin ise 2,0 mg/mL’den itibaren sitotoksik etki yarattığı anlaşılmaktadır.

Bu tez kapsamında sentezlenen yeni, ısıya hassas, biyobozunur ve biyoyumlu blok kopolimerlerin enjeksiyon için gerekli olan 40-41°C sıcaklık aralığında sol fazında olması ve soğutmayla fizyolojik koşullar altında (37°C) hedef dokuda jel oluşturabilmesi pek çok antikanser ilacın yüklemesinin yapılarak lokal bölgelerdeki tümörlerin tedavisinde ve beyindeki katı tümörlerin tedavisinde kullanılabilmesine olanak tanıyacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Cristini-Robbe O., Ruyffelaere F., Dubart F., Uwimanimpaye A., Kinowski C., Bernard R., Robbe-Masselot C., Yazidi I. E., Turrell S., Local Drug Delivery Strategy for Cancer Treatment: Use of Biocompatible Sol-Gel-Derived Porous Materials, *New Journal of Glass and Ceramics*, 2013, **3**, 74-79.
- [2] Parhi P., Mohanty C., Sahoo S. K., Nanotechnology-Based Combinational Drug Delivery: An Emerging Approach for Cancer Therapy, *Drug Discovery Today*, 2012, **17**, 1044-1052.
- [3] Prakash S., Malhotra M., Shao W., Tomaro-Duchesneau C., Abbasi S., Polymeric Nanohybrids and Functionalized Carbon Nanotubes as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, **63**, 1340-1351.
- [4] Gong C., Shi S., Wu L., Gou M., Yin Q., Guo Q., Dong P., Zhang F., Luo F., Zhao X., Wei Y., Qian Z., Biodegradable in situ gel-forming controlled drug delivery system based on thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogel. Part 2: Sol-gel-sol transition and drug delivery behavior, *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 3358-3370.
- [5] Qiu Y., Park K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv Drug Deliver Reviews*, 2001, **53**, 321-339.
- [6] Hatefi A., Amsden B., Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 2002, **80**, 9-28.
- [7] Krukiewicz K., Zak J. K., Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects, *Materials Science and Engineering C*, 2016, **62**, 927-942.
- [8] Kemper E. M., Boogerd W., Thuis I., Beijnen J. H., Tellingena O. V., Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours?, *Cancer Treatment Reviews*, 2004, **30**, 415-423.
- [9] Juratli T. A., Schackert G., Krex D., Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches, *Pharmacol. Ther.*, 2013, **139**, 341-358.
- [10] Singh N. K., Lee D. S., In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2014, **193**, 214-227.
- [11] Yu L., Ding J., Injectable hydrogels as unique biomedical materials, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 1473-1481.

- [12] Lee S. J., Park C. W., Kim S. C., Temperature-Sensitive Sol-Gel Transition Behavior of Biodegradable Four-Arm Star-Shaped PEG-PLGA Block Copolymer Aqueous Solution, *Polymer Journal*, 2009, **41**(5), 425-431.
- [13] Jeong B., Gutowska A., Lessons from nature: Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *TRENDS in Biotechnology*, 2002, **20**, 305-311.
- [14] Malmsten M., Lindman B., Self-assembly in aqueous block copolymer solutions, *Macromolecules*, 1992, **25**, 5440-5445.
- [15] Bhardwaj R., Blanchard J., Controlled release delivery system for the α -MSH analog melanotan-I using Poloxamer 407, *J. Pharm. Sci.*, 1996, **85**, 915-919.
- [16] Jeong B., Kibbey M. R., Birnbaum J. C., Won Y. Y., Gutowska A., Thermogelling Biodegradable Polymers with Hydrophilic Backbones: PEG-g-PLGA, *Macromolecules*, 2000, **33**(22), 8317-8322.
- [17] Wout Z. G. M., Pec E. A., Maqqiore J. A., Williams R. H., Palicharla P., Johnston T. P., Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats, *J. Parenter. Sci. Technol.*, 1992, **46**, 192-200.
- [18] Jeong B., Bae Y. H., Lee D. S., Kim S. W., Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature*, 1997, **388**, 860-862.
- [19] Jeong B., Bae Y. H., Kim S. W., Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions, *Macromolecules*, 1999, **32**, 7064-7069.
- [20] Jeong B., Bae Y. H., Kim S. W., In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **50**, 171-177.
- [21] Vogel E. B., Synthesis, Characterization, and Applications of Functionalized Polyglycolides, Doctor of Philosophy, Michigan State University, Department of Chemistry, Michigan, 2008, 3332031.
- [22] Jurek II T. L., Synthesis and Characterization of Tetrahydrofurfuryl Substituted Polylactides, Master of Science, Michigan State University, Department of Chemistry, Michigan, 2010, 1493395.
- [23] Jing F., Smith M. R., Baker G. L., Cyclohexyl-Substituted Polyglycolides with High Glass Transition Temperatures, *Macromolecules*, 2007, **40**(26), 9304-9312.
- [24] Yin M., Baker G. L., Preparation and Characterization of Substituted Polylactides, *Macromolecules*, 1999, **32**(23), 7711-7718.
- [25] Simmons T. L., Baker G. L., Poly(phenyllactide): Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation, *Biomacromolecules*, 2001, **2**(3), 658-663.

- [26] Trimaille T., Möller M., Gurny R., Synthesis and Ring-Opening Polymerization of New Monoalkyl-Substituted Lactides, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2004, **42**, 4379-4391.
- [27] Liu T., Simmons T. L., Bohnsack D. A., Mackay M. E., Smith M. R., Baker G. L., Synthesis of Polymandelide: A Degradable Polylactide Derivative with Polystyrene-like Properties, *Macromolecules* 2007, **40**, 6040-6047.
- [28] Yang S. L., Wu Z. H., Yang W., Yang M. B., Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA), *Polymer Testing*, 2008, **27**, 957-963.
- [29] Nijenhuis A. J., Grijpma D. W., Pennings A. J., Lewis Acid Catalyzed Polymerization of L-Lactide. Kinetics and Mechanism of the Bulk Polymerization, *Macromolecules*, 1992, **25**, 6419-6424.
- [30] Tsuji H., Daimon H., Fujie K., A New Strategy for Recycling and Preparation of Poly(L-lactic acid): Hydrolysis in the Melt, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 835-840.
- [31] Vink E. T. H., Ra'bagó K. R., Glassner D. A., Gruber P. R., Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production, *Polymer Degradation and Stability*, 2003, **80**, 403-419.
- [32] Uhrich K. E., Cannizzaro S. M., Langer R. S., Shakesheff K. M., Polymeric Systems for Controlled Drug Release, *Chemical Reviews*, 1999, **99**, 3181-3198.
- [33] Kimura Y., Biomedical Applications of Polymeric Materials, Editors: Tsuruta T., Hayashi T., Kataoka K., Ishihara K., Kimura Y., *Biodegradable Polymers*, 6nd ed., CRC Press, Boca Raton, 164-190, 1993.
- [34] Ojeda T., Polymers and the Environment, Editor: Yılmaz F., *Polymer Science*, 1st ed., Intech, Croatia, 1-34, 2013.
- [35] Reeve M. S., McCarthy S. P., Downey M. J., Gross R. A., Polylactide Stereochemistry: Effect on Enzymatic Degradability, *Macromolecules*, 1994, **27**, 825-831.
- [36] Nampoothiri K. M., Nair N. R., John R. P., An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresource Technology*, 2010, **101**, 8493-8501.
- [37] Farah S., Anderson D. G., Langer R., Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, **107**, 367-392.
- [38] Drumright R. E., Gruber P. R., Henton D. E., Polylactic Acid Technology, *Adv. Mater.*, 2000, **12**(23), 1841-1846.
- [39] Sawyer D. J., Bioprocessing- No longer a Field of Dreams, *Macromol. Symp.*, 2003, **201**, 271-281.

- [40] Rasal R. M., Janorkar A. V., Hirt D. E., Poly(lactic acid) modifications, *Progress in Polymer Science*, 2010, **35**, 338–356.
- [41] Gupta B., Revagadea N., Hilborn J., Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 455–482.
- [42] Janorkar A. V., Metters A. T., Hirt D. E., Modification of Poly(lactic acid) Films: Enhanced Wettability from Surface-Confined Photografting and Increased Degradation Rate Due to an Artifact of the Photografting Process, *Macromolecules*, 2004, **37**, 9151-9159.
- [43] Zhang Y., Wu X., Han Y., Mo F., Duan Y., Li S., Novel thymopentin release systems prepared from bioresorbable PLA–PEG–PLA hydrogels, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, **386**, 15–22.
- [44] Kricheldorf H. R., Syntheses and application of polylactides, *Chemosphere*, 2001, **43**, 49-54.
- [45] Hu Y., Jiang X., Ding Y., Zhang L., Yang C., Zhang J., Chen J., Yang Y., Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)–poly(ethylene oxide)–polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles, *Biomaterials*, 2003, **24**, 2395–2404.
- [46] Kim K. S., Chung S., Chin I. J., Kim M. N., Yoon J. S., Crystallization Behavior of Biodegradable Amphiphilic Poly(ethylene glycol)-Poly(L-lactide) Block Copolymers, *J Appl Polym Sci*, 1999, **72**, 341–348.
- [47] Basu A., Kunduru K. R., Doppalapudi S., Domb A. J., Khan W., Poly(lactic acid) based hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, **107**, 192–205.
- [48] He C., Kim S. W., Lee D. S., In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2008, **127**, 189–207.
- [49] Li F., Li S., Ghzaoui A. E., Nouailhas H., Zhuo R., Synthesis and Gelation Properties of PEG-PLA-PEG Triblock Copolymers Obtained by Coupling Monohydroxylated PEG-PLA with Adipoyl Chloride, *Langmuir*, 2007, **23**, 2778-2783.
- [50] Wu Y. L., Chen X., Wang W., Loh X. J., Engineering Bioresponsive Hydrogels toward Healthcare Applications, *Macromol. Chem. Phys.*, 2016, **21**, 175–188.
- [51] Pan Z., Ding J., Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine, *Interface Focus*, 2012, **2**, 366–377.
- [52] Gadad A. P., Vannuruswamy G., Sharath Chandra P., Dandagi P. M., Mastiholimath V. S., Study Of Different Properties and Applications Of Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanotechnology: An Overview, *Indian Drugs*, 2012, **49**(12), 5-22.

- [53] Astete C. E., Sabliov C. M., Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 2006, **17**(3), 247–289.
- [54] Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P. V., An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**, 3640-3659.
- [55] Jain R., Shah N. H., Malick A. W., Rhodes C. T., Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1998, **24**, 703-727.
- [56] Wu X. S., Wang N., Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 2001, **12**, 21–34.
- [57] Lanao R. P. F., Jonker A. M., Wolke J. G. C., Jansen J. A., van Hest J. C. M., Leeuwenburgh S. C. G., Physicochemical Properties and Applications of Poly (lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration, *Tissue Engineering: Part B*, 2013, **19**, 380-390.
- [58] Makadia H. K., Siegel S. J., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers*, 2011, **3**, 1377-1397.
- [59] Passerini N., Craig D. Q. M., An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC, *Journal of Controlled Release*, 2001, **73**, 111–115.
- [60] Jeong B., Kim S. W., Bae Y. H., Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**, 154–162.
- [61] Chung Y. M., Simmons K. L., Gutowska A., Jeong B., Sol-Gel Transition Temperature of PLGA-g-PEG Aqueous Solutions, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 511-516.
- [62] Yu L., Ci T., Zhou S., Zeng W., Ding J., The thermogelling PLGA–PEG–PLGA block copolymer as a sustained release matrix of doxorubicin, *Biomater. Sci.*, 2013, **1**, 411–420.
- [63] Yu L., Chang G. T., Zhang H., Ding J. D., Injectable block copolymer hydrogels for sustained release of a PEGylated drug, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **348**, 95–106.
- [64] Zentner G. M., Rathi R., Shih C., McRea J. C., Seo M. H., Oh H., Rhee B. G., Mestecky J., Moldoveanu Z., Morgan M., Weitman S., Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, *Journal of Controlled Release*, 2001, **72**, 203–215.

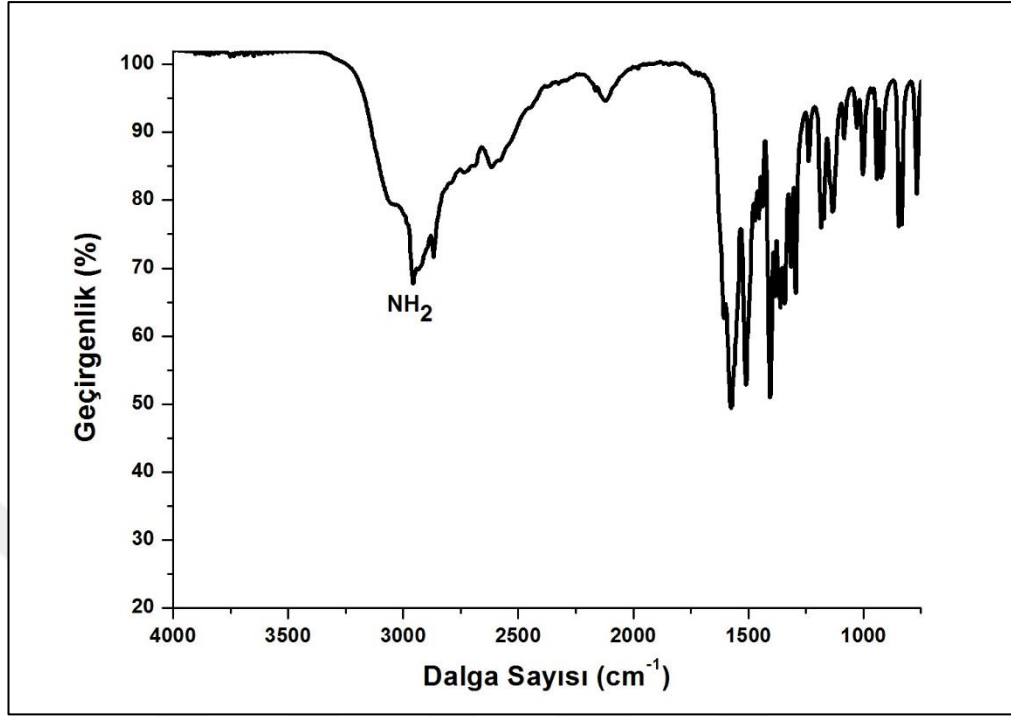
- [65] Chang G., Ci T., Yu L., Ding J., Enhancement of the fraction of the active form of an antitumor drug topotecan via an injectable hydrogel, *Journal of Controlled Release*, 2011, **156**, 21–27.
- [66] Elstad N. L., Fowers K. D., OncoGel (ReGel/paclitaxel) — Clinical applications for a novel paclitaxel delivery system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 785–794.
- [67] Gerhardt W. W., Noga D. E., Hardcastle K. I., Garcia A. J., Collard D. M., Weck M., Functional Lactide Monomers: Methodology and Polymerization, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 1735-1742.
- [68] Trimaille T., Gurny R., Möller M., Poly(hexyl-substituted lactides): Novel injectable hydrophobic drug delivery systems, *Inc. J Biomed Mater Res*, 2007, **80A**, 55–65.
- [69] Müller J., Feifel S. C., Schmiederer T., Zocher R., Süßmuth R. D., In vitro Synthesis of New Cyclodepsipeptides of the PF1022-Type: Probing the α -D-Hydroxy Acid Tolerance of PF1022 Synthetase, *ChembioChem*, 2009, **10**, 323 – 328.
- [70] Bueno M., Molina I., Galbis J. A., 1,4-Dioxane-2,5-dione-type monomers derived from L-ascorbic and D-isoascorbic acids. Synthesis and polymerisation, *Carbohydrate Research*, 2009, **344**, 2100–2104.
- [71] Masutani K., Kimura Y., PLA Synthesis. From the Monomer to the Polymer, Editors: Jimenez A., Peltzer M., Ruseckaite R., *Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications*, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Oxfordshire, 1-36, 2014.
- [72] Mert O., Doganci E., Erbil H. Y., Demir A. S., Surface Characterization of Poly(L-lactic acid)-Methoxy Poly(ethylene glycol) Diblock Copolymers by Static and Dynamic Contact Angle Measurements, FTIR, and ATR-FTIR, *Langmuir*, 2008, **24**, 749-757.
- [73] Kricheldorf H. R., Berl M., Scharnagl N., Poly(lactones). 9. Polymerization mechanism of metal alkoxide initiated polymerizations of lactide and various lactones, *Macromolecules*, 1988, **21**, 286-293.
- [74] Spinu M., Jackson C., Keating M. Y., Gardner K. H., Material Design in Poly(Lactic Acid) Systems: Block Copolymers, Star Homo- and Copolymers, and Stereocomplexes, *Journal of Macromolecular Science*, 1996, **A33**, 1497-1530.
- [75] Cohen-Arazi N., Domb A. J., Katzhendler J., Poly(α -hydroxy alcanoic acid)s Derived from α -Amino Acids, *Macromolecular Bioscience*, 2013, **13**, 1689–1699.
- [76] Ohya Y., Injectible Hydrogels, Editor: Ebara M., *Biomaterials Nanoarchitectonics*, 1st ed., William Andrew, Oxford, 41-57, 2016.

- [77] Huhtala A., Pohjonen T., Salminen L., Salminen A., Kaarniranta K., Uusitalo H., In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: Direct contact studies, *Inc. J Biomed Mater Res*, 2007, **83A**, 407-413.

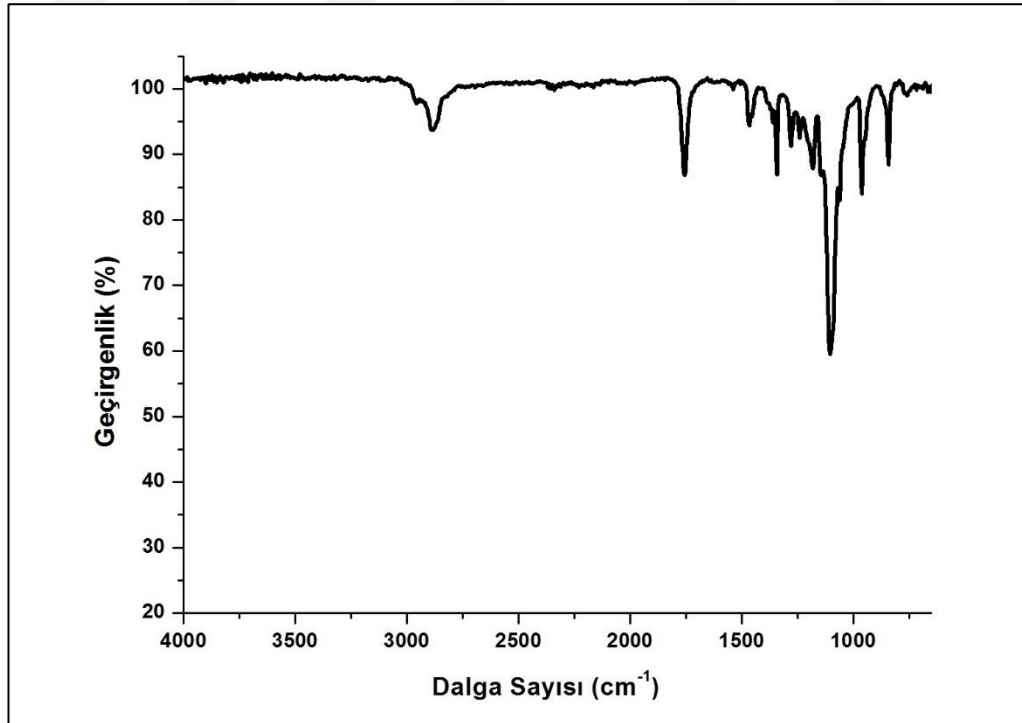




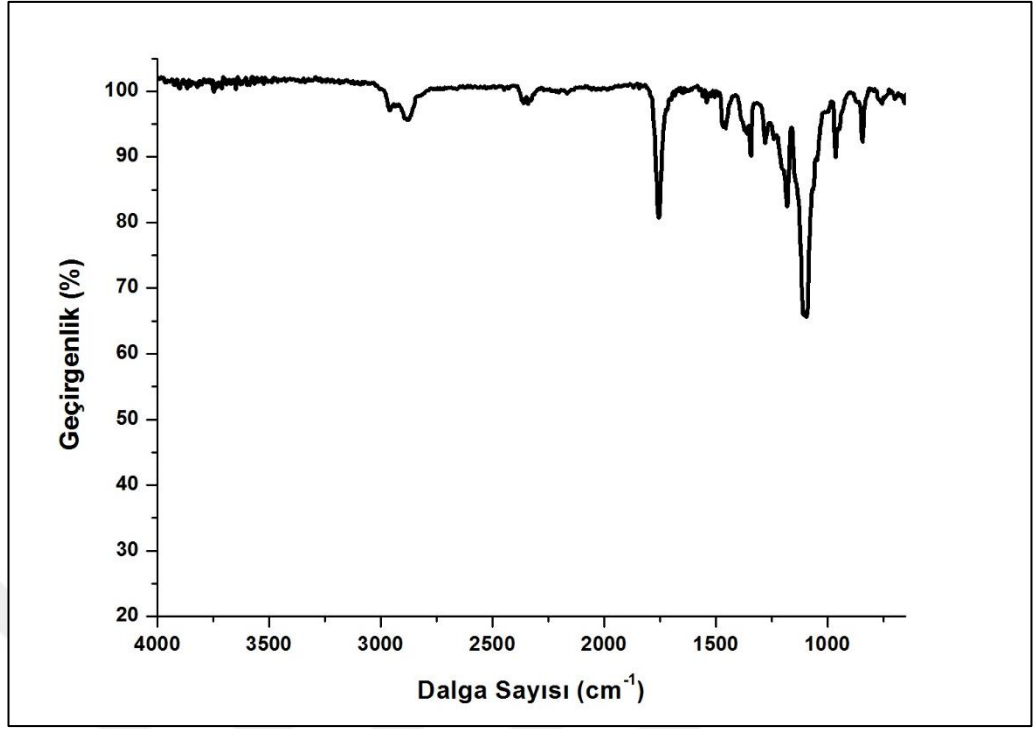
Ek-A ATR-FTIR SPEKTRUMLARI



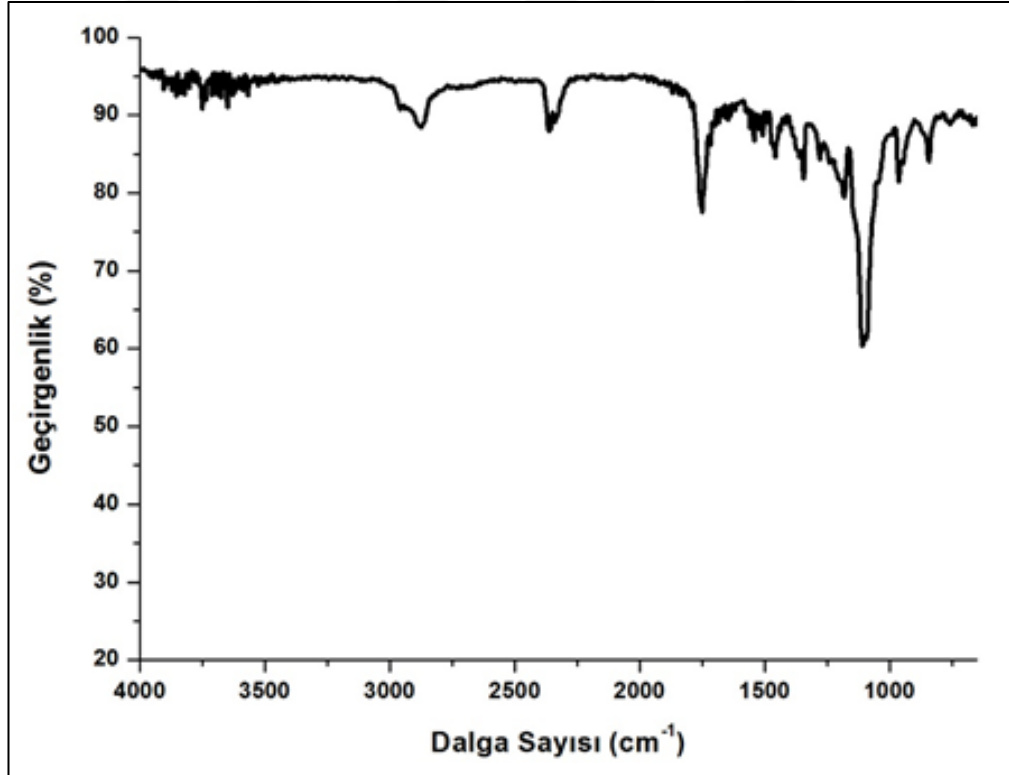
Şekil A.1. L-Lösin ATR-FTIR spektrumu



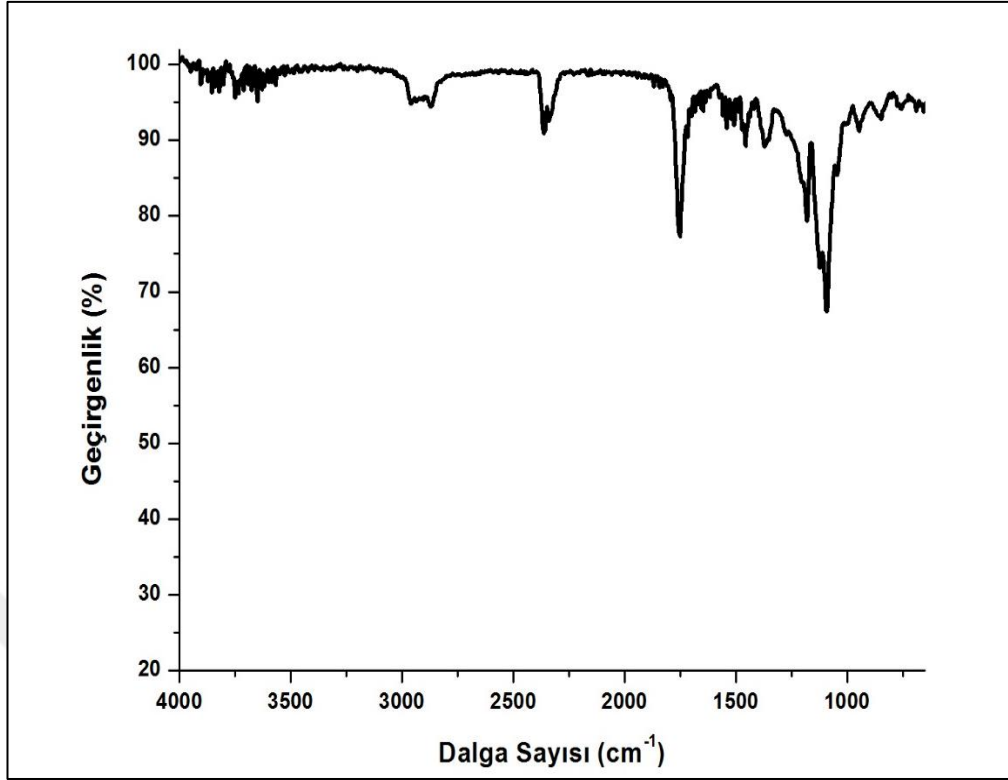
Şekil A.2. 4 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu



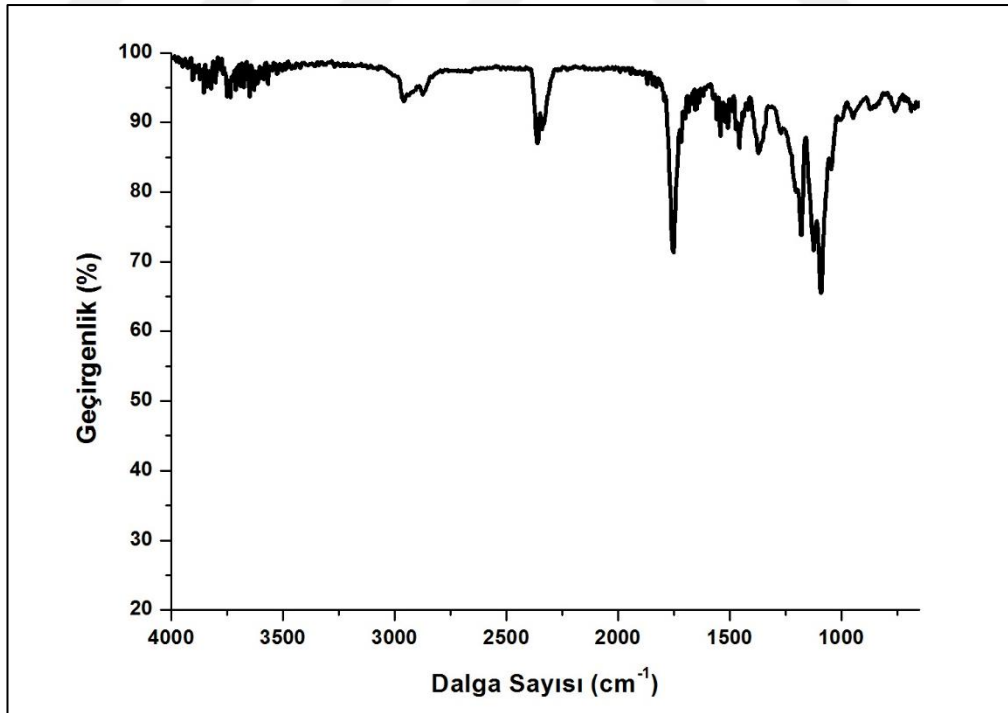
Şekil A.3. 5 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu



Şekil A.4. 9 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu

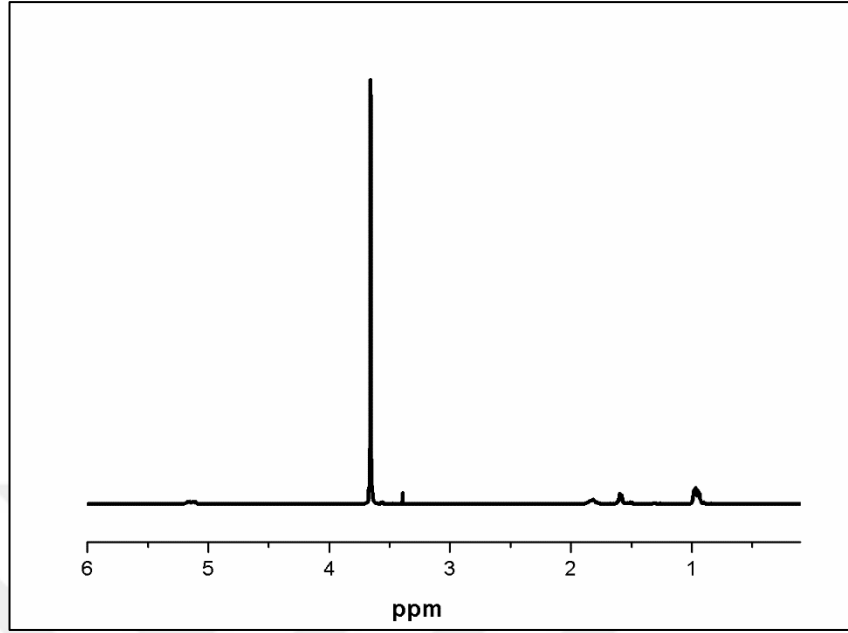


Şekil A.5. 10 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu

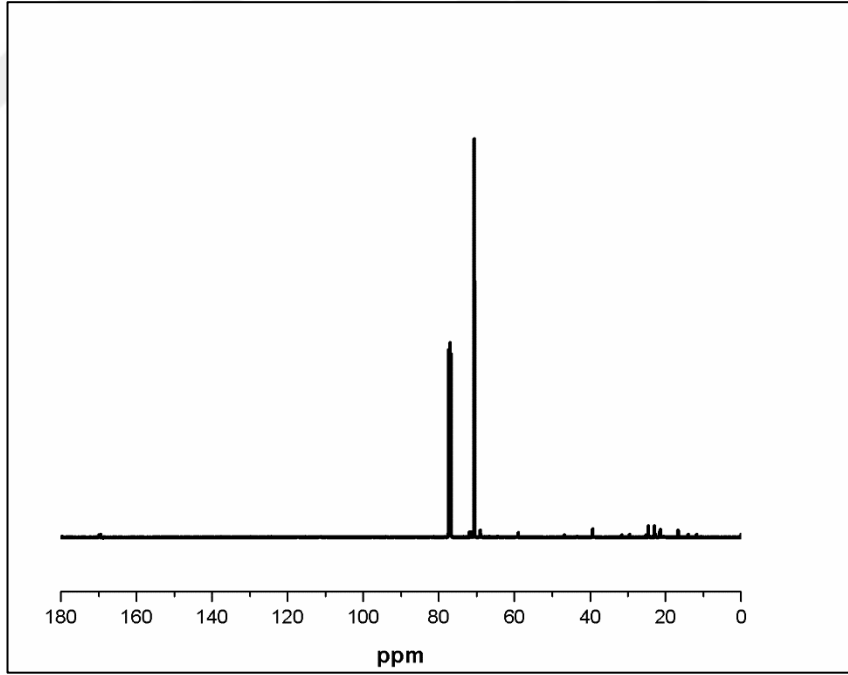


Şekil A.6. 12 bileşiğinin ATR-FTIR spektrumu

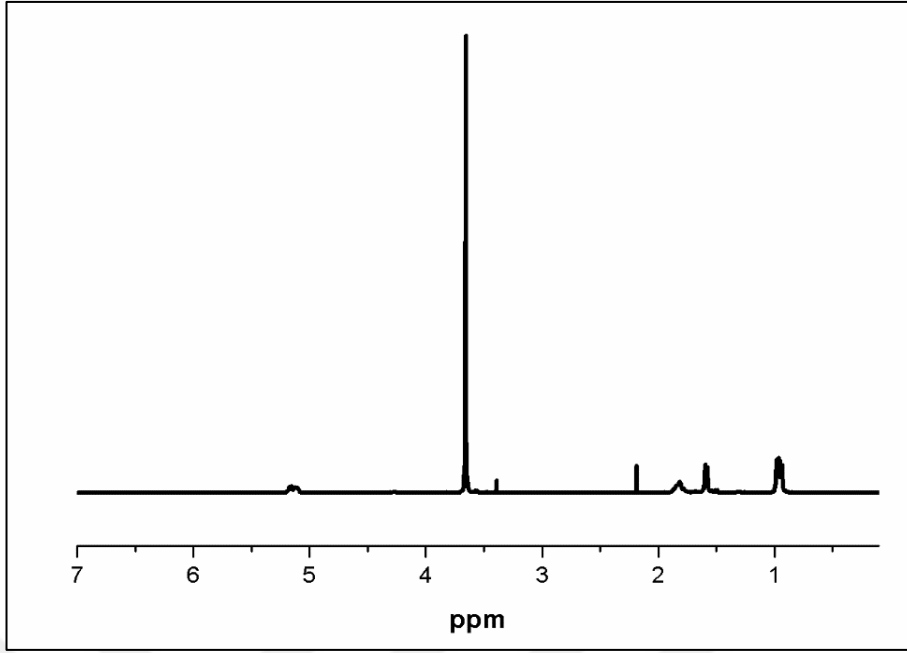
Ek-B NMR SPEKTRUMLARI



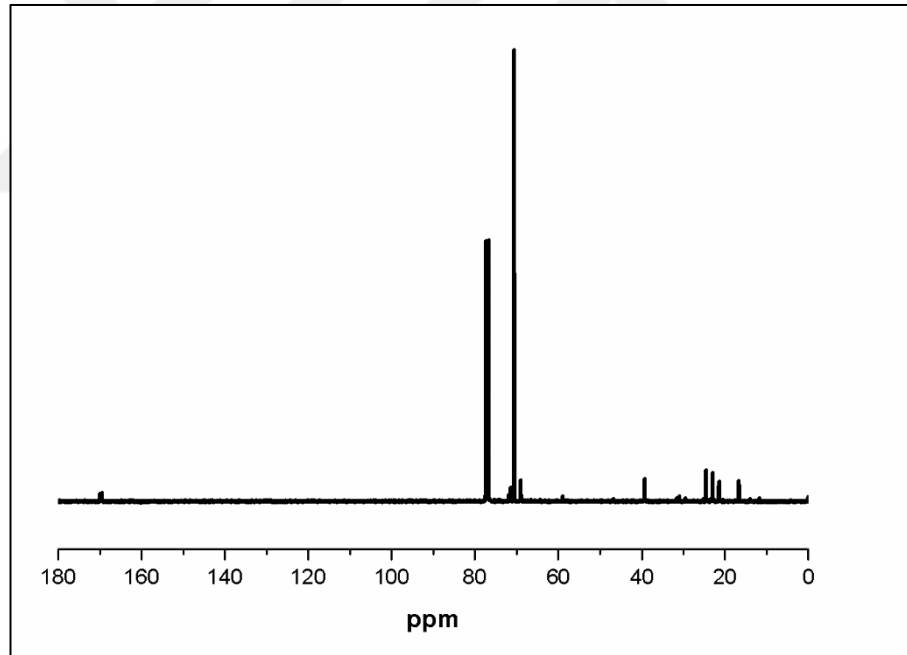
Şekil B.1. 4 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



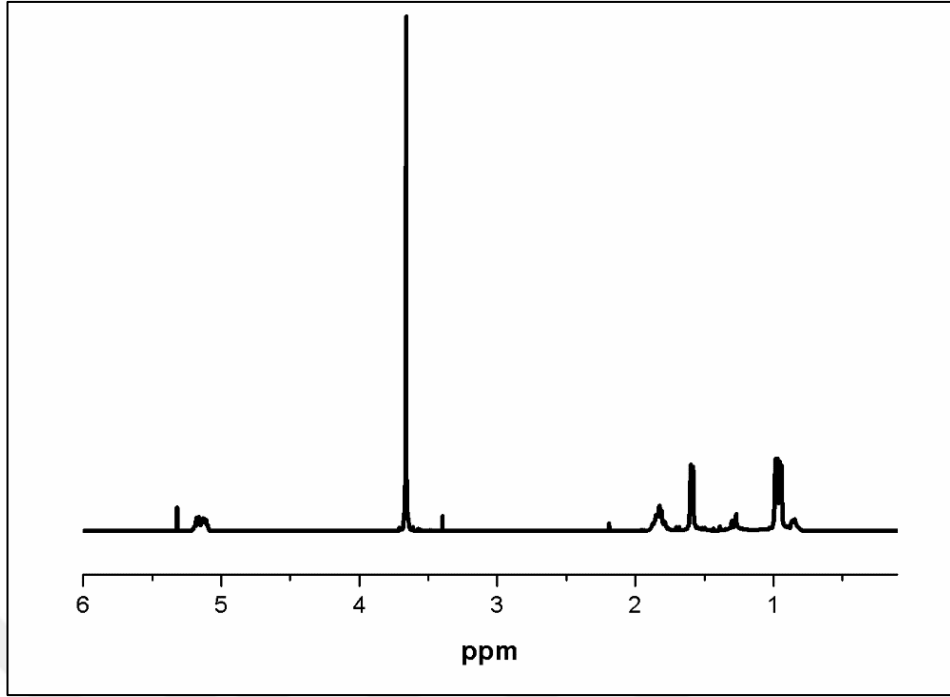
Şekil B.2. 4 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



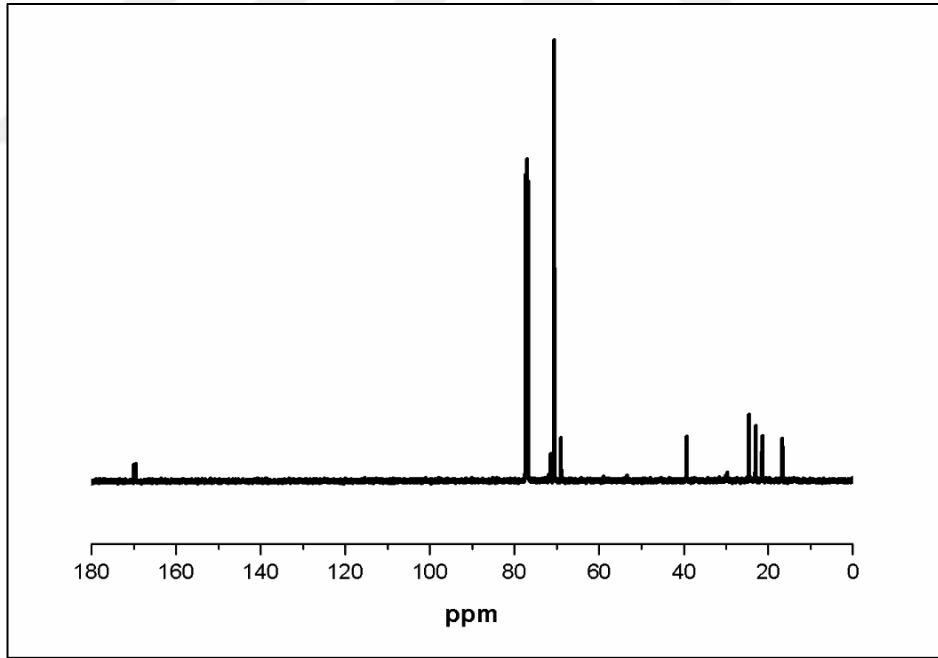
Şekil B.3. 5 bileşiminin ¹H-NMR spektrumu



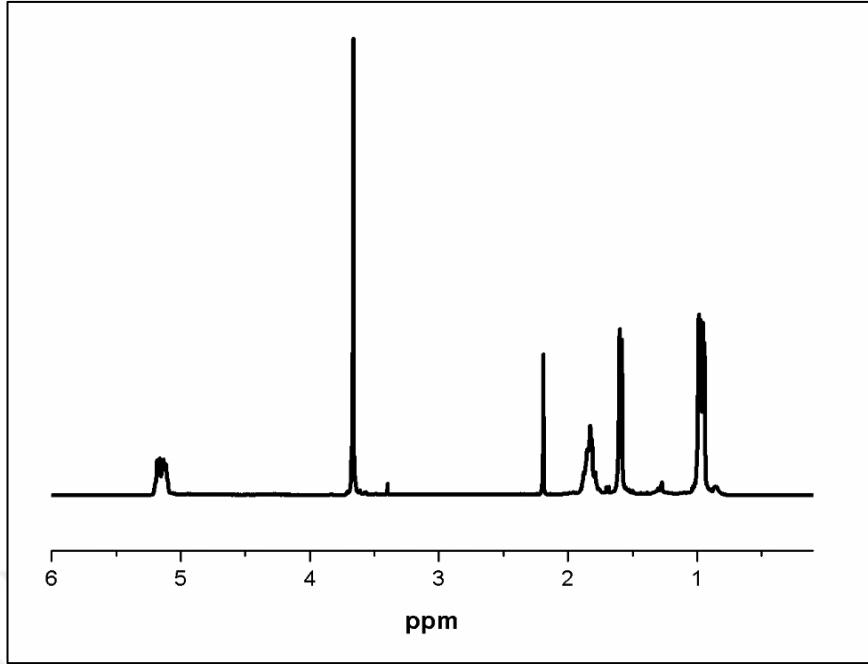
Şekil B.4. 5 bileşiminin ¹³C-NMR spektrumu



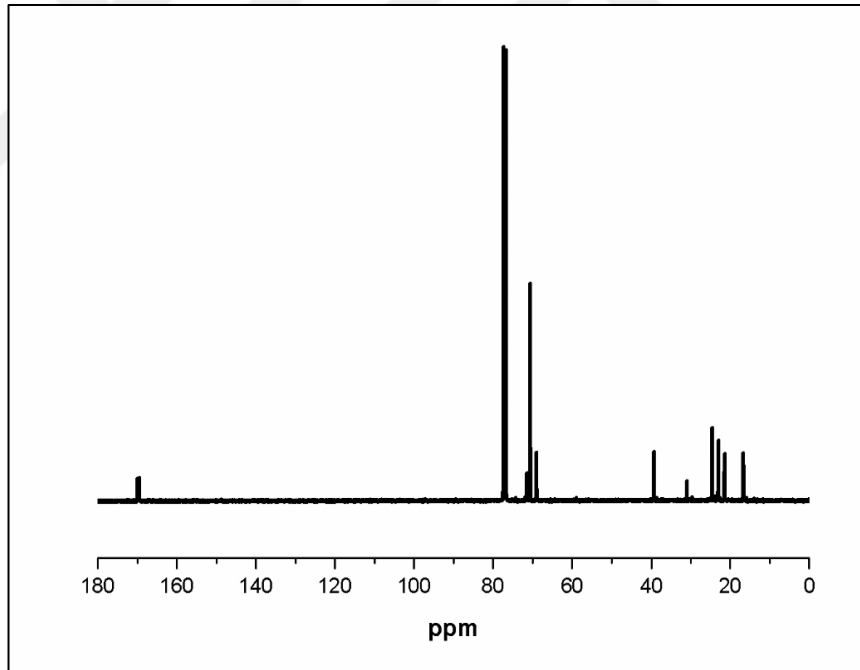
Şekil B.5. 7 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



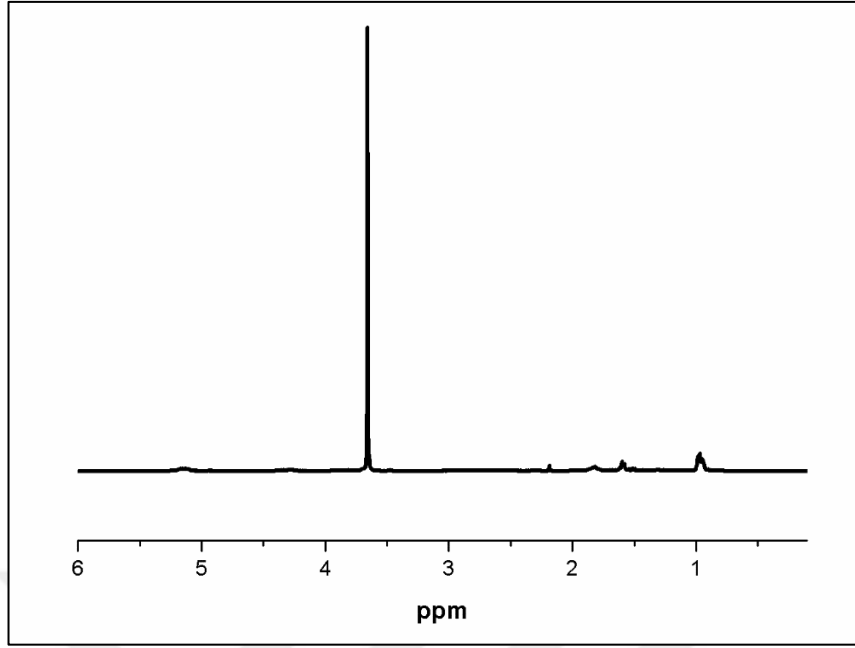
Şekil B.6. 7 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



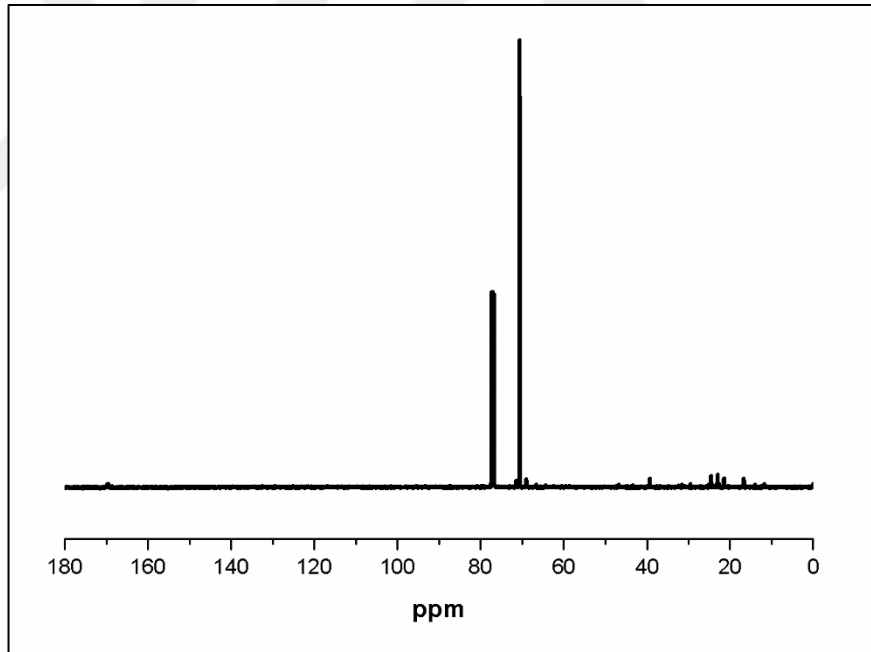
Şekil B.7. 8 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



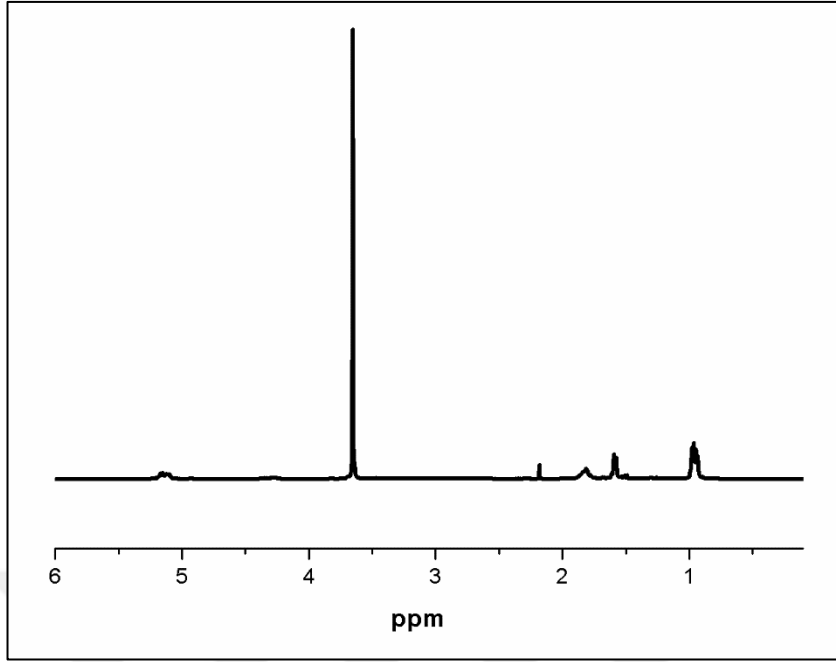
Şekil B.8. 8 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu



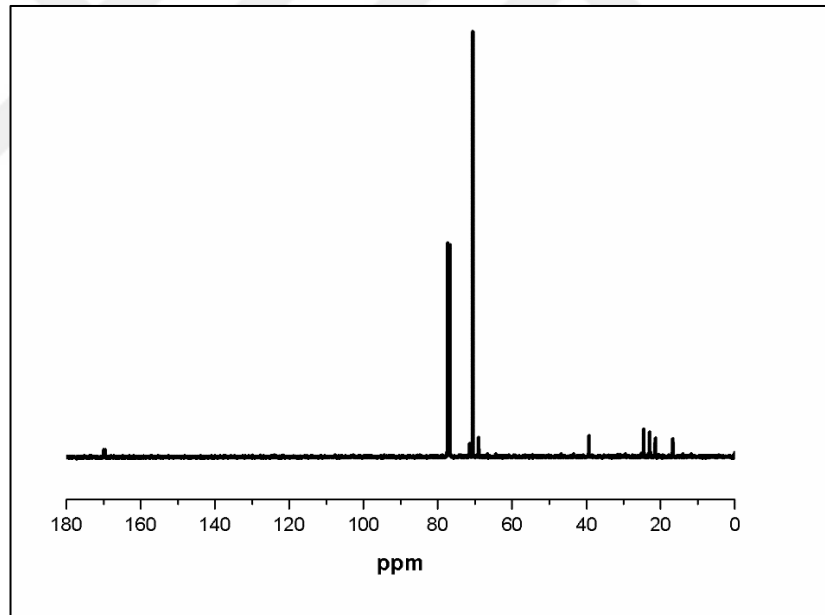
Şekil B.9. 9 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



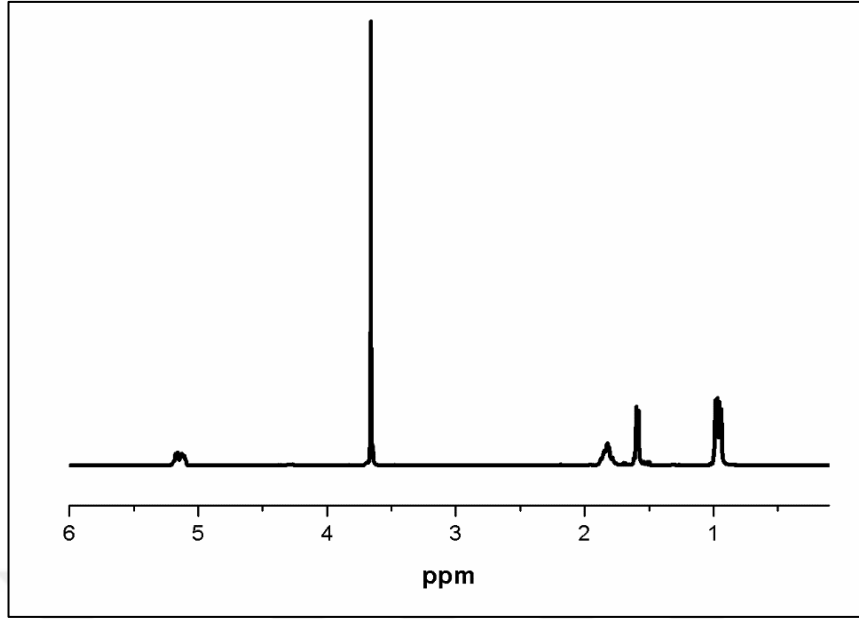
Şekil B.10. 9 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu



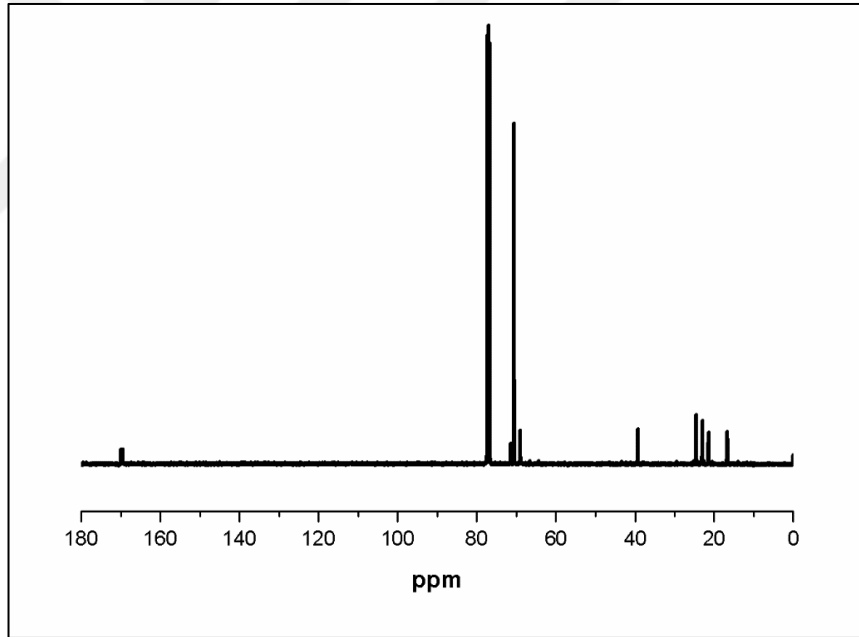
Şekil B.11. 10 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil B.12. 10 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

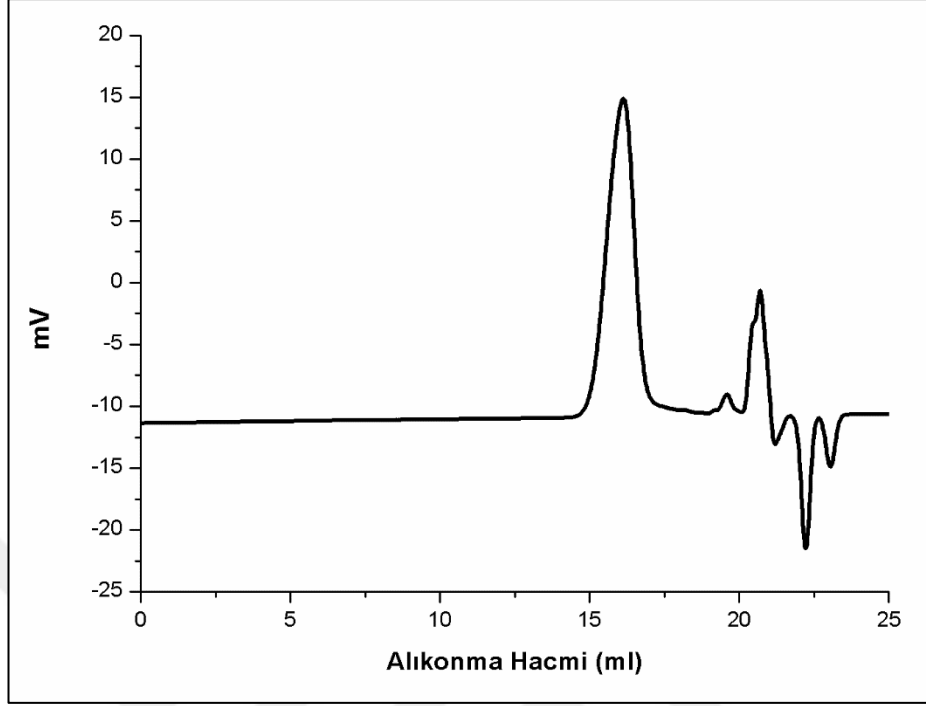


Şekil B.13. 12 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil B.14. 12 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

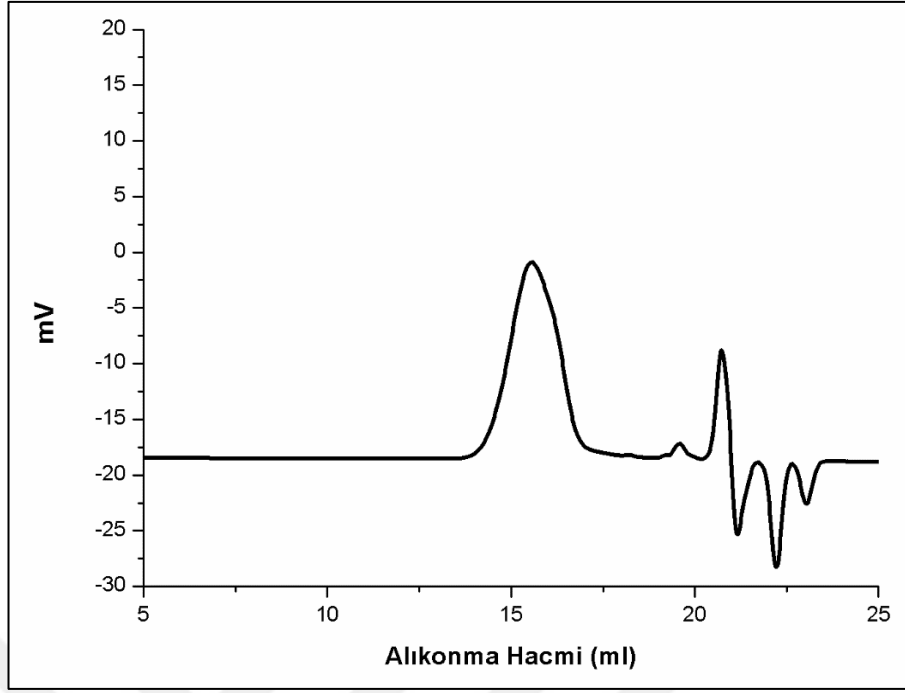
Ek-C GPC KROMATOGRAMLARI



Şekil C.1. 4 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.1. 4 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

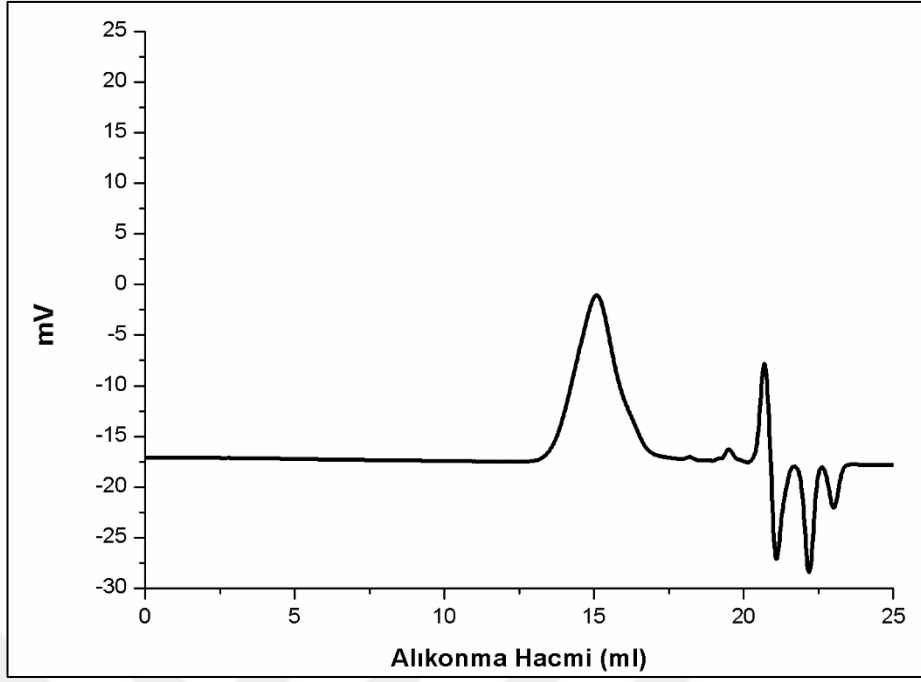
Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	16,1	97,1
2	19,6	2,9



Şekil C.2. 5 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.2. 5 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

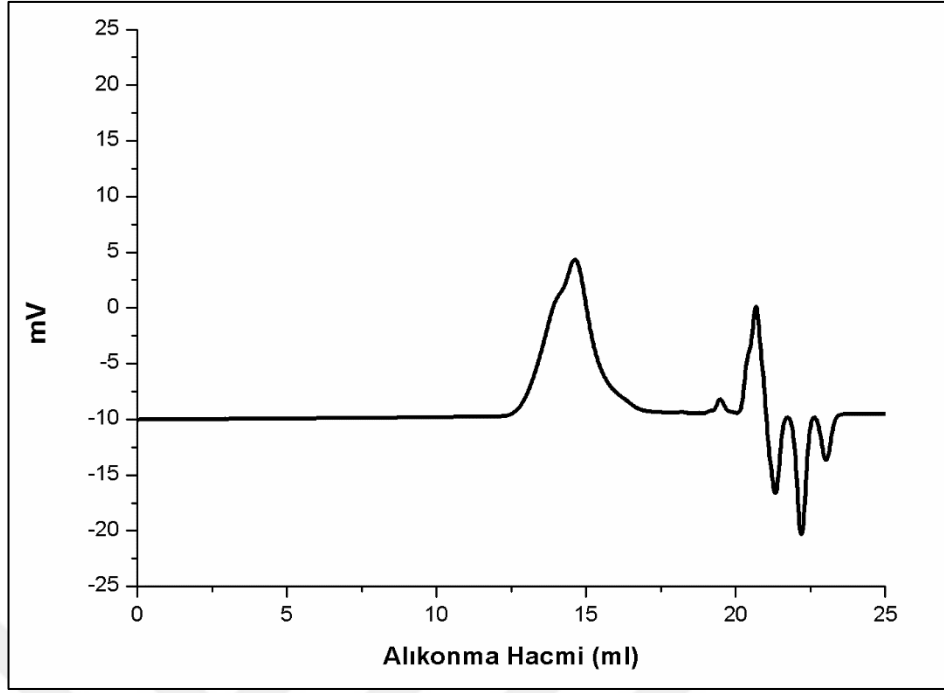
Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	15,5	97,1
2	19,6	2,9



Şekil C.3. 7 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.3. 7 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

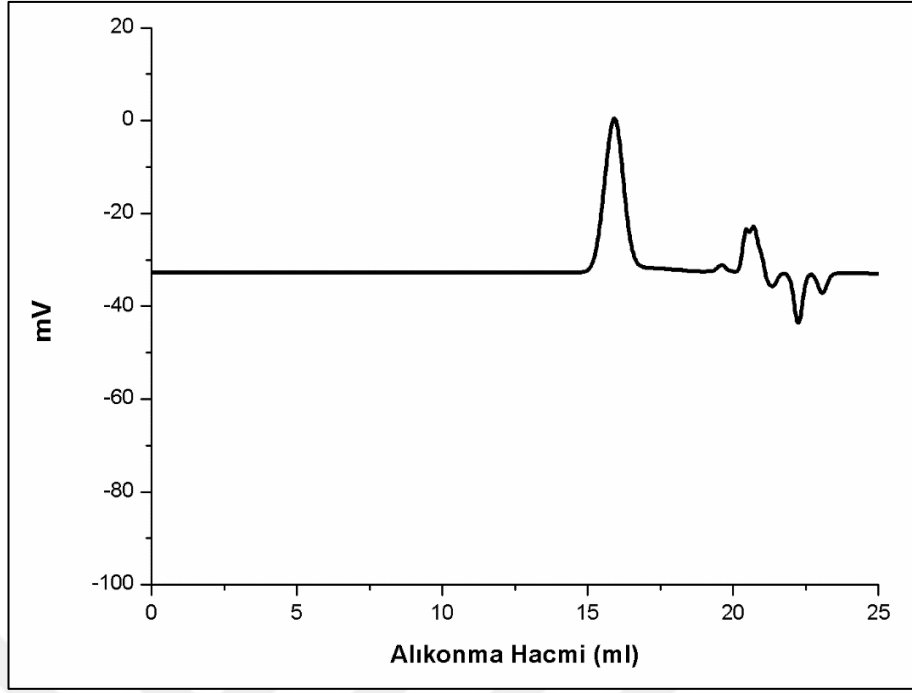
Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	15,1	97,5
2	19,5	2,5



Şekil C.4. 8 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.4. 8 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

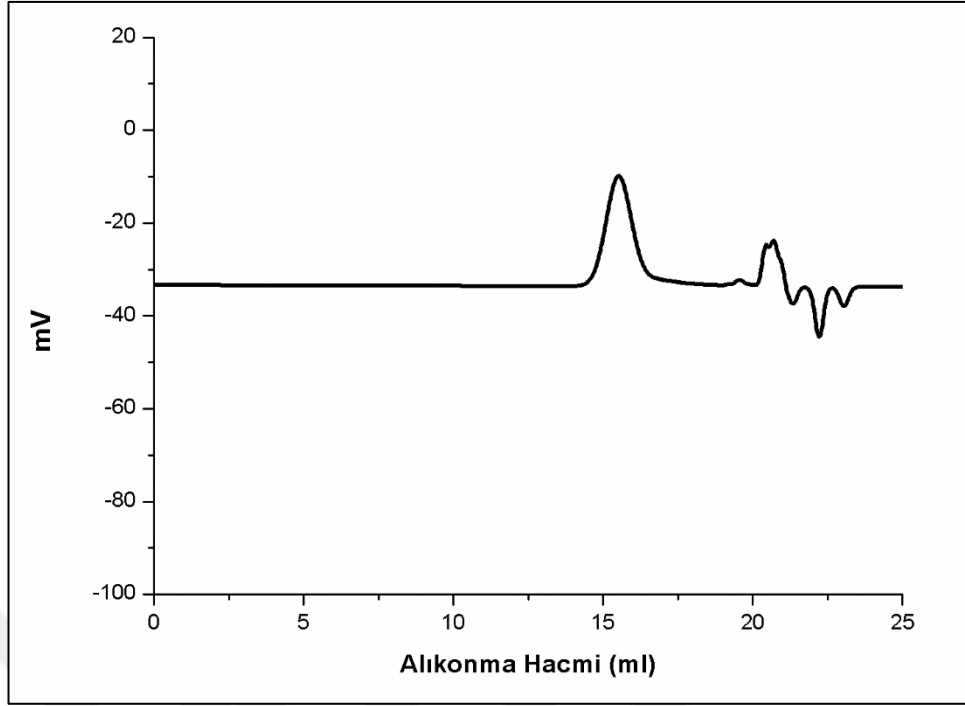
Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	14,6	97,5
2	19,5	2,5



Şekil C.5. 9 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.5. 9 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

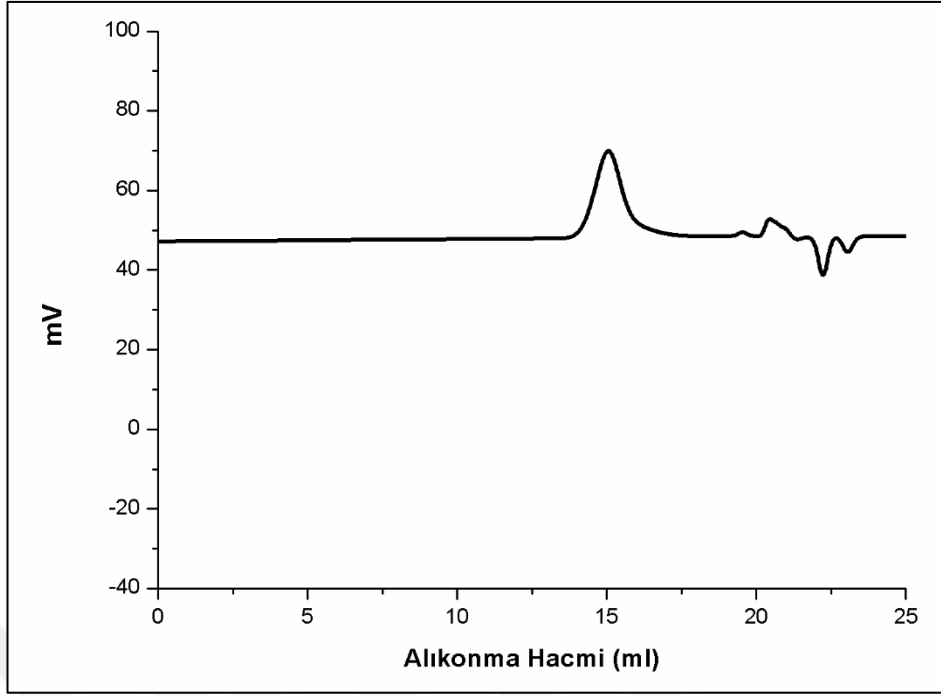
Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	15,9	97,2
2	19,6	2,8



Şekil C.6. 10 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.6. 10 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	15,5	97,1
2	19,5	2,9



Şekil C.7. 12 bileşiğinin GPC kromatogramı

Tablo C.7. 12 bileşiği için GPC kromatogramı değerleri

Pik	Alıkonma Hacmi (mL)	Alan (%)
1	15,0	97,4
2	19,5	2,6

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

- [1] **Çetin D.**, Arıcan M. O., Doğancı E., Olgaç N., Görür M., Yılmaz F., Mert O., The Stabilization of Camptothecin Anticancer Drug via Phosphazene Cored and Mikroarm Star-Shaped Polymeric Nanocarriers, *46th IUPAC World Polymer Congress*, İstanbul, Türkiye, 17-21 Temmuz 2016.
- [2] **Çetin D.**, Mert O., Lokal İlaç Salım Sistemleri İçin Enjekte Edilebilir ve Isıya Hassas Poli (izobütül metil glikolid)-PEG Hidrojellerinin Sentezi ve Özellikleri, *8. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi*, İstanbul, Türkiye, 16-18 Mayıs 2017.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Hakkari’de doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini İstanbul’a bağlı Ümraniye ilçesi’nde tamamladı. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde başladığı üniversite eğitimini 2015 yılında tamamladı. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

