**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

# DİOSGENİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN VE POLİMERLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİKANSER ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

**SEVİNÇ İLKAR ERDAĞI**

**KOCAELİ 2019**

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

# DİOSGENİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN VE POLİMERLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİKANSER ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

SEVİNÇ İLKAR ERDAĞI

**Prof.Dr. Ufuk YILDIZ**
**Danışman, Kocaeli Üniv.** .....

**Doç.Dr. Olcay MERT**
**Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.** .....

**Doç.Dr. Oğuzhan İLGEN**
**Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.** .....

**Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU**
**Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.** .....

**Prof.Dr. Uğursoy OLGUN**
**Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.** .....

**Tezin Savunulduğu Tarih: 19.09.2019**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez kapsamında bir spirostan bileşiği olan diosgenin kullanılarak yeni türev bileşiklerin ve polimerlerin sentezi gerçekleştirildi. İnsana ait sağlıklı ve kanser hücrelerine karşı in vitro ortamlarda biyolojik değerlendirilmeleri yapıldı. Bu çalışmada sentezlenen türev bileşiklerin ve hazırlanan polimerik malzemelerin biyolojik olarak aktif ve uyumlu olmalarından dolayı kanser gibi pek çok hastalığın tedavisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Doktora tezimin başlangıç aşamasında tez konusunu öneren ve bu çalışmayı yapabilmem için gerekli olanakları sağlayan, derin bilgi ve tecrübesiyle her zaman beni destekleyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Cavit UYANIK'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimi devam ettirmem için yaşadığım zor süreçlerde bana her konuda destek olan, çalışmalarım süresince değerli fikirleri ile beni yönlendiren, alternatif bakış açıları sunan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ufuk YILDIZ'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvardaki yoğun deneysel çalışma sürecinde, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Ahmet ERDEM'e ve her daim yalnız olmadığımı hissettiren Dr. Asabuwa N. FAHANWI, Sema IŞIK ve Merve PALA başta olmak üzere bana karşı anlayış ve sabır gösteren ismini yazamadığım tüm arkadaşlarıma ve tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında analiz ve numune hazırlama konusunda cihaz desteği veren değerli hocalarım Doç. Dr. Güralp ÖZKOÇ, Doç. Dr. Olcay MERT ve Doç. Dr. Ümit AY'a, yardımlarını esirgemeyen Mehmet O. ARICAN ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında beni destekleyen TÜBİTAK BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri İçin Doktora Burs Programına teşekkür ederim.

Sadece tez sürecinde değil hayatımın her döneminde yanımda olan, bana her türlü sabır ve anlayışı gösteren başta annem ve babam olmak üzere kardeşlerime ve eşimin ailesine bana inandıkları ve samimi destekleri için binlerce kez teşekkür ederim.

Son olarak bu zorlu sürecimin tüm aşamalarında benimle olan, sabırla her türlü özveride bulunan, sıkıntılarımı paylaşan ve sonsuz desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Erdem ERDAĞI'na teşekkürü bir borç bilirim.

Eylül – 2019 Sevinç İLKAR ERDAĞI

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... i
İÇİNDEKİLER ..... ii
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... vi
TABLOLAR DİZİNİ ..... ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... x
ÖZET ..... xi
ABSTRACT ..... xii
GİRİŞ ..... 1
1. GENEL BİLGİLER ..... 4
1.1. Saponinler ..... 4
1.1.1. Sapogeninler ..... 6
1.1.2. Spirostanlar ..... 7
1.1.3. Diosgenin ..... 7
1.1.3.1. Diosgenin ile ilgili yapılan çalışmalar ..... 9
1.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler ..... 17
1.2.1. Polimerik miseller ..... 18
1.2.2. Polimerik nanopartiküller ..... 19
1.2.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimerler ..... 21
1.2.3. Pickering emülsiyonu ..... 24
2. MALZEME VE YÖNTEM ..... 27
2.1. Kullanılan Kimyasallar ..... 27
2.2. Deneysel Yöntem ..... 29
2.2.1. A halkasındaki reaksiyonlar ..... 29
2.2.1.1. Bileşik 1'in sentezi ..... 29
2.2.1.2. Bileşik 2'nin sentezi ..... 30
2.2.1.3. Bileşik 3'ün sentezi ..... 31
2.1.1.4. Bileşik 4'ün sentezi ..... 32
2.2.1.5. Bileşik 5'in sentezi ..... 33
2.2.1.6. Bileşik 6'nın sentezi ..... 34
2.2.1.7. Bileşik 7'nin sentezi ..... 34
2.2.1.8. Bileşik 8'in sentezi ..... 35
2.2.1.9. Bileşik 9'un sentezi ..... 35
2.2.2. B halkasındaki reaksiyonlar ..... 36
2.2.2.1. Bileşik 10'un sentezi ..... 36
2.2.2.2. Bileşik 11'in sentezi ..... 38
2.2.2.3. Bileşik 12'nin sentezi ..... 38
2.2.2.4. Bileşik 13'ün sentezi ..... 39
2.2.2.5. Bileşik 14'ün sentezi ..... 41
2.2.2.6. Bileşik 15'in sentezi ..... 42
2.2.2.7. Bileşik 16'nın sentezi ..... 42
2.2.2.8. Bileşik 17'in sentezi ..... 43
2.2.2.9. Bileşik 18'in sentezi ..... 43

2.2.2.10. Bileşik 19'un sentezi ..... 44
2.2.2.11. Bileşik 20'nin sentezi ..... 45
2.2.2.12. Bileşik 21'in sentezi ..... 45
2.2.2.13. Bileşik 22'nin sentezi ..... 46
2.2.2.14. Bileşik 23'ün sentezi ..... 47
2.2.2.15. Bileşik 24'ün sentezi ..... 47
2.2.2.16. Bileşik 25'in sentezi ..... 48
2.2.2.17. Bileşik 26'nın sentezi ..... 48
2.2.2.18. Bileşik 27'nin sentezi ..... 50
2.2.3. F halkasındaki reaksiyonlar ile türevlerin sentezi ..... 50
2.2.3.1. Bileşik 28'in sentezi ..... 50
2.2.3.2. Bileşik 29'un sentezi ..... 51
2.2.3.3. Bileşik 30'un sentezi ..... 52
2.2.3.4. Bileşik 31'in sentezi ..... 52
2.2.4. Hetero halkalı diosgenin türevlerinin hazırlanması ..... 53
2.2.4.1. Bileşik 32'nin sentezi ..... 53
2.2.4.2. Bileşik 33'ün sentezi ..... 55
2.2.4.3. Bileşik 34'ün sentezi ..... 56
2.2.4.4. Bileşik 35'in sentezi ..... 57
2.2.4.5. Bileşik 36'nın sentezi ..... 57
2.2.5. Polimerik miselin hazırlanması ..... 59
2.2.5.1. Monokarboksilik uçlu mPEG sentezi (mPEG COOH) ..... 59
2.2.5.2. mPEG-Diosgenin konjugatının sentezi (mPEG-DGN)..... ..... 59
2.2.5.3. Kurkumin mono alkin sentezi (CMA) ..... 60
2.2.5.4. Kurkumin mono alkin bağlı mPEG-DGN sentezi (mPEG-DGN-CUR) ..... 60
2.2.5.5. Polimerik misellerin hazırlanması ..... 61
2.2.5.6. Kritik misel konsantrasyonu ..... 61
2.2.6. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ..... 61
2.2.6.1. M1-PCL sentezi ..... 61
2.2.6.2. M2-PCL sentezi ..... 62
2.2.6.3. M3-PCL sentezi ..... 62
2.2.6.4. M4-PCL sentezi ..... 64
2.2.6.5. M1-PCL-MPEG sentezi ..... 64
2.2.6.6. M2-PCL-MPEG sentezi ..... 65
2.2.6.7. M3-PCL-MPEG'in sentezi ..... 65
2.2.6.8. M4-PCL-MPEG sentezi ..... 66
2.2.6.9. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ..... 66
2.2.6.10. Nanopartiküllerin kararlılığı ve optimizasyonunun belirlenmesi ..... 67
2.2.6.11. Kapsülleme verimliliği ve ilaç yükleme kapasitesinin belirlenmesi ..... 68
2.2.6.12. Nanopartiküllerden in vitro ilaç salımı ..... 68
2.2.7. Pickering emülsiyonlarının hazırlanması ..... 69
2.2.7.1. Nano kristalin selülozun hazırlanması ..... 69
2.2.7.2. NS veriminin ve çözünürlüğünün belirlenmesi ..... 70
2.2.7.3. NS'nin desülfasyonu ..... 70

2.2.7.4. Kuaternize-nano selüloz sentezi ..... 70
2.2.7.5. Diosgenin konjuge aljinat (DGN-ALG) hazırlanması ..... 71
2.2.7.6. Nanoemülsiyonların hazırlanması ve optimizasyonu ..... 72
2.2.7.7. Çok katmanlı Pickering emülsiyonlarının hazırlanması ..... 72
2.2.7.8. Emülsiyon kararlılığı ve damlacık büyüklüğü üzerine etkilerin incelenmesi ..... 73
2.2.7.9. İlaç kapsülleme ve yük içeriğinin belirlenmesi ..... 74
2.2.7.10. PE sistemlerinde ilaç kararlılığı ve ilacın in vitro salım çalışmaları ..... 74
2.2.7.11. Bulanıklık ve kritik toplanma konsantrasyon analizi ..... 75
2.2.7.12. Kremleşme indeksi ölçümleri ..... 75
2.2.8. Karakterizasyon metodları ..... 76
2.2.8.1. İn vitro sitotoksisite çalışması ..... 77
2.2.9. İstatistiksel analiz ..... 78
3. BULGULAR VE TARTIŞMA ..... 79
3.1. A-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türev Bileşiklerin Sentezi ..... 79
3.2. B-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türev Bileşiklerin Sentezi ..... 88
3.3. F-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türevlerin Sentezi ..... 101
3.4. Heterohalkalı Türev Bileşiklerin Sentezi ..... 105
3.5. Polimerik Miselin Hazırlanması ..... 109
3.5.1. mPEG-Diosgenin-Kurkumin sentezi ve yapısal karakterizasyonu ..... 109
3.5.2. Termal özellikleri ..... 113
3.5.3. UV–Vis ve Floresans Deneyleri ..... 114
3.5.4. Sıvı Kristal Özellikleri ..... 118
3.5.5. Polimerik miselin oluşumu ve karakterizasyonu ..... 118
3.5.6. İn vitro sitotoksisite ve anti-kanser çalışmaları ..... 120
3.6. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ..... 122
3.6.1. Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu ..... 122
3.6.2. İlaç yüklü polimerik nanopartiküllerinin hazırlanması ..... 123
3.6.3. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ..... 126
3.6.3.1. Çalışma parametrelerinin partikül büyüklüğüne etkisi ..... 127
3.6.3.2. İlaç yüklü NP'lerin partikül büyüklüğü, boyut dağılımı ve zeta potansiyeli ..... 129
3.6.4. Nanopartiküllerin yüzey karakterizasyonu ve stabilitesi ..... 129
3.6.4.1. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ..... 129
3.6.4.2. Nanopartiküllerin kararlılığı ..... 130
3.6.5. İlaç yükleme ve nanopartiküllerin kapsülleme etkinliği ..... 132
3.6.6. İn vitro ilaç salım çalışmaları ..... 133
3.6.7. İn vitro sitotoksisite çalışmaları ..... 134
3.7. Pickering Emülsiyonlarının Hazırlanması ..... 136
3.7.1. Emülsiyon hazırlanması ve optimizasyonu ..... 136
3.7.1.1. Nanoemülsiyonların formülasyonu ..... 136
3.7.1.2. PE sistemlerinin hazırlanması ..... 138
3.7.2. Emülsiyon kararlılığının değerlendirilmesi ..... 139
3.7.2.1. İyonik kuvvet ..... 139
3.7.2.2. Depolama süresi ..... 139

3.7.2.3. Isıl işlem ..... 140
3.7.2.4. Biyopolimer konsantrasyonu ..... 140
3.7.3. İlacın yüklenmesi ve kapsülasyonun belirlenmesi ..... 141
3.7.4. Karakterizasyon teknikleri ..... 142
3.7.4.1. Bulanıklık ve CAC analizi ..... 142
3.7.4.2. Kremleşme indeksi analizi ..... 143
3.7.4.3. POM ve TEM analizi ile morfolojik karakterizasyon ..... 145
3.7.4.4. Yapısal Analiz ..... 146
3.7.5. Pickering emülsiyonunda ilacın kararlılığı ..... 148
3.7.6. Picking emülsiyonundan quinalizarinin in vitro salımı ..... 149
3.7.7. İn vitro hücresel alım ve sitotoksisite çalışmaları ..... 150
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 155
KAYNAKLAR ..... 158
EKLER ..... 170
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER ..... 210
ÖZGEÇMİŞ ..... 212

## ŞEKİLLER DİZİNİ


Şekil 1.1. Soya fasulyesinden alınmış tipik bir saponin yapısı ..... 5
Şekil 1.2. Saponinlerin sınıflandırılması ..... 6
Şekil 1.3. C-25'deki pozisyona göre stereo izomer çiftleri ..... 8
Şekil 1.4. Diosgeninin kimyasal yapısı ..... 9
Şekil 1.5. Diosgeninden Certonardosterol D2 eldesi ..... 9
Şekil 1.6. Diosgeninin hedef moleküle kenetlenme şematik gösterimi ..... 10
Şekil 1.7. Bir kanser kemo-önleyici madde olarak diosgeninin hücresel düzeyde olası etki mekanizmalarının şematik gösterimi ..... 10
Şekil 1.8. Diosgenin içeren yan zincir sıvı kristal poli-karbonatlar ..... 12
Şekil 1.9. mPEG-DGN'ın sentezi (A), anti kanser ilacın taşınması (B) ve zamanla tümöre etkisi (C) ..... 13
Şekil 1.10. Hücre içi gen nakli için siRNA ve pDNA taşıyıcıları olarak diosgenin içeren nanopartiküllerinin hazırlanması ..... 14
Şekil 1.11. Supramoleküler sistemin hazırlanması (A) ve misel oluşumu gösterimi (B) ..... 15
Şekil 1.12. Tromboz tedavisi için in vivo ilaç salımının şematik gösterimi ..... 16
Şekil 1.13. Sekiz kollu polietilen glikol diosgenin ve HCPT taşıyan nanopartikül sentezi ..... 17
Şekil 1.14. Polimerik miselin şematik gösterimi ..... 18
Şekil 1.15. Polimerik nanopartiküllerin sentezlenmesi için yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımlar ..... 20
Şekil 1.16. Nanoküre ve nanokapsül gösterimi ..... 21
Şekil 1.17. Polikaprolakton (a) ve poli (etilen glikol)'ün (b) yapısı ..... 22
Şekil 1.18. Yağ/su klasik emülsiyonu ve yağ/su Pickering emülsiyonu şematik gösterimi ..... 25
Şekil 1.19. Emülsiyon damlacıklarının katı parçacıklarla stabilizasyonunun şematik gösterimi ..... 26
Şekil 2.1. 3-Keto A-Nor-spirostanın sentezi ..... 29
Şekil 2.2. A halkasındaki reaksiyon ile türev maddelerin ve 2-Keto A-Nor-spirostanların sentezi ..... 37
Şekil 2.3. B-Nor-spirostanın sentezi ..... 40
Şekil 2.4. B halkasındaki reaksiyonlar ile türev bileşiklerin sentezi ..... 49
Şekil 2.5. B halkasındaki reaksiyonlar ile diğer türev bileşiklerin sentezi ..... 54
Şekil 2.6. F halkasındaki reaksiyonlar ile türev bileşiklerin sentezi ..... 55
Şekil 2.7. Hetero halkalı türev bileşiklerin sentezi ..... 58
Şekil 2.8. mPEG-DGN-CUR sentezi (a) ve polimerik miselin hazırlanması şematik gösterimi (b) ..... 63
Şekil 2.9. M-PCL-MPEG polimerlerinin sentezi ..... 66
Şekil 2.10. Polimerik NP'lerin hazırlanmasının şematik gösterimi ..... 67
Şekil 3.1. Bileşik 1'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 80
Şekil 3.2. Bileşik 2'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 81
Şekil 3.3. Bileşik 3'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 82
Şekil 3.4. Mc Murry reaksiyonunun gösterimi ..... 83

Şekil 3.5. Mc Murry reaksiyonu mekanizması ..... 84
Şekil 3.6. Bileşik 4'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 84
Şekil 3.7. Bileşik 5'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 85
Şekil 3.8. Bileşik 6'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 86
Şekil 3.9. Bileşik 7'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 87
Şekil 3.10. Bileşik 8'in DMSO-$d_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 88
Şekil 3.11. Bileşik 9'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 89
Şekil 3.12. Bileşik 10'nun $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 89
Şekil 3.13. Bileşik 11'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 90
Şekil 3.14. Bileşik 12'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 91
Şekil 3.15. Bileşik 13'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 92
Şekil 3.16. Bileşik 14'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 93
Şekil 3.17. Bileşik 15'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 94
Şekil 3.18. Bileşik 16'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 94
Şekil 3.19. Bileşik 18'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 95
Şekil 3.20. Bileşik 19'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 96
Şekil 3.21. Bileşik 20'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 97
Şekil 3.22. Bileşik 21'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 98
Şekil 3.23. Bileşik 22'nin $\delta_5$-piridinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 98
Şekil 3.24. Bileşik 24'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 99
Şekil 3.25. Bileşik 25'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 100
Şekil 3.26. Bileşik 26'nın $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 101
Şekil 3.27. Bileşik 27'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 102
Şekil 3.28. Bileşik 28'in DMSO-$\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 102
Şekil 3.29. Bileşik 29'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 103
Şekil 3.30. Bileşik 30'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 104
Şekil 3.31. Bileşik 31'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 105
Şekil 3.32. Bileşik 32'nin DMSO- $\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 106
Şekil 3.33. Bileşik 33'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 107
Şekil 3.34. Bileşik 34'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 107
Şekil 3.35. Bileşik 35'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 108
Şekil 3.36. Bileşik 36'nın DMSO-$\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu ..... 109
Şekil 3.37. (a) mPEG-OH ve (b) mPEG-COOH'a ait FTIR spektrumu ..... 110
Şekil 3.38. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait FTIR spektrumu ..... 111
Şekil 3.39 mPEG-COOH (a) mPEG-DGN (b) ve mPEG-DGN-CUR (c) $^1$H-NMR spektrumları ..... 112
Şekil 3.40. a) mPEG-COOH b) mPEG-DGN c) mPEG-DGN-CUR GPC kromatogramları ..... 113
Şekil 3.41. Polimerlere ait ikinci ısıtmadaki DSC termogramları ..... 114
Şekil 3.42. Polimerlere ait TGA spektrumu ..... 115
Şekil 3.43. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait absorpsiyon ve floresans spektrumu ..... 117
Şekil 3.44. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait farklı çözücülerdeki absorpsiyon ve floresans spektrumu ..... 117
Şekil 3.45. mPEG-DGN-CUR bileşiğine gün ışığı-uv lamba altında gösterimi ..... 118
Şekil 3.46. a) DGN-$N_3$, b) mPEG-DGN ve c) mPEG-DGN-CUR POM yapıları ..... 118

Şekil 3.47. Parçacık büyüklüğü dağılımı (a), floresan yoğunluğunun logC karşı grafiği (b) ve mPEG-DGN-CUR TEM görüntüleri..... 120
Şekil 3.48. Konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısı. (a) insan fibroblast hücreleri ve (b) meme kanseri hücreleri (MCF-7)..... 121
Şekil 3.49. a) mPEG-COOH b) M4-PCL c) M4-PCL-MPEG GPC kromatogramları..... 123
Şekil 3.50. M4 (a), M4-PCL (b), M4-PCL-MPEG $^{1}$H-NMR ve M4, M4-PCL-MPEG, ilaç ve ilaç yüklü nanopartiküllerin FTIR (d) spektrumlar..... 123
Şekil 3.51. M4-PCL ve M4-PCL-MPEG'nin DSC ve TGA termogramları yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu..... 128
Şekil 3.52. a) DCM fazındaki polimer konsantrasyonu (2.5 mL), b) Sulu faz/Organik faz oranı (%), c) PVA konsantrasyonu (%), d) ITB yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu..... 130
Şekil 3.53. A) M4-NP B) M4-ITB-NP (200 büyütme) C) M4-ITB-NP (100 büyütme) TEM görüntüleri D) M4-ITB-NP'nin partikül büyüklüğü kararlılığı..... 131
Şekil 3.54. Nanopartiküllerin 30 gün sonra görüntüsü ($^{*}$dondurularak kurutma sonra)..... 132
Şekil 3.55. M4-DGN ve ITB yüklü M4-DGN NP'lerin 37 °C'de PBS'de ilaç salım profilleri (a: DGN ve b: ITB)..... 134
Şekil 3.56. Farklı DGN ve ITB konsantrasyonları ile ITB, DGN, M4-NP ve M4-ITB-NP ile muamele edilmiş L929 hücrelerinin (a), MCF-7 (b), SAOS-2 (c) ve K562 (d) hücrelerinin hücre canlılığı..... 137
Şekil 3.57. (a) Üçlü faz diyagramı, b) NE'lerin damlacık boyut dağılımı..... 139
Şekil 3.58. DGN-ALG (a), Q-NS (b) ve yüklü olmayan (i) ve yüklü (ii) ilaç emülsiyonu için çok katmanlı PE'lerin şematik gösterimi (c)..... 140
Şekil 3.59. (a) NaCl konsantrasyonu, (b) saklama süresi, (c) ısıl işlem ve (d) anyonik biyopolimer konsantrasyonunun formüle edilen PE'ler..... 142
Şekil 3.60. (a) (i) bulanıklık ölçümleri ve (ii) formüle edilmiş NE ve PE'ler için bulanıklık artışları, (b) (iii) PE-ALG ve (iv) PE-ALG-DGN için logC'ye karşı şiddet oranı ($I_{366}/I_{385}$)..... 145
Şekil 3.61. (a) Emülsiyon kremleşme katmanını gösteren optik görüntüler ve (b) Pickering emülsiyonları için zamanın bir fonksiyonu olarak bir kremleşme indeksi grafiği..... 146
Şekil 3.62. PE-ALG (a ve e), PE-DGN-ALG (c ve g), yüklü PE-ALG (b ve f) ve yüklü PE-DGN-ALG için POM (yukarı) ve TEM (aşağı) görüntüleri (d ve h)..... 147
Şekil 3.63. Diosgenin (a), aljinat (b) ve DGN-ALG (c)'nin FTIR spektrumları..... 148
Şekil 3.64. Aljinat (a) ve DGN-ALG (b)'nin $^{1}$H-NMR spektrumları..... 149
Şekil 3.65. (a) PE sisteminde quinalizarin kararlılığı ve (b) 37 °C'de PBS pH 7.4'te PE'lerden ilacın in vitro salım profilleri..... 151
Şekil 3.66. CLSM görüntüleri. İlaç yüklü PE-ALG (a, c, e), İlaç yüklü PE-DGN-ALG (b, d, f)..... 152
Şekil 3.67. (a) Fibroblast (b) MCF-7, (c) A549 ile inkübe edildikten sonra PE'lerin ve serbest ilaçların hücre canlılığı ve (d) MCF-7 ve A549 hücreleri için zamana bağlı hücre canlılığı (veriler ortalama ± SD (n= 3) ve P< 0.05 olarak gösterilmiştir)..... 155

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sentez, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler ..... 28
Tablo 3.1. Polimerlere ait GPC sonuçları ..... 113
Tablo 3.2. mPEG-DGN-CUR polimerlerinin termal özellikleri ..... 114
Tablo 3.3. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait absorpsiyon ve emisyon değerler ..... 116
Tablo 3.4. Sıvı kristal polimerlere ait faz geçiş sıcaklıkları ..... 119
Tablo 3.5. Sentezlenen polimerlerin moleküler ağırlık ve bozunma sıcaklıkları ..... 123
Tablo 3.6. Formüller ve ITB yüklü NP'lerin DLS sonuçaları* ..... 129
Tablo 3.7. 24 saat sonra nanopartiküllerin çeşitli pH'larda stabilitesi ..... 132
Tablo 3.8. Nanopartiküllerin kapsülleme verimliliği ve ilaç yükleme yüzdesi ..... 133
Tablo 3.9. İn vitro sitotoksisite analizi ($IC_{50}$, µg/mL) ..... 136
Tablo 3.10. NE'lerin formülasyonu için deneysel çalışmalar ..... 138
Tablo 3.11. PE'lerin ve serbest ilaçların 72 saat inkübasyon sonrası MCF-7 ve A549 hücrelerine karşı $IC_{50}$ değerleri ..... 155

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Centigrade degrees (Santigrat derece)
λ : Dalga boyu, (nm)
$CDCl_3$ : Dötöro kloroform
d : Dublet (ikili)
cm : Santimetre
g : Gram
J : Joule
ε-CL : ε-Kaprolakton
δ : Kimyasal kayma
q : Kuartet (dörtlü)
ml : Mililitre
mmol : Milimol
nm : Nanometre
ppm : Parts per million (milyonda bir)
$\overline{M_n}$ : Sayıca ortalama molekül ağırlığı
s : Singlet (tekli)
t : Triplet (üçlü)

### Kısaltmalar

ANOVA : Analysis of Variance (Varyans Analizi)
CMC : Critical Micelle Concentration (Kritik Misel Konsantrasyonu)
CI : Combination Index (Kombinasyon İndeksi)
DLS : Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
DS : Degree of Substitution (Substitüsyon Derecesi)
DSC : Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
FTIR : Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)
GPC : Gel Permeation Chromatography (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)
İTK : İnce Tabaka Kromatografisi
KI : Kremleşme İndeksi
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans
O/W : Oil in Water (Su içinde Yağ)
PSD : Particle Size Distribution (Partikül Boyutu Dağılımı)
PBS : Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PCL : Polycaprolactone (Polikaprolakton)
PDI : Polydispersity Index (Polidispersite indeksi)
PVA : Poly (vinyl alcohol) (Poli (vinil alkol))
TGA : Termal Gravimetrik Analiz
UV-vis : UV-visible Spectrophotometer (UV-görünür Spektrofotometre)
POM : Polarize Optik Mikroskop

**DİOSGENİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN VE POLİMERLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİKANSER ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI**

## ÖZET

Bu tez çalışması iki ana bölümden oluşmakta olup, birinci kısım bir spirostan bileşiği olan diosgeninden yeni türev bileşiklerinin ve polimerlerinin sentezlenmesini ve yapılarının aydınlatılarak özelliklerinin incelenmesini kapsamaktadır. İkinci kısım ise, hazırlanan diosgenin içeren sistemlerin biyolojik ortamlara in vitro olarak uygulanmasını içermektedir. Geliştirilen spirostan türevlerinin, spirostanlar ile ilgili temel araştırmalara katkı sağlamasının yanı sıra yeni ilaç ve biyo malzeme sentezi için hem akademik hem de endüstriyel laboratuvarlara faydalı olacağı düşünülmektedir. Çalışmada sentezlenen bileşiklerin yapısal karakterizasyonları FTIR, $^{1}$H-NMR ve $^{13}$C-NMR ile yapıldı. Hazırlanan polimerik yapıların fizikokimyasal özellikleri DSC, TGA, POM ve TEM ile belirlendi. Başarılı bir şekilde hazırlanan polimerik nanopartikül ve Pickering emülsiyon sistemlerine anti-kanser özelliği taşıyan ilaçlar yükledi. İlaçların yüklenme kapasitesi ve kapsüllenme verimliliği hesaplandı. Nanopartikül ve emülsiyonlardan ilaç salım çalışmaları in vitro ortamlarda insan fizyolojik sıvıları taklit edilerek yapıldı. Sistemlerin biyouyumluluk ve anti kanser değerlendirmeleri MTT ve WST analiz teknikleri kullanılarak değerlendirildi. Biyouyumluluk çalışmaları için sağlıklı fibroblast hücreleri kullanılırken kanser çalışmaları için insan meme, akciğer, ilik ve kemik kanseri hücreleri seçildi. Kullanılan iki ilaçlı sistemlerin hücreler üzerine olan etkileri zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı yüzdesi olarak değerlendirildi. Aynı zamanda hücresel alım davranışları CLSM kullanılarak izlendi. Bu tez kapsamında sentezlenen türev bileşiklerinin bilim dünyasına ve ilaç sektörüne önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca hazırlanan emülsiyon sistemlerinin kanser tedavisi için iyi birer taşıma ve dağıtma sistemleri olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diosgenin, Pickering Emülsiyonu, Polimerik Misel, Polimerik Nanopartikül, Sitotoksisite.

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DIOSGENIN DERIVATIVE COMPOUNDS AND POLYMERS AND USAGE IN ANTICANCER STUDIES**

## ABSTRACT

This thesis consists of two main chapters, the first part consists of synthesizing new derivative compounds and polymers using diosgenin, as a spirostan compound, and evaluating the properties by enlightening the structure of compounds. The second part consists of in vitro application of prepared diosgenin containing systems in biological mediums. It is thought that the developed spirostan derivatives will contribute to the basic researches about spirostan as well as to be useful for both academic and industrial laboratories for the synthesis of new drugs and biomaterials. Structural characterizations of the synthesized compounds were performed by FTIR, $^{1}$H-NMR, and $^{13}$C-NMR. The physicochemical properties of prepared polymeric structures were determined by DSC, TGA, POM, and TEM. The anti-cancer drugs were loaded to the successfully prepared polymeric nanoparticle and Pickering emulsion systems. The loading capacity and encapsulation efficiency of the drugs were calculated. Drug release studies from nanoparticles and emulsions were performed by mimicking human physiological fluids in vitro. Biocompatibility and anti-cancer evaluations of the systems were evaluated using MTT and WST test techniques. Healthy fibroblast cells were used for biocompatibility studies, and human breast, lung, leukemia, and bone cancer cells were selected for cancer studies. The effects of the two-drug systems on the cells were evaluated as the percentage of cell viability depending on time and concentration. At the same time, cellular uptake behaviors were monitored using CLSM. In this thesis, it is thought that synthesized derivatives will make important contributions to the world of science and the pharmaceutical sector. Furthermore, the prepared polymeric micelle, nanoparticle and Pickering emulsion systems can be considered as good transport and delivery systems for cancer treatment.

**Keywords:** Diosgenin, Pickering Emulsion, Polymeric Micelle, Polymeric Nanoparticle, Cytotoxicity.

## GİRİŞ

Doğal ürünler ilaç keşfedilmesinde her zaman çok önemli ve potansiyel bir rol oynamıştır. Son zamanlarda, özellikle bitkisel kaynaklı bileşikler de dâhil olmak üzere doğal ürünlerin ilaç geliştirme sistemlerinde kullanımına ilgi büyük ölçüde artmıştır [1]. Birçok bilimsel rapor, doğal ürünlerin tedavi edici ve farmakolojik etkilerini göstermektedir. Bu bileşikler arasında bulunan saponinler çeşitli biyolojik aktiviteleri sayesinde dikkat çekmektedirler. Saponinler bazı deniz hayvanlarında ve çeşitli bitki türlerinde bulunan steroidlerin ve triterpenoidlerin glikozitleri olarak bilinmektedir. Özellikle, anti tümör özellikleri nedeniyle tümör tedavilerinde yoğun araştırmalara imkân vermektedir. Bu tür doğal bileşikler diyabet, kanser ve daha pek çok hastalığın tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar [2].

Saponinler yapılarında glikan ve aglikan olmak üzere iki kısım taşırlar. Glikan kısmını glukoz, arabinoz, ksiloz ve glukuronik asit gibi şekerler oluştururken, aglikan kısmını ise, steroidler ve triterpenoidler gibi sapogeninler oluşturur. Sapogeninler, yapısına göre steroidal veya triterpenoidal sapogeninlere ayrılır. Steroidal sapogeninler, ikincil metabolitlerdir, pek çok bitki ve geleneksel tıp ilaçlarının ana bileşenlerinden biri olduklarına inanılır ve gözlenen çoğu biyolojik etkiler için sorumlu olarak gösterilir. Steroidal sapogeninler sınıfını ise kolestan, furostan ve spirostanlar oluşturur. Spirostanların karakteristik yapısal özelliği steroid iskeletine ilave olarak 5 üyeli ve altı üyeli iki halkanın oluşturduğu yan zincire sahip olmasıdır. Bu halkalar hem heterosikliktir hem de bir spiroketal oluşturmak için 22, 26-oksit köprüsü ile kaynaşmışlardır [3].

Diosgenin ağırlıklı olarak tatlı patates, çemen tohumu ve Costus türlerinde bulunan ve doğal olarak meydana gelen bir spirostandır. Diosgenin, ilaç endüstrisinde sentetik steroidlerin yapımında kullanılan ana maddedir [4]. Diosgenin ile yapılan çalışmalarda onun kanser kimyasallarını önleyici ve tedavi edici, iltihap engelleyici, antioksidan ve daha pek çok özellik gösterdiği görülmektedir [5]. Diosgeninin anti kanser etkisi, dönüşüm mekanizmaları, hücre ölümüne neden olma, hücre çoğalmasının bastırılması ve hücre membranı bütünlüğünün bozulması gibi çalışmaları rapor edilmiştir [6].

Diosgenin, güçlü bir hidrofobik yapıya sahip olup kolesterol metabolizmasının kontrolünde de önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar diosgeninin toksikolojik ve farmakokinetik açıdan biyouyumlu ve biyobozunur bir bileşik olduğunu göstermektedir [7]. Doğal ve sentetik polimerlere, ilaç taşıma sistemlerinde kontrollü ve hedefli salımı iyileştiren, biyolojik olarak aktif bileşikler bağlanmaktadır. Biyoaktif bileşiklerin polimerlere bağlanması, hem daha iyi özelliklere sahip yeni biyo-uyumlu formülasyonlar oluşturma hem de verilen ilaçların etkisini arttırma olanağı sunmaktadır. Diosgeninin yeni bir ilaç olarak önem kazanmasının yanında suda zayıf çözünürlük, düşük biyoyararlanım ve nispeten kısa yarı ömür gibi dezavantajları kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, diosgeninin etkinliğini ve biyoyararlanımını arttırmak için, doğal polimerlere bağlanarak nanopartiküllerin ve misellerin hazırlanması da dâhil olmak üzere birçok yaklaşım ele alınmıştır [8, 9].

Bu doktora tezi çalışması, spirostan türevlerinin sentezi ve spirostan içeren polimerlerin hazırlanması, karakterize edilmesi ve biyo uyumluluklarının değerlendirilmesini kapsamaktadır. Geliştirilen spirostan içeren malzemelerin, spirostanlar ile ilgili temel araştırmalara katkı sağlamasının yanı sıra yeni ilaç ve biyo malzeme sentezi için hem akademik hem de endüstriyel laboratuvarlara faydalı olacağı düşünülmektedir.

Birinci çalışmada, bir spirostan olan diosgenin bileşiğinden başlayarak A, B, E ve F halkalarında seri reaksiyonlar sonucunda yeni türev maddeleri sentezlendi. Türev maddelerin yapıları FTIR, $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR, HRMS ve elementel analiz ile doğrulandı.

İkinci çalışmada, spirostan bileşikleri kullanılarak, floresans aktif polimerler sentezlendi. Herhangi bir biyolojik maddenin farmasötik ve klinik uygulamalarının biyoyararlanım, suda çözünürlük ve hidrofobiklik gibi faktörlerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmada, diosgenin metoksi poli (etilen glikol)'e konjuge edilerek sudaki çözünürlüğü iyileştirildi. Doğal bir bileşik ve zerdeçalın ana malzemesi olan kurkumin konjuge polimerik yapıya bağlandı ve floresans aktif biyouyumlu malzeme elde edildi. Bu malzeme, normal ve kanserli hücrelere karşı in vitro olarak test edildi. Elde edilen konjuge malzeme, ilacın çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak ve ilacın etkinliğini iyileştirmek için umut verici bir alternatif olabilir.

Üçüncü çalışmada, diosgenin ve farklı türevleri kullanılarak sentezlenen polimerlerden nanopartikül sistemleri hazırlandı. Biyobozunur amfifilik polimerlere dayanan polimerik nanopartiküller, kararlılığı arttırma, verimli taşıma sağlama ve kemoterapötik ajanların kontrollü salımını gerçekleştirmeleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu çalışmada, önce farklı poli (ε-kaprolakton)-metoksi poli (etilen glikol) bloklu diosgenin-konjuge taşıma sistemleri hazırlandı ve daha sonra bir kanser ilacı nanopartikül sistemine fiziksel olarak kapsüllendi. Çalışma, nanopartiküllerin anti kanser ilaçları için taşıyıcı sistem olarak uygulanabilirliğini ve ayrıca ilacın nanopartikülden salımı ve sitotoksik olarak etkisini incelemektedir.

Yapılan son çalışmada, diosgenin konjuge doğal polisakkaritler ile stabilize edilmiş çift katmanlı Pickering emülsiyonları hazırlandı. Bu çalışmada, birinci katman olarak nanoselüloz ve ikinci katman olarak diosgenin-konjuge aljinat kullanılarak hazırlanan çift katmanlı modelin stabilizasyonundan oluşturulan emülsiyon damlacıklarının yapısal yönleri araştırıldı. Hazırlanan emülsiyonlara kanser ilacı yüklendi ve ilacın sistemden salımı incelendi. Aynı zamanda in vitro ortamda normal ve kanserli hücrelere karşı hücresel alım davranışı gözlendi. Katyonik nanoselüloz ve anyonik diosgenin konjuge aljinatın kombinasyonundan formüle edilen PE'lerin, aracılı bir sistem üzerinden formüle edilmesi daha önce literatürde rapor edilmemiştir. Hazırlanan bu PE sistemleri, gıda ve takviye ürünlerinde kanser ilacı dağıtımına yönelik emülsiyon sistemlerinin tasarımını geliştirebilirler.

# 1. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan çalışmalar ile ilgili bilgi edinebilmek için daha önce yapılan bilimsel çalışmalar incelenmiştir. Öncelikle bir spirostan bileşiği olan diosgeninin özellikleri ve uygulama alanları ve sonrasında da, diosgenin ile ilgili yapılan çalışmalar ile polimerik miseller, nanopartiküller ve emülsiyonlar gibi ilaç taşıyıcı sistemler verilmiştir.

## 1.1. Saponinler

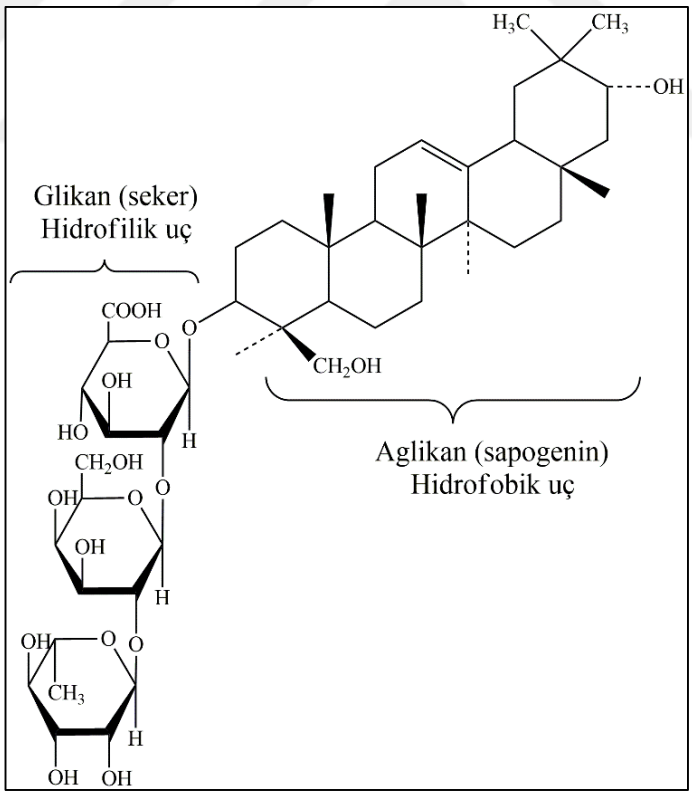
Saponinler doğal olarak oluşan, çeşitli bitki türleri, bazı deniz hayvanları ve bakteriler tarafından üretilen yüzey aktif glikozitlerdir. Hem yabani bitkilerde hem de kültür bitkilerinde esas olarak bulunur. Bitki saponinlerinin, deney hayvanlarının bağırsak lümeninden kolesterol emilimini inhibe ettiği ve sonuç olarak plazma kolesterol konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu, sindirim sistemindeki kolesterol ile etkileşimin veya bitki saponinlerinin kolesterol metabolizması üzerindeki doğrudan etkisinin sonucu olabilir. Örneğin sarımsak veya ginseng kaynaklı saponin fraksiyonlarının, hiperkolesterolemik hayvan modellerinde yüksek yoğunluk seviyesindeki (HDL, high density level) kolesterol seviyelerini değiştirmeden, total ve düşük yoğunluk seviyesindeki (LDL, low density level) kolesterol plazma konsantrasyonlarını azalttığı gösterilmiştir [10].

Saponin ismi “sapo” kelimesinden türetilmiş olup, Latincede sabun anlamına gelir ve sulu çözeltileri çalkalandığında köpük üreten fitokimyasallardır. Sabunlar veya deterjanlar gibi, saponinler, bir uçta yağ seven (lipofilik veya hidrofobik) bir kısım, diğer tarafta su seven (hidrofilik) bir kısım içeren büyük moleküllerdir. Sulu çözeltide, saponin molekülleri, sudan uzağa yönlendirilmiş hidrofobik uçları ile yüzeyde kendilerini dikey olarak hizalar. Bu, suyun yüzey gerilimini düşürerek köpükleşmesine neden olur. Bu nedenle saponinler, yüzey aktif maddeler olarak sınıflandırılır. Saponinler yapılarında glikan ve aglikan olmak üzere iki kısım taşırlar. Glikan kısmı bir veya daha fazla oligosakkarit grubundan oluşur ve hidrofilik ucu içerir.

Aglikan veya sapogenin olan kısmı ise yapılarına göre iki sınıfa ayrılır: steroidal saponinler, karakteristik dört halkalı steroid çekirdeği içerir ve triterpenoid saponinler, beş halkalı yapıya sahiptir. Bunların her ikisi de genellikle üçüncü karbona (C-3) bir glikosidik bağa sahiptir ve mevalonik asit yolu yoluyla ortak bir biyosentetik kökene sahiptir. Steroidal saponinler tipik olarak ekstra furan ve piran heterosiklik halkalar içerir. Furanlar ve piranlar sırasıyla oksijen içeren beş ve altı üyeli halkalardır [11]. Saponinlere ait genel gösterim Şekil 1.1'de görülmektedir. Saponinler birçok farmakolojik özelliklere sahip olup fitoterapi ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. Saponinlerin etkileri başlıca iki ana grup altında toplanabilir:

I. Genel etkileri; bütün saponinlerin az veya çok gösterdiği etkiler bu grup altında toplanmaktadır (öksürük giderici, balgam söktürücü ve antibiyotik aktivite).

II. Özel etkiler; sadece bazı saponinler tarafından gösterilen etkiler bu grupta incelenmektedir (anti-enflamatuar, anti-ödem, anti-viral aktivite ve anti-kanserojen etki, ürogenital sistem üzerindeki etki gibi) [12].

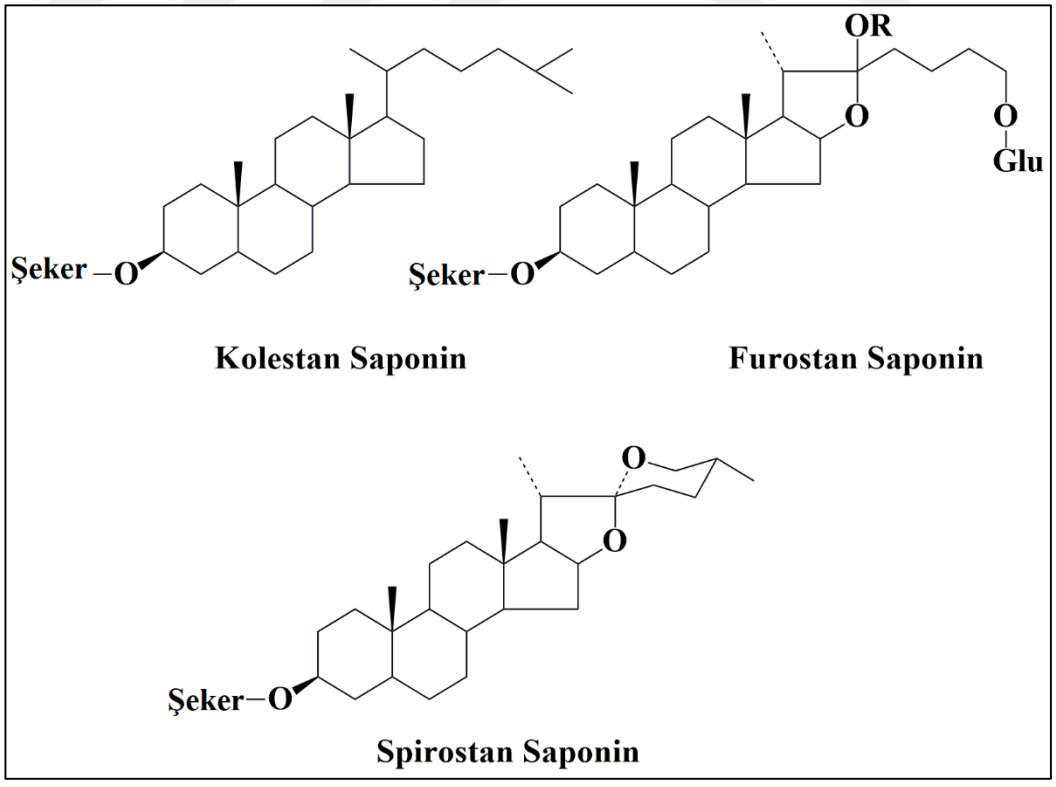



Şekil 1.1. Soya fasulyesinden alınmış tipik bir saponin yapısı

### 1.1.1. Sapogeninler

Sapogeninler, saponinlerin aglikan kısmı olarak bilinen ve şeker kısmına glikozit bağı ile bağlı olan, birçok bitki türünde bulunan organik bileşiklerin bir sınıfıdır. Saponinler, yapılarında bulunan mevcut sapogenin tipine göre triterpen glikozitler, steroid glikozitler ve steroid alkaloid glikozitler olmak üzere üç gruba ayrılır. Bunlar kortikosteroidler gibi hormonlar için öncülerdir. Son bulgulara göre, steroidal saponinler, yeni bir probiyotik sınıfı olabilir, insanlarda ve hayvanlarda mantar ve mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için etkili adaylardır [13]. Şekil 1.1'de görüldüğü gibi hem steroid hem de triterpenoid saponinlerde, karbonhidrat yan zinciri genellikle sapogenin C-3'nuna bağlanır.

Steroidal saponinlerde, sapogenin kısmını kolestan, furostan veya spirostan halkaları oluşturur (Şekil 1.2). Asit veya enzimler ile hidroliz edilerek C27 steroidal sapogeninleri ve çeşitli şekerleri verirler. Furostan saponinlerde 26 pozisyonunda ekstra şeker zinciri vardır. Bu kısım enzimatik hareketle veya asidik şartlarda ayrılabilir ve F halkası kapanır.



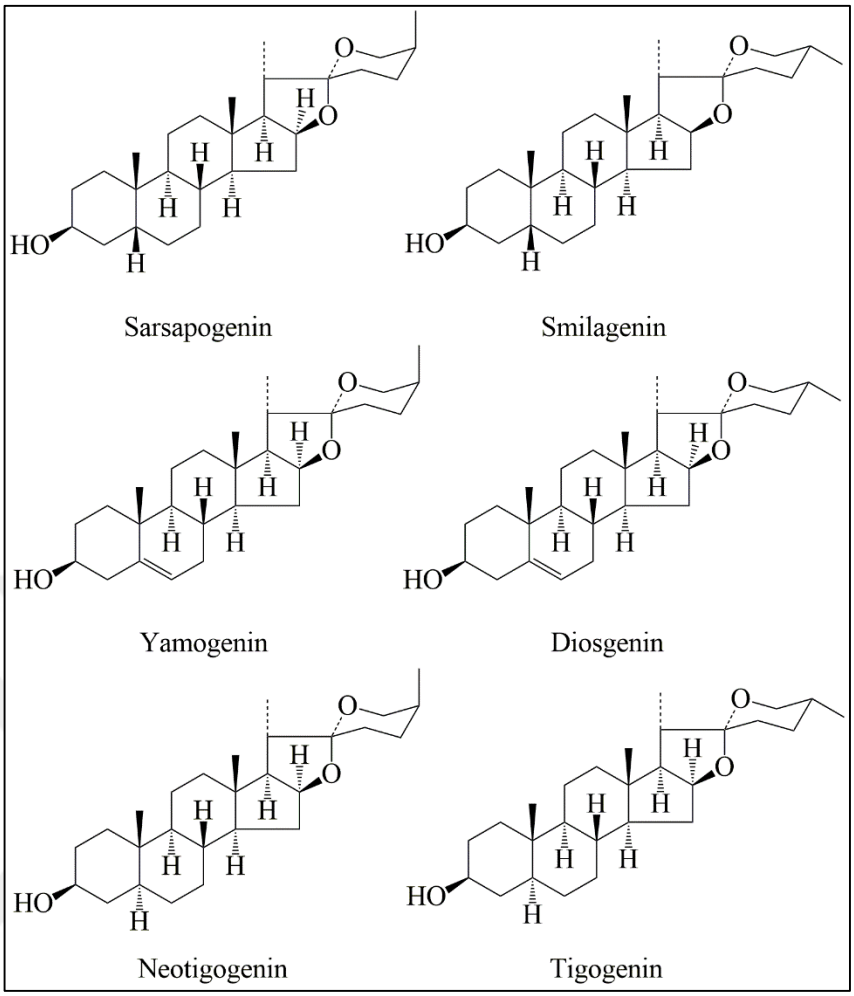

Şekil 1.2. Saponinlerin sınıflandırılması

### 1.1.2. Spirostanlar

Spiro bileşiği, Latincede bobin veya bükülme anlamına gelen spira kelimesinden türetilen, iki veya daha fazla halkanın bir ortak atomla birbirine bağlandığı ve bükülmüş bir yapı sunan organik bir bileşiktir. Spirostanların karakteristik yapısal özelliği, 5 üyeli (E) ve altı üyeli (F) iki halkanın oluşturduğu yan zincirdir. Bu halkalar hem heterosikliktir hem de bir spiroketal oluşturmak için 22, 26-oksit köprüsü ile kaynaşmışlardır. Doğal olarak oluşan spirostanlar birbirleri ile yakından ilişkilidir. Değişiklik, C-5, C-25 ve diğer hidroksil gruplarının konfigürasyon ve pozisyonu farklılıklarından meydana gelir. Örneğin, 5α hidrojenin konfigürasyonunda, A ve B halkaları arasında bir trans halka bağlantısı var iken 5β hidrojeninkinde cis halka bağlantısı vardır. C-25'deki konfigürasyona göre, stereo izomerlerin iki serisi vardır bunlar çiftler halinde bulunurlar ve sadece yan-zincir metil gruplarının sterik yönlendirilmesi ile farklılık kazanırlar. Bu serilere örmek olarak (25S) metil grubunun aksiyal pozisyonda olduğu sarsapogenin [(25S)-5β-spirostan-3-ol] ve (25R) metil grubunun ekvatoriyal pozisyonda olduğu smilagenin [(25R)-5β-spirostan-3-ol] verilebilir. Diğer benzer çiftlere, termodinamik olarak daha az kararlı ve daha kararlı olan, sırasıyla, yamogenin ve diosgenin, neotigogenin ve tigogenin çiftleri verilebilir. (25S) sapogeninler tersinmez olarak alkollü hidroklorik asit ile geri soğutucu altında kaynatılarak (25R) epimerlerine dönüştürülebilir (Şekil 1.3).

### 1.1.3. Diosgenin

Diosgenin, tedavi edici özellikleri bilinen saponinlerden biridir. Doğal olarak meydana gelen bir spirostanol saponinin aglikan kısmıdır. Doğada bol miktarda bulunur ve yapısında 27 karbon içerir. Ağırlık olarak tatlı patates, çemen otu tohumu ve Costus türlerinin biyoaktif bileşeni olarak belirlenmiştir. Diosgenin ilaç endüstrisinde kullanılan sentetik steroid türü ilaçların (kortizon, pregnenolon, progesteron ve diğer steroidler) öncü maddesidir (Şekil 1.4). Diosgenin ile yapılan çalışmalarda onun kanser kimyasallarını önleyici ve tedavi edici, iltihap engelleyici, anti-oksidan ve daha pek çok özellik gösterdiği görülmüştür. Aynı zamanda kolon ve lösemi hücrelerine karşı hücre ölümünü artırarak önemli ölçüde etki göstermektedir [14].




Şekil 1.3. C-25'deki pozisyona göre stereo izomer çiftleri

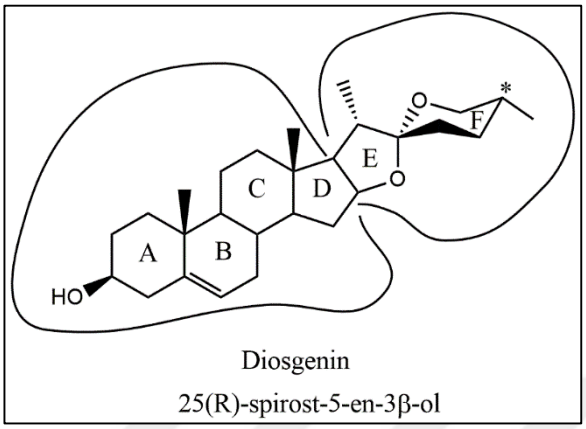
Diosgenin cinsiyet hormonlarının, kortikosteroidlerin ve diğer steroid ürünlerinin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılır. Diosgenin ile yapılan çalışmalarda:

- Safra salgılaması sırasında kolesterol emilimini azalttığı,
- Östrojenik, progesteronik ve iltihap giderici etkileri olduğu,
- Anti-tümör ve anti-kanser aktivitesine sahip olduğu,
- Yaşlılıkla birlikte azalan gençlik hormonunun (DHEA) sentezinde kullanıldığı,
- Kanser hücrelerinin (prostat ve kolon) bölünerek çoğalmasını inhibe ettiği ve yeni hücrelerin ve damarların oluşumunu engellediği görülmüştür [15].

Diosgeninin keşfi onu en çok araştırılan ve incelenen bitkisel ürünlerden biri haline getirmiştir. Çeşitli bölgelerde çeşitli amaçlarla kullanılmıştır [16].

- Çin; üretal ve böbrek enfeksiyonlarında,
- Kuzey Amerika; menopoz sonrası belirtileri azaltmada,
- Türkiye; iyi bir spazm giderici olarak (öksürük, kas ve kramp spazmları),

- Hindistan; kanser hücrelerini yok etmede ve yüksek kan basıncını azaltmada,
- Asya, Orta Doğu ve Avrupa ülkelerinde; kan şekeri düşürücü ajan olarak, kullanılmıştır.

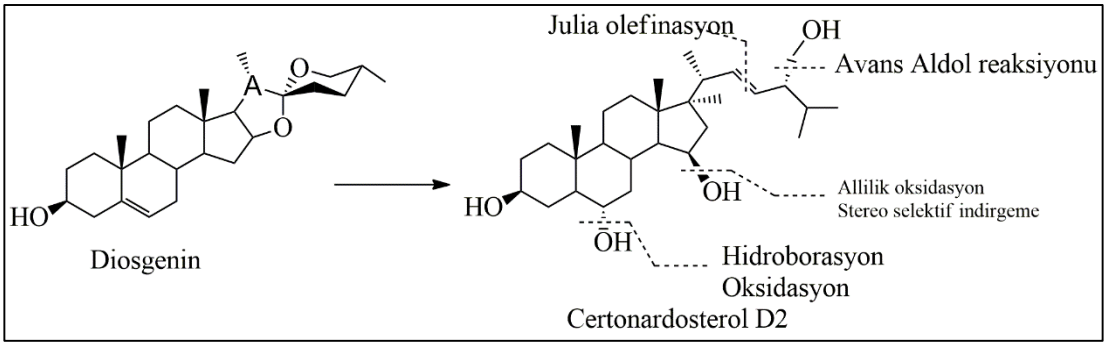



Şekil 1.4. Diosgeninin kimyasal yapısı

Son zamanlarda, dünya genelinde diosgeninin birçok kansere karşı kimyasal-önleyici ajan olarak klinik ve mekanistik araştırmaları yürütülmektedir. Diosgeninin anti-kanser etkisi, dönüşüm mekanizmaları, apoptosise (hücre ölümüne) neden olma, çoğalmanın bastırılması ve hücre membranının bütünlüğünün bozulması gibi çalışmaları rapor edilmiştir. Daha güvenli sitotoksik ilaçlar geliştirmek ve tasarlamak amacıyla çeşitli diosgenin türevlerinin sentezi yapılmaktadır [6, 17].

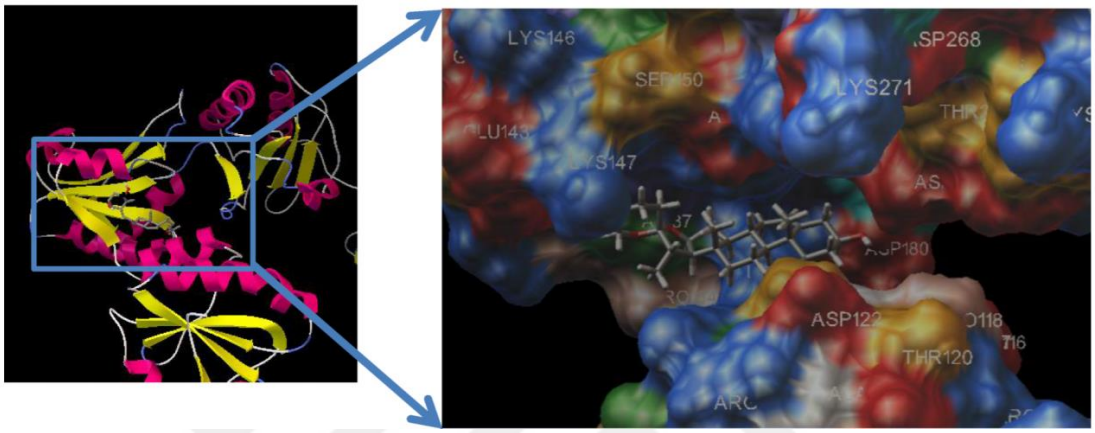
### 1.1.3.1. Diosgenin ile ilgili yapılan çalışmalar

Diosgeninin iskeletinden analogları türetilmiştir (Şekil 1.5). Bu analogların anti-kanser aktivitesinin, klinik olarak kullanılan ve iyi bilinen anti-kanser ajanlarının aktivitesinden (doxorubisin, mitomisin, andriamisin ve taksol) daha güçlü olduğu görülmüştür [18].



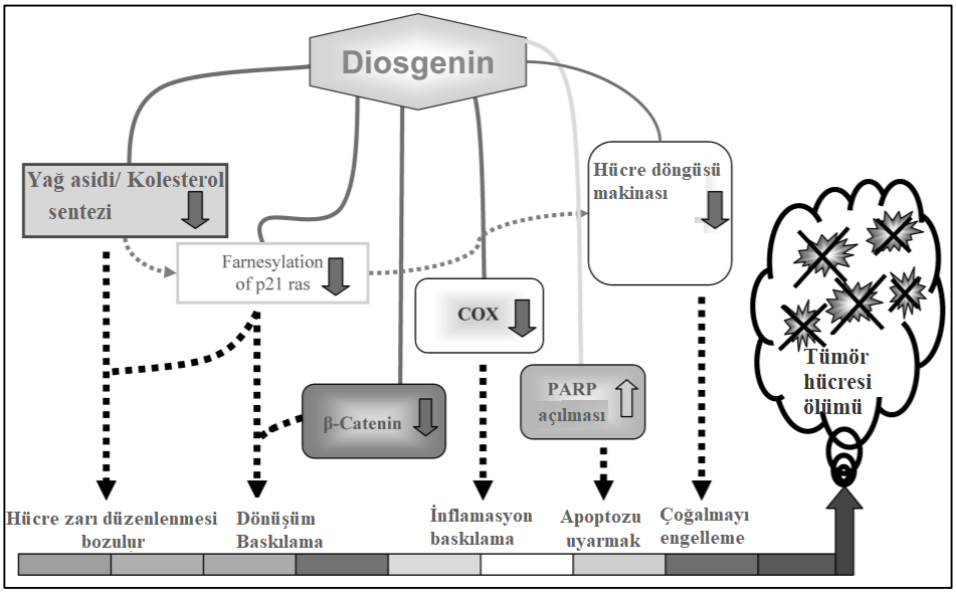

Şekil 1.5. Diosgeninden Certonardosterol D2 eldesi

Alzheimer hastalığı (hafıza eksikliği) üzerine model fareler ile yapılan çalışmada, diosgenin mekanizması ve etkileri incelenmiştir (Şekil 1.6). Diosgenin için doğrudan hedef molekül belirlenmiştir. Sonuç olarak farelerde hafıza eksikliğinin diosgenin tarafından başarılı bir şekilde iyileştirildiği rapor edilmiştir. Hedef molekül yolu diosgenin ile aktifleştirilmiş ve Alzheimer hastalığı tedavisi için bir ışık tutulmuştur [19].




Şekil 1.6. Diosgeninin hedef moleküle kenetlenme şematik gösterimi

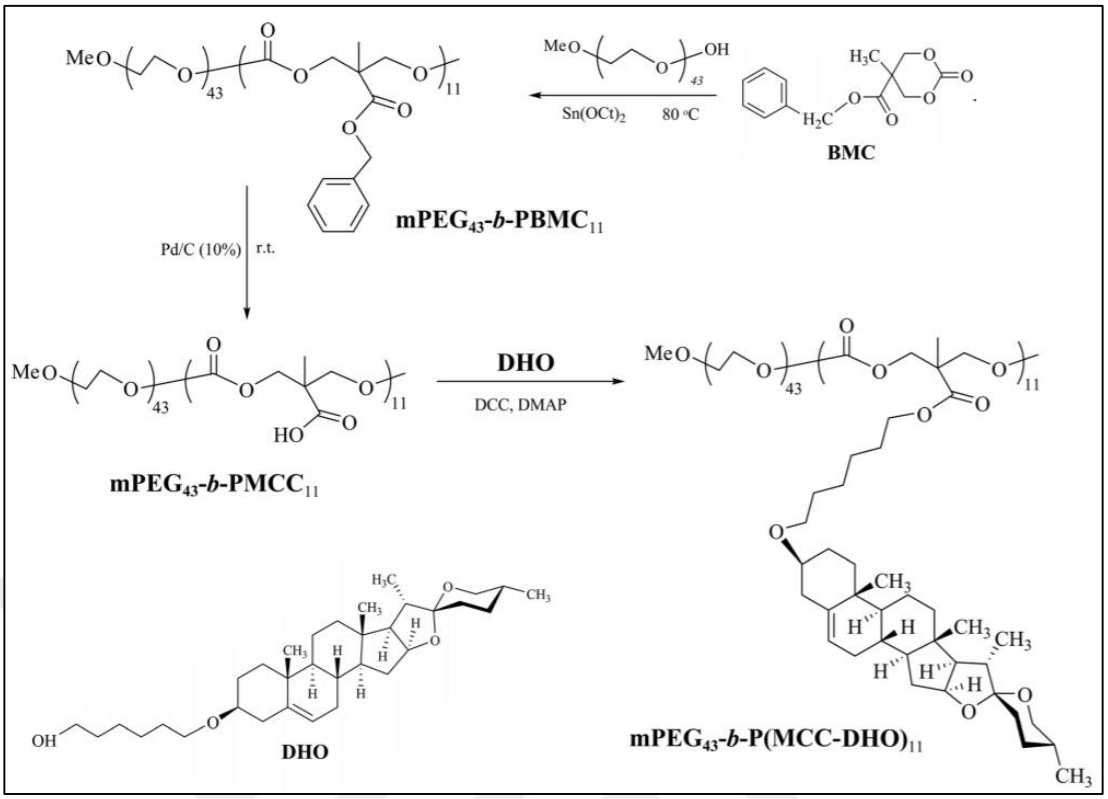
Bir kanser engelleyici ajan olarak diosgeninin hücresel mekanizması belirlenmiştir (Şekil 1.7). Bu çalışmadaki kliniksel ve mekaniksel bulgular, diosgenin kullanımının pek çok kanser hücresine karşı kemo-önleyici ajan olarak kullanımını kapsamaktadır [20].




Şekil 1.7. Bir kanser kemo-önleyici madde olarak diosgeninin hücresel düzeyde olası etki mekanizmalarının şematik gösterimi

Diosgenin zerdeçalın ana maddesi olan kurkumine bağlanarak bivalent bileşik elde edilmiştir ve biyolojik değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışma, diosgeninin çok işlevli özelliklere sahip bivalent bileşiklerinin, Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların geliştirilmesinde yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir [21]. Yapılan başka bir çalışma da ise, diosgenin türevleri, mono epoksit halka açılması ve "klik" reaksiyonları kullanılarak elde edilmiştir. Bu diosgenin türevleri, daha etkili anti tümör steroidal ilaçlar bulmak amacıyla insan kanser hücre hatlarına karşı anti proliferatif aktiviteleri incelenmiştir. Diosgenin triazol türevlerinin, basit bir yöntem ile mükemmel anti tümör aktivite sergiledikleri görülmüştür [6]. Diosgeninin direk aktif madde olarak kullanıldığında, hücre çoğalmasını engellediği, hücre ölümüne neden olduğu, tümör ile ilişkili sinyal yolları ve hedefleri üzerine etkileri gösterilmiştir [4]. Romatizmal iltihaplanmanın çoğalma oranında ve hücre ölümünde diosgenin etkileri incelenmiştir. İlk kez bir bitki steroidi olan diosgeninin, kemik ve kıkırdak bozulmasına yol açan eklem iltihabını, programlanmış hücre ölümü ile engellediği gösterilmiştir [22].

Diosgeninin, cinsiyet hormonları, steroidler ve benzeri yapıların sentezinde kullanılan ana malzemelerden biri olduğu bilinmektedir. Son çalışmalarda diosgeninin anti-enfeksiyon, anti-tromboz, T hücrelerinin bağışıklık aktivitesini artırmaya ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleme gibi pek çok biyolojik aktivite gösterdiği görülmüştür. Doğal steroidal bileşikler olarak diosgeninin akıllı, duyarlı ve biyobozunur sıvı kristal polimer malzemelerin sentezinde kullanılması onu cazip hale getirmiştir. Ancak şu ana kadar, diosgeninin bir biyomezojen olarak kullanıldığı alifatik biyobozunur poli-karbonatları üzerinde herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. Bundan dolayı, diosgeninden türeyen yeni biyobozunur yan zincir sıvı kristal poli-karbonatların hazırlanmasına ve bu şekilde doku mühendisliği ve ilaç taşınım alanında potansiyel uygulamaları araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bir çalışmada diosgenil birimleri içeren yan zincir sıvı kristal poli-karbonatlar sentezlenmiştir (Şekil 1.8). Yan zincir diosgenin gruplarının mezofaz oluşturma kabiliyeti molekül içi kendiliğinden düzenlenmesi için bir itici güç sağlanması beklenmiştir. Nihai sonuçlar diosgenin içeren bu polimerlerin sıvı kristal özellik gösterdiği ve termal özellikleri iyileştirildiği görülmüştür [23].

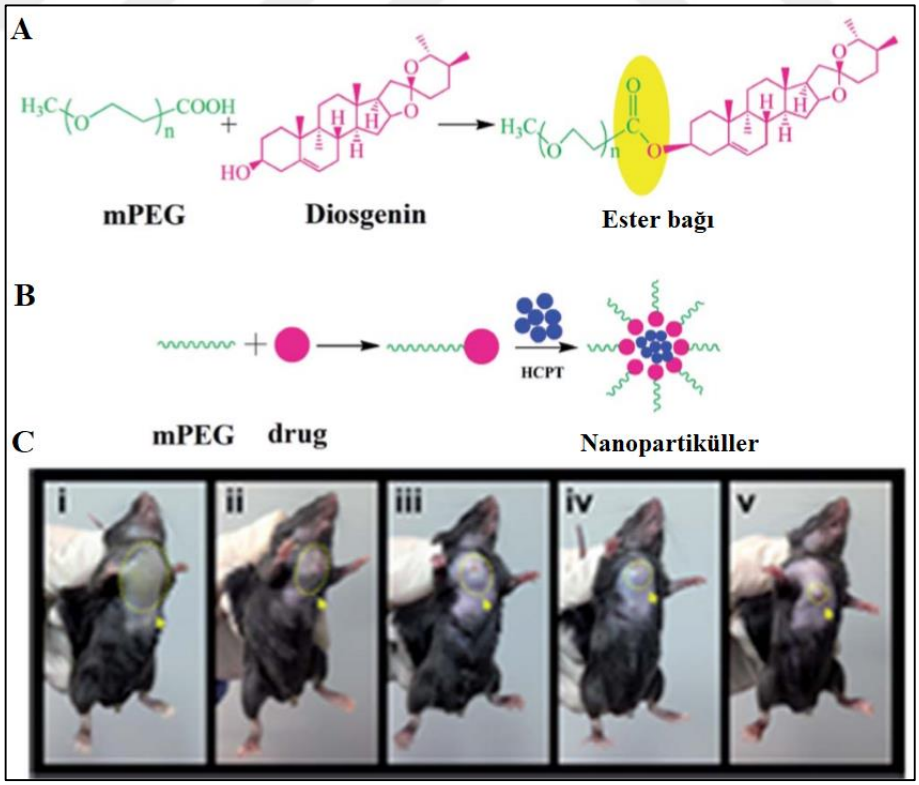



Şekil 1.8. Diosgenin içeren yan zincir sıvı kristal poli-karbonatlar

Yapılan başka bir çalışmada, iyi tanımlanmış yapılarla biyobozunur ve biyolojik olarak duyarlı yeni alifatik poliesterler hazırlamasında etkili sentetik yaklaşımlar sağlamak amacıyla, steroidal bloklar ile sonlandırılmış yeni biyobozunur alifatik poliesterler sentezlenmiştir. Bu biyobozunur alifatik poliesterler kolesterol ve diosgenin sonlu poli(ε-kaprolakton) ve poli(δ-valerolakton) polimerleridir. Steroidal kısımların doğasından dolayı bu biyobozunur polimerlerin potansiyel birer biyomalzeme olarak yeni olanaklara zemin hazırlayabileceği düşünülmüştür. Steroidal kısımların, sentezlenen polimerlerin kararlılığı ve termal kristalizasyonu üzerinde güçlü bir etki gösterdiği rapor edilmiştir [24].

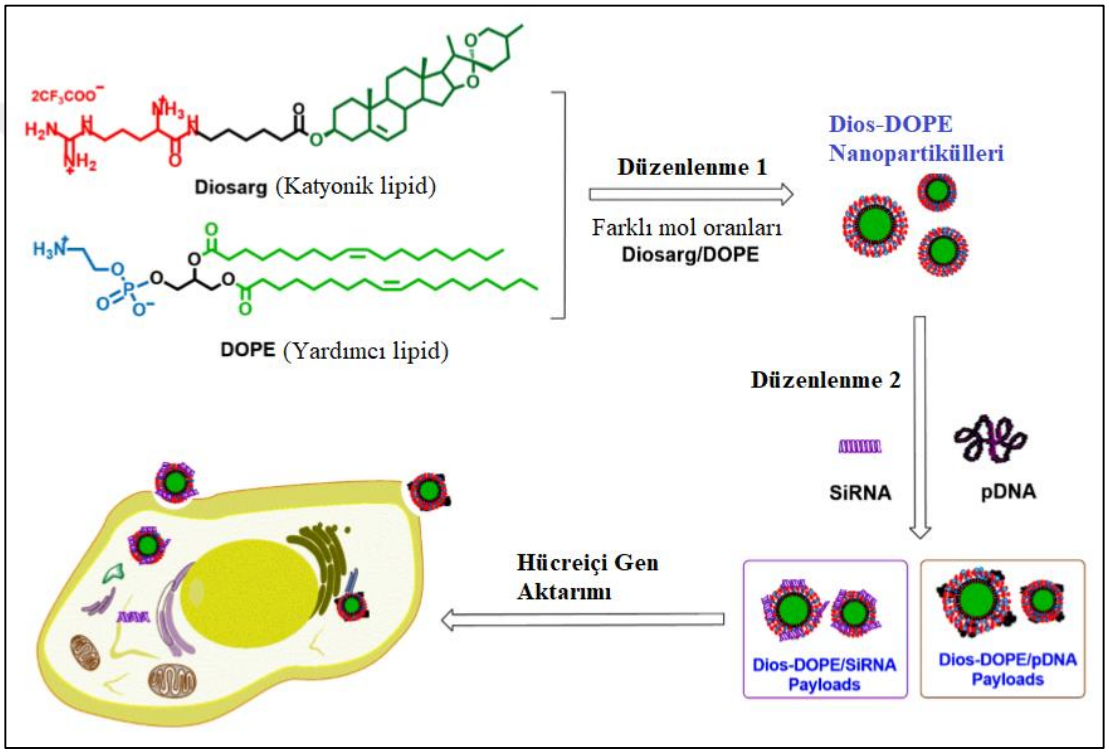
Kanser, dünya genelinde hastalıkların ve ölümlerin ana sebeplerinden biri olarak halk sağlığını ilgilendiren en büyük sorunlardan biridir. Diosgenin, tümörlerin tedavisinde baskın bir rol oynamaktadır. Ayrıca onun yeni anti-kanser ilaçlarının keşfi ve aynı zamanda kanser moleküllerinin mekanizmalarına açıklık getireceği aşikârdır. Ancak çoğu anti-kanser ilacında olduğu gibi, diosgenin kliniksel uygulamalarda düşük suda çözünürlük, göreceli kısa yarı-ömür ve sağlıklı dozlar için şiddetli yan etkiler gibi problemlere sahiptir.

Bu problemlerin giderilmesi için yapılan bir çalışmada, metoksi-poli(etilen glikol)-diosgenin (mPEG-DGN) amfifilik polimer-ilaç konjugatları, mPEG ve diosgenin temel alınarak sentezlenmiştir (Şekil 1.9A). Diosgenin ve mPEG sırasıyla hidrofobik ve hidrofilik kısımlar olarak kullanılmıştır ve daha sonra mPEG-DGN konjugatı lineer mPEG ve DGN ile polimerik nanopartikül içerisinde kendiliğinden düzenlenmiştir (Şekil 1.9B). Elde edilen nanopartiküller sayesinde, ilacın çözünürlüğünü arttırma, farmakokinetiğini geliştirme, tercihli geçirgenlik ve alıkonma etkisinin iyileştirilmesi ile ilaç dağıtımında önemli bir strateji geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutu, yüklenme etkisi, in vitro ilaç salım kinetikleri, in vitro anti-tümör aktiviteleri ve yan etkileri gibi biyo fiziksel özellikleri belirlenmiştir. Anti-kanser ilaçların taşınımı (hidroski kamptotesin; HCPT) için bu nanopartiküllerin ilgi çekici özellikler gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin antitümör özellikleri in vivo olarak model farelerin akciğer tümörü üzerine uygulanmıştır. 20. günde eksize edilen her tedavi grubundan tümör fotoğrafları Şekil 1.9C'da görülmektedir. Diosgenin ve HCPT ilaçlarını birlikte taşıyan nanopartiküllerin serbest ilaçlara göre tümörlü bölgede daha etkili iyileştirme gösterdiği elde edilmiştir [25].



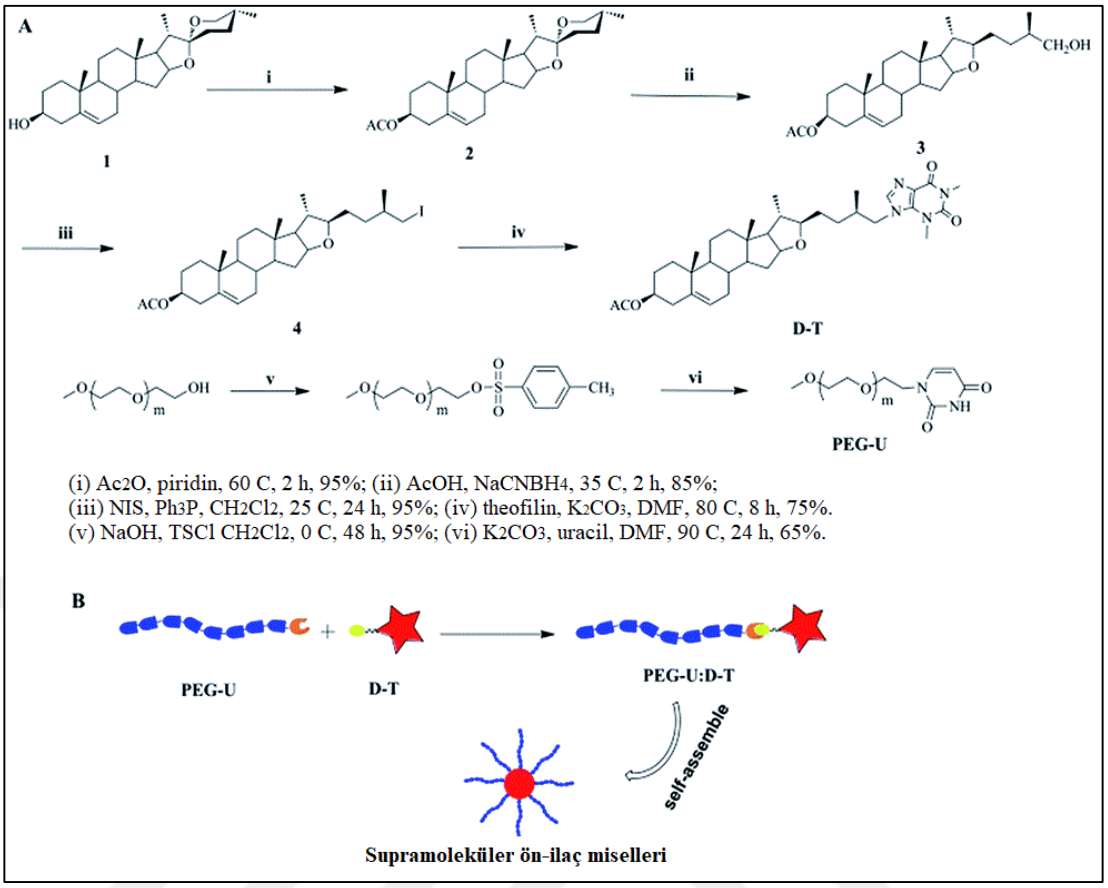

Şekil 1.9. mPEG-DGN'ın sentezi (A), anti kanser ilacın kapsüllenmesi (B), ilacın zamanla tümöre etkisi (C).

Diosgenin nanopartikül çalışmalarında hidrofobik çekirdek olarak kullanılmıştır. Çekirdek kısmı, diosgenin ve argininden, kabuk kısmı fosfoethanolamin'den oluşan katyonik lipit bir nanopartikül sentezi yapılarak RNA ve DNA'ya elektrostatik etkileşimler ile bağlanması amaçlanmıştır (Şekil 1.10). Çalışmanın sonucunda, diosgenin içeren katyonik nanopartikülün diosgenine kıyasla siRNA veya pDNA için hücre alımının daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, farklı fonksiyonel lipid bileşenlerinin sinerjik etkisi, yüksek verimli nano-biyomalzemeler olarak iki veya çok bileşenli supramoleküler sistemler geliştirmeye faydalı olabileceği belirtilmiştir [26].




Şekil 1.10. Hücre içi gen nakli için siRNA ve pDNA taşıyıcıları olarak diosgenin içeren nanopartiküllerinin hazırlanması

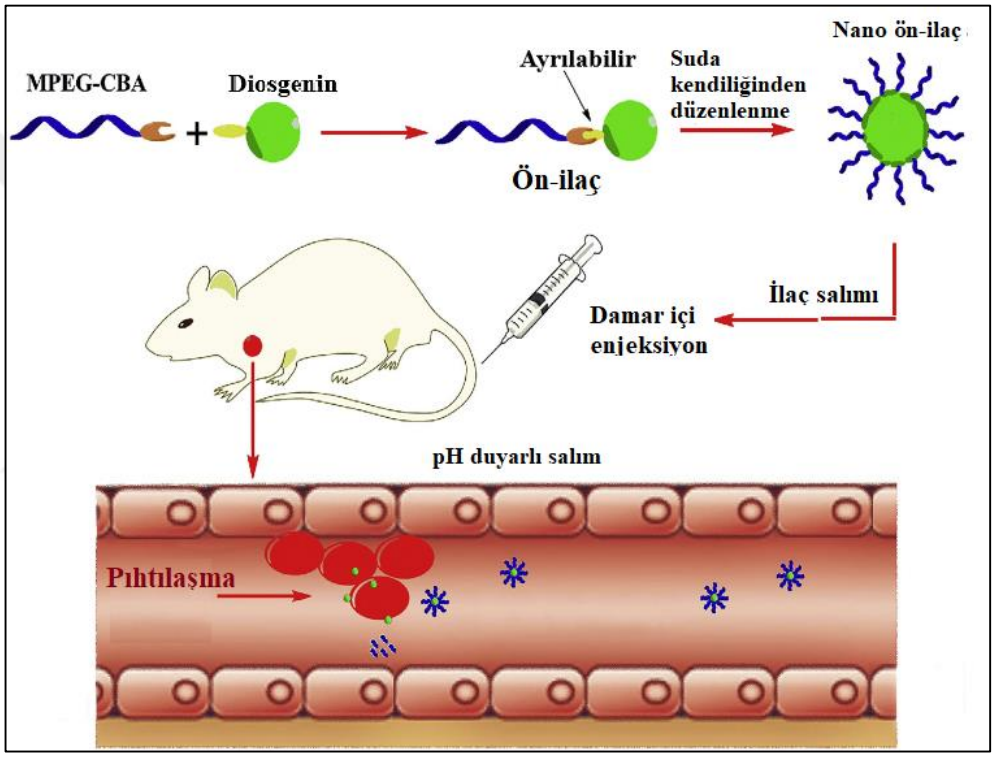
İlaçların çözünürlüğünü, biyoyararlanımını ve farmakokinetiğini arttırmak için misel çalışmaları yapılmaktadır. Bir çalışmada urasil konjuge PEG temelli hidrofilik polimerik yapıya hidrofobik karakterde diosgenin konjuge teofilin bağlanarak amfifilik kopolimer geliştirilmiştir. Kovalent olmayan etkileşimlerden yararlanılarak miseller halinde kendiliğinden toplanma sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, bu supramoleküler yapının ilacın çözünürlüğünü ve kan pıhtılaşması tedavisinde etkinliğini arttırmada ve kandaki sistemik dolaşımını uzatmada çok önemli olan farmakokinetik özellikler gösterdiği bulunmuştur (Şekil 1.11).




Şekil 1.11. Supramoleküler sistemin hazırlanması (A) ve misel oluşumu gösterimi (B)

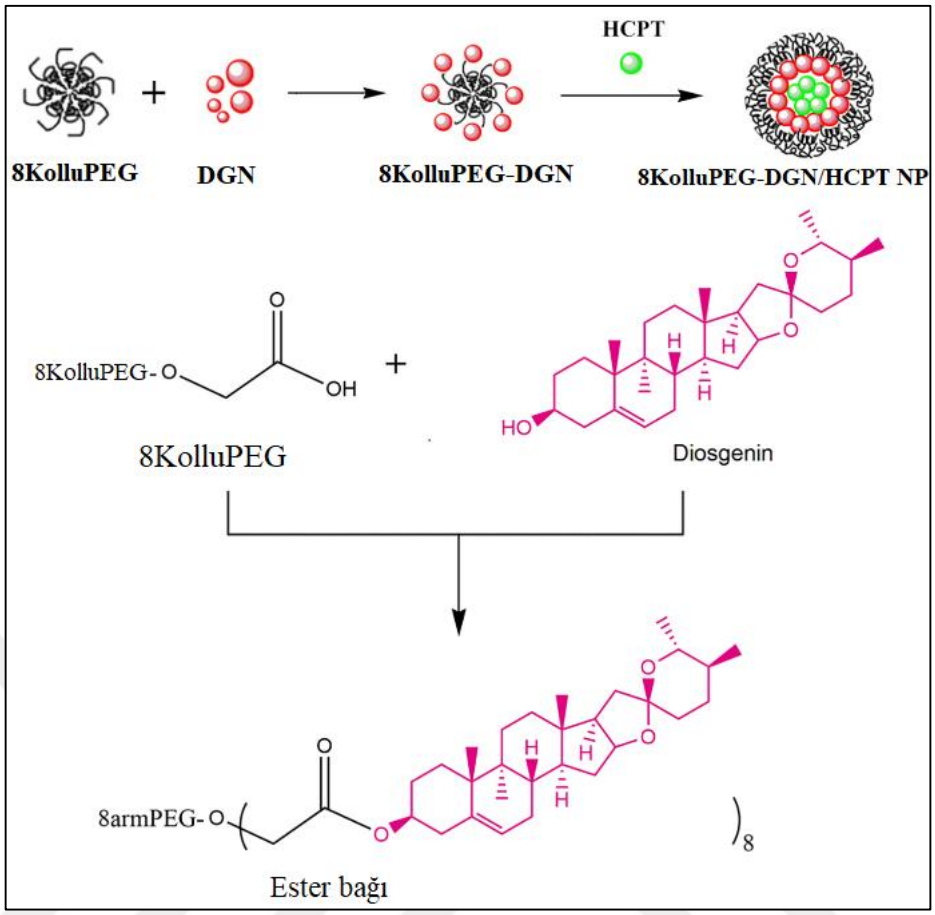
Tarım kimyasallarının ve potansiyel anti kanser ilaçlarının model olarak kullanıldığı salım sistemleri için diosgenin, kitosan doğal polimerine ester bağı ile bağlanmıştır. Elde edilen mikro kürelerden, diosgenin ve türevleri ester bağının hidrolizi ve kitosan matrisinden difüzyon yolu ile salım çalışması incelenmiştir. Sonuçlar, anti kanser ilaçlarının salımı için pH'a bağlı dağıtım sistemlerinin tasarlanmasının mümkün olabileceğini göstermiştir [27]. Bir başka çalışmada, diosgeninin hücresel metabolik aktivite, yeni damar ve kemik oluşumu etkilerini potansiyel biyomedikal uygulamalarda inceleme amacıyla arginin molekülüne konjuge edilmiştir. Çalışmada disogenin, arginin-diosgenin konjugasyonu ile suda çözünür hale getirilmiştir. Normal hücrelere karşı düşük toksisite ve kanserli hücrelere karşı yüksek antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra, çalışmada diosgeninin konjugatının özellikle kemik doku mühendisliğinde ve kemik oluşumunun yenilenmesinde biyomedikal materyaller için umut verici bir potansiyele sahip olabileceğini gösterilmiştir [28].

Kanın damarda pıhtılaşmasını engellemek ve trombozu gidermek için polietilen glikol ve diosgenin türevlerine dayalı ilaç taşıyıcı nano yapılar geliştirilmiştir (Şekil 1.12). Diosgenin, polietilen glikole Schiff-bazı ile konjuge edilmiştir. Çalışmada, kendiliğinden oluşan misellerin, damar tıkanıklığının bulunduğu yerde bölünebileceği ve tıkanıklığın önlenmesi için hızla diosgenin saldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, diosgenin yüklü misellerinin kanama riski olmaksızın, trombosit aktivitesini ve trombosit ölümünü inhibe ederek trombozu önlediği ve etkinliğinin aspirin gibi klinik anti trombotik ajanlardan daha iyi olduğu bulunmuştur [9].




Şekil 1.12. Tromboz tedavisi için in vivo ilaç salımının şematik gösterimi

Tümörlerde ilaç direnci, birçok ilacın düşük anti kanser verimliliğine yol açmasının ana nedenlerinden biridir. Kombinasyon tedavisinin ilaca dirençli kanserlere karşı geçerli bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Diosgenin ve hidroksikamptotesin (HCPT) doğal anti kanser ilaçlarıdır. Geniş in vivo ve in vitro anti kanser spektrumuna sahiptirler. Çalışmada, diosgenin ve HCPT'nin sinerjsitik etkisinden yararlanarak sekiz kollu polietilen glikolden meydana gelen nanopartiküler sistem formüle edilmiştir (Şekil 1.13). Çalışmada, ilaç karışımının tümör olan bölgede önemli iyileşme sağladığı görülmüştür. Bu çalışmalar, hazırlanan nanopartiküller ilaç dağıtım sisteminin, kanser tedavisi için umut verici bir aday olabileceğini göstermiştir [29].




Şekil 1.13. Sekiz kollu polietilen glikol diosgenin ve HCPT taşıyan nanopartikül sentezi

## 1.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler

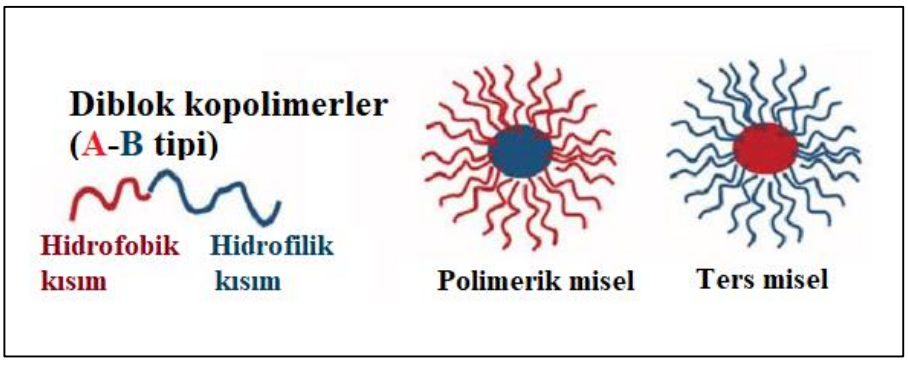
Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, nanomalzemelerin kanser ile bütünleşmesi, muhtemelen kanser tedavisinde devrim yaratan ve hızlı gelişen alanlardan biridir. Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki maddenin kontrolü ile materyallerin, cihazların ve sistemlerin yaratılması ve kullanılmasıdır. Nanotaşıyıcı sistemler, hedef hücreler ve dokularla etkileşime girecek veya istenen fizyolojik tepkileri başlatmak için iyi kontrol edilmiş yollarla uyaranlara yanıt verecek şekilde tasarlanabilir. Kanserin daha etkili tedavisi için nanotaşıyıcı sistemlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır [30].

İlaç taşıyıcı sistemler günümüzde ilacın kendisi kadar önemli hale gelmiştir. İlaç taşıma için farklı bileşimlerde ve biyolojik özelliklere sahip nanosistemler kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Etkli bir ilaç taşıyıcı sistem elde etmek için nanomalzemelerin biyolojik çevre ile etkileşimlerini, ilaç salımı, çoklu ilaç uygulamalarını, terapötik ajanların stabilitesini ve hastalığın patobiyolojisinde yer alan hücre sinyalleşmesinin

moleküler mekanizmalarını anlamak önemlidir [31]. Kontrollü salım, kan konsantrasyonunu terapötik sınırlar içinde korurken, bir ilacın uzun süreli verilmesini sağlar. Böylece ilaç dağıtım sistemleri, taşıyıcıdan ilacın salımını düzenleyerek farmakolojik aktiviteyi etkileyebilir. Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçları etki bölgesine önceden tasarlanmış bir şekilde iletebilir, böylece yan etkileri en aza indirerek ve söz konusu ilacın biyoyararlanımını arttırabilir [32]. Polimerik ilaç taşıyıcıları, doğal veya sentetik polimerlerden oluşan nanopartiküller, miseller, dendrimerler veya hidrojeller formunda kullanılmaktadır.

### 1.2.1. Polimerik miseller

Polimerik miseller, çekirdek-kabuk (core-shell) yapısını taşıyan amfifilik kopolimerlerin kendiliğinden birleşmesiyle oluşurlar (Şekil 1.14). Polimerik miseller, basit hazırlanma yöntemleri, 100 nm çapa kadar dar boyut dağılımı ve hidrofobik ilaçları çözme kabiliyeti nedeniyle ilaç taşıyıcıları olarak kullanılır. Tipik olarak, hidrofobik bir ilacın yüklenmesi için hidrofobik bir iç çekirdekten ve sulu bir çözücü içinde bir dış kabuk oluşturan hidrofilik bölümlerden oluşur. Buna karşılık, organik çözücüler içinde oluşturulan polimerik miseller ise, hidrofobik bir kabuğa ve hidrofilik ilaçların kapsüllenmesi için uygun olan ters (inverse) miseller olarak adlandırılan hidrofilik bir çekirdeğe sahiptir [33].




Şekil 1.14. Polimerik miselin şematik gösterimi

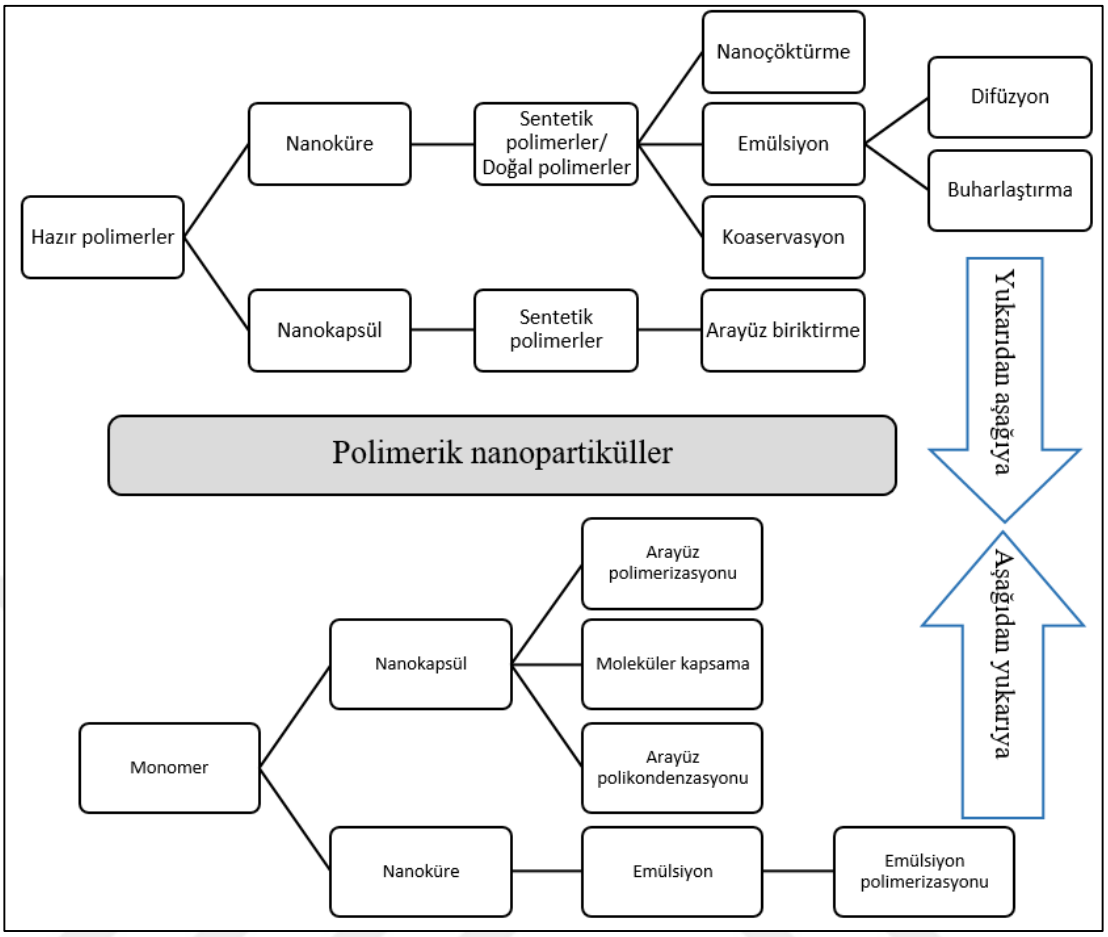
Polimerik miseller çok kararlıdır, yüzey aktif madde misellerine kıyasla düşük kritik misel konsantrasyonu (CMC) değerlerine ($\leq 10^{-6}$ M) sahiptir. Bu nedenle, antikanser ilaçları ve tümör hedeflemesi için ideal taşıyıcılardır. Suda az çözünen ilaçlar, genler ve görüntüleme ajanları için taşıyıcı olarak ilgi görmektedirler. Aynı zamanda, hidrofobik ajanların taşınması ve sitotoksik ilaçların pasif hedeflemesi için de

kullanılmaktadırlar [34]. Amfifilik blok kopolimerlerin sulu çözeltilerde kendiliğinden birleşmesiyle oluşan miseller, ilaç taşıma ve salım uygulamaları için ilgi çekmektedir. İlaçlar, blok kopolimer misellerin çekirdeğine fiziksel güçlerle tutturularak suda çözünürlüğünü aşabilecek konsantrasyonlarda taşınırlar. Ayrıca, hidrofilik bloklar, sulu çevre ile hidrojen bağları yaparak, misel çekirdeği çevresinde sıkı bir kabuk oluştururlar. Sonuç olarak, hidrofobik çekirdeğin içeriği, hidrolize ve enzimatik bozulmaya karşı etkin bir şekilde korunur. Ek olarak, dış kabuk retiküloendotel sistemi tarafından tanınmayı önleyebilir ve bu nedenle misellerin kan dolaşımından elenmemesini sağlar. Aynı zamanda, polimerik miseller, suda az çözünen antikanser ilaçları için etkili bir dağıtım sistemini temsil eder. Küçük boyutlu (10-100 nm) ve hidrofilik PEG kabuğu ile polimerik miseller, kanda uzun süreli dolaşım süresi ve gelişmiş tümör birikimi sergiler [35].

### 1.2.2. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, doğada katı olan ve nanometre (10-1000 nm) büyüklüğündeki kolloidal parçacıklardır. Polimerik nanopartiküller, ilaç taşınım sistemlerinde kontrollü ve sürekli salım için ilaç sektöründe taşıyıcılar olarak geniş çapta araştırılmaktadır. Polimerik nanopartiküller, nanoküre veya nanokapsül yapısında olabilir. Hazırlama yöntemine bağlı olarak, polimerik nanopartiküller (1) doğal ve sentetik ya da (2) biyobozunur ve biyobozunur olmayan olarak sınıflandırılabilir. Biyobozunur polimerik nanopartiküller, ilaçları belirli bir etki bölgesini kontrol etmek, hedeflemek ve suda çözünür veya çözünmeyen tıbbi ilaçların ve biyoaktif molekülün terapötik değerini geliştirmek için ilaç dağıtım aracı olarak başarıyla kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan iki ana strateji “yukarıdan aşağıya” yaklaşım ve “aşağıdan yukarıya” yaklaşımdır.

Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, önceden oluşturulmuş polimerlerin bir dispersiyonu polimerik nanopartikülleri üretirken, aşağıdan yukarıya doğru yaklaşımda ise, monomerlerin polimerizasyonu polimerik nanopartiküllerin oluşumuna yol açar. Polimerik nanopartiküllerin üretilmesi için farklı yöntemler, Şekil 1.15’te gösterilmektedir.

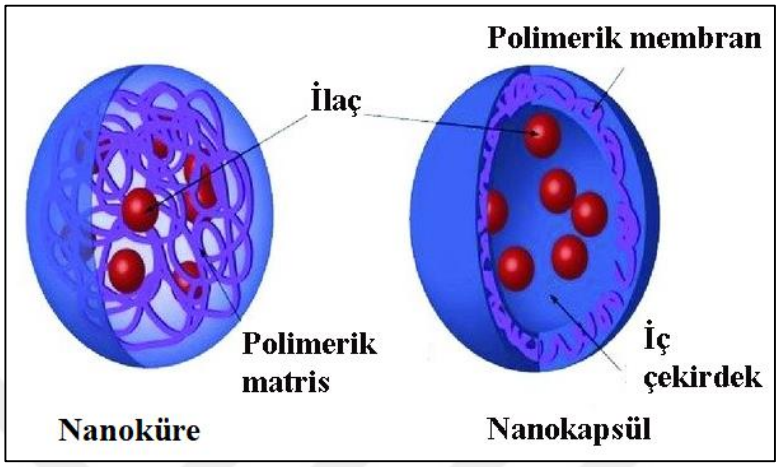



Şekil 1.15. Polimerik nanopartiküllerin sentezlenmesi için yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımlar

Polimerik nanopartiküllerin üretilmesi için uygun bir yöntemin seçilmesi; partikül büyüklüğü, sentezlerde kullanılan çözücü tipleri veya polimerler, uygulama alanı ve benzeri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [36]. Hazırlama yöntemine bağlı olarak, polimerik nanopartiküller iki tip yapı oluşturabilir: nanoküre ve nanokapsül (Şekil 1.16). Nanoküre, ilacın polimerde tek düze bir şekilde dağıldığı homojen bir matris sisteminden oluşur, ancak nanokapsüllerde, ilaç bir boşluğa gömülür ve kavite bir polimerik membran ile çevrilidir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri üç teknik altında sınıflandırılır:

1. Çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme, emülsiyonlaştırma, tuzlama, diyaliz ve süper kritik akışkan dâhil olmak üzere önceden oluşturulmuş polimerlerin bir dispersiyonundan;
2. Emülsiyon, miniemülsiyon, mikroemülsiyon, arayüzey polimerizasyonu ve kontrollü/canlı kök polimerizasyonu dâhil monomerlerin polimerizasyonu;
3. İyonik jelatin veya hidrofilik polimerlerin koaservasyonu (faz ayırımı yöntemi).

İlaç taşımada polimerik nanopartiküllerin kullanılmasının, biyouyumlu ve biyobozunur, farmasötik ajanın kararlılığının arttırılması, hedefli ilaç taşıma, immünojenik olmayan ve toksik olmama gibi birçok avantajı vardır [37].



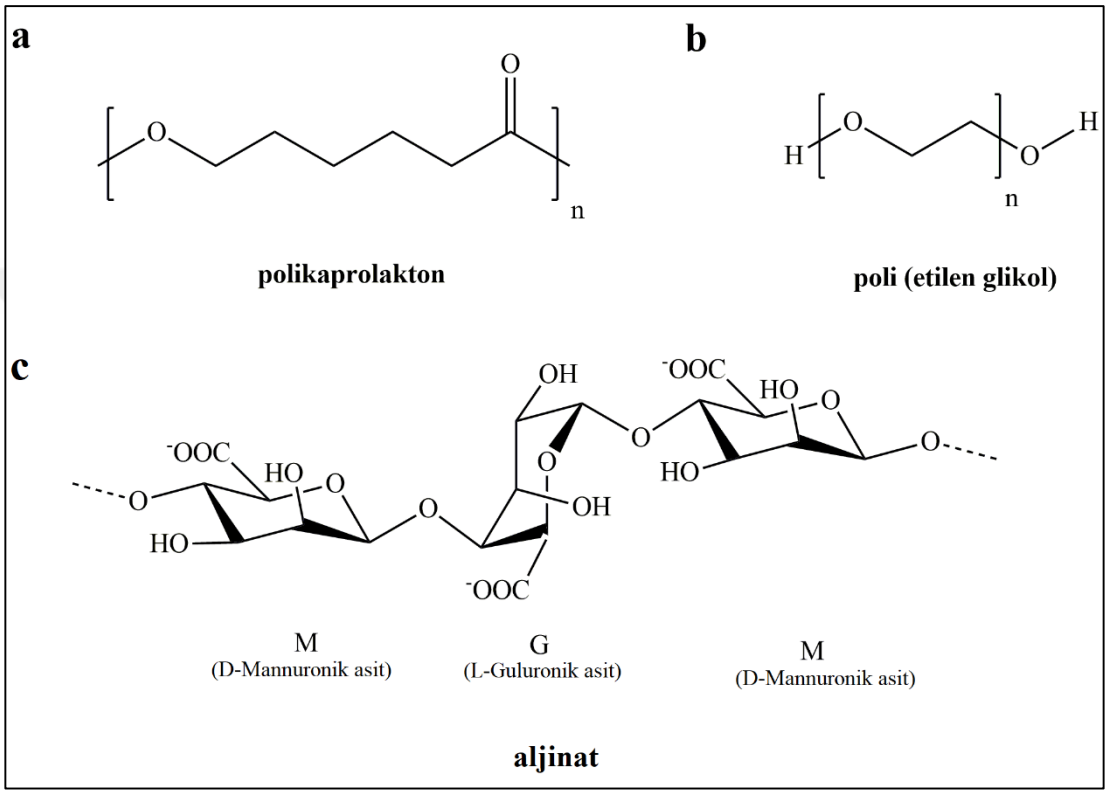

Şekil 1.16. Nanoküre ve nanokapsül gösterimi

### 1.2.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimerler

Sentetik veya doğal kökene sahip, kullanılabilecek çok çeşitli polimerler vardır. Polimerik nano-taşıyıcıların üretimi için biyobozunur polimerlerin kullanılması önerilir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında, doğal hidrofilik polimerler (jelatin ve albümin gibi proteinler, aljinat ve kitosan gibi polisakkaritler) ve sentetik hidrofobik polimerler (önceden polimerize edilmiş, polistiren ve poli (ε-kaprolakton) gibi ve işlem içinde polimerize edilmiş poli (metil metakrilat) ve poli (izobütil siyanoakrilat) gibi) kullanılabilir [38].

Poli (ε-kaprolakton), (PCL), düşük erime noktası (yaklaşık 60 °C) ve çok düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip (−60 °C), biyobozunur, biyo-uyumlu ve yarı kristallin bir polimerdir (Şekil 1.17a). PCL numunelerinin ortalama moleküler ağırlığı, 10.000 ile 42.500 arasında değişebilir ve moleküler ağırlığa göre derecelendirilir. Yavaş yavaş bozulduğu için, bir yıldan fazla bir süre boyunca uzun süreli ilaç taşıma için idealdir. PCL, birçok ilaca karşı yüksek geçirgenliğe sahip olması ve toksik olmaması nedeniyle kontrollü ilaç dağıtımı için uygundur. Mikro-küre, nano-küre ve implantlar şeklinde farklı taşınım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Hedefli ilaç taşınımı ve kontrollü ilaç salımı için PCL'a çeşitli ilaçlar kapsüllenmiştir.

PCL, küçük ilaç moleküllerini yüksek geçirgenliği, polilaktitler ve glikolitlerle karşılaştırıldığında parçalanma sırasında asidik bir ortam oluşturmamaları, PCL homopolimerinin diğer polimerlerle karışımlar oluşturmadaki yetenekleri ve bir yıldan daha uzun bir süreye uzanan uzun vadeli dağıtım sistemleri uygun olma gibi avantajlara sahiptir [39].




Şekil 1.17. Polikaprolakton (a), poli (etilen glikol)'ün (b) ve aljinatın (c) yapısı

Poli (etilen glikol), sulu çözeltilerde ve organik çözücüler içinde çözünen, yüksek ölçüde biyo-uyumlu bir polieterdir. Düşük molekül ağırlığının yanında düşük toksisite ve immünojenik olmayan poli (etilen glikol) (Şekil 1.17b), böbrekten kolay temizlenme sağlaması nedeniyle biyomalzemelerin, partiküllerin ve misellerin yüzey modifikasyonu ve aktif moleküllerin taşınması için popüler biyomalzeme haline gelmiştir. Poli (etilen glikol) hidrofilikliği ve biyouyumluluğundan dolayı en yaygın kullanılan sentetik polimerlerden biridir [40].

Poli (etilen glikol), hidrolitik olarak in vivo ortamda ayrışmaz; bununla birlikte hidrofilik fonksiyonları, suya karşı artmış bir ilgi ve polimere biyo bozunurluk kazandırır. Poli (etilen glikol)'ler, asidik veya bazik katalizörlerin mevcudiyetinde etilen glikolun polikondensasyonu yoluyla düşük molekül ağırlıklı olarak elde edilir

(Şekil 1.17b). Etilen oksit, yüksek molekül ağırlıklı poli (etilen glikol)'lerin polimerizasyonu için öncü olarak kullanılır ve daha ağır polimer moleküllerinin yüksek verim ile üretilmesini sağlar [41]. Polietilen glikol, hem sulu hem de apolar ortamlarda iyi çözünürler. Düşük molekül ağırlıklı polietilen glikoller (<1000 g/mol), genellikle daha viskoz ve renksizdir. Gıda ve ilaç yöneticiliği (Food and Drug Administration, FDA) poli (etilen glikol)' lerin biyomedikal uygulamalarda iyi biyouyumluluk göstermeleri, immünojenik olmamaları ve protein molekülleri tarafından adsorbe edilmeye karşı dirençlerinden dolayı kullanımını onaylamıştır. Polietilen glikoller doku mühendisliği, kemik protezleri, yara iyileşmesi ve çok daha fazla geniş alana uygulanmıştır [42].

Aljin veya aljinat (ALG) olarak da adlandırılan aljinik asit, *Laminaria* ve *Ascophyllum* türleri başta olmak üzere kahverengi alglerin hücre duvarlarında geniş çapta dağılmış anyonik bir polisakarittir. D-mannuronik asit (M) ve L-guluronik asidin (G) doğrusal blok kopolimerizasyonu ile oluşturulur. Aljinatlar, farklı miktarlarda (1→4') bağlı β-d-mannuronik asit ve α-l guluronik asit kalıntıları içeren doğrusal dallanmamış polisakkaritlerdir. Aljinat biyolojik olarak parçalanabilir, kontrol edilebilir gözenekliliğe sahiptir ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllere bağlanabilir. ALG polimerlerinin mekanik ve fiziksel stabilitesi G içeriğine bağlıdır, G içeriği ne kadar yüksek olursa, matris o kadar sert ve kırılgandır. M içeriğine bağlı olarak da polimer o kadar esneklik kazanır. Aynı zamanda, ALG polimerleri asit koşullarına göre daha nötür ve bazik pH değerleri altında aşınırlar. Bu özellikleri, mide sıvılarında kararlı olmayan ve oral alıma uygun ilaçların kimyasal stabilizasyonunda kullanılmalarını sağlamaktadır (Şekil 1.17c). ALG'nin hidrofilik yapısından dolayı, kapsüllenmiş ilaçların serbest bırakılması farklı mekanizmalar izleyebilir. Suda çözünür ilaçların salımı genelde difüzyon yoluyla gerçekleşirken, suda az çözünen ilaçlar matris erozyonu ile serbest kalır.

Küçük moleküllerin salımı, şişmiş ALG matrislerinin yaklaşık 5 nm'lik bir gözenek çapı göstermesi nedeniyle hızlıdır. Bununla birlikte, ilacı ağa fiziksel veya kimyasal olarak bağlamak ve salımı uzatmak için farklı modifikasyonlar yapılabilir. ALG'nin bir başka özelliği de muko-yapışkan sistemler olması ve bu sayede ilacın bağırsak, akciğer, burun ve göz gibi farklı mukozal dokularda salımının uzatılmasıdır. Son zamanlarda yüksek kimyasal işlevsellikten dolayı, ALG'nin yan zincirinin kimyasal

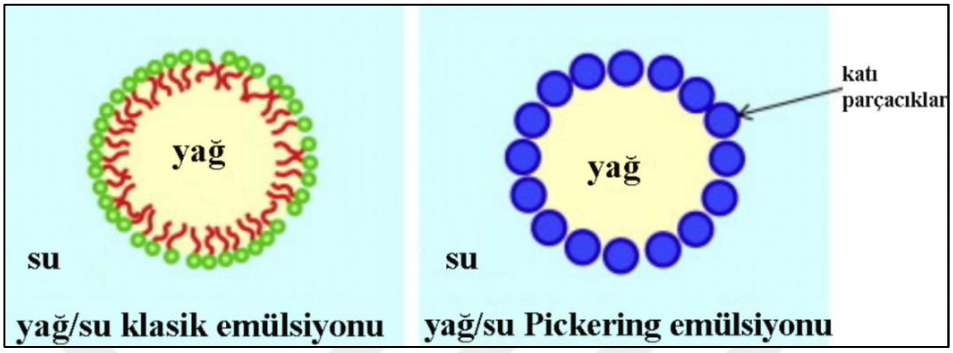
modifikasyonu (tekrarlayan birim başına iki-OH ve bir -COOH), diğer fizikokimyasal özellikleri değiştirmek, aprotik çözücülerde çözünürlüğünü arttırmak, amfifilik özelliklere ulaşmak ve hücre sinyalleşme ligandlarını birleştirmek için geniş ölçüde araştırılmaktadır [43].

### 1.2.3. Pickering emülsiyonu

Emülsiyonlar, özellikle çeşitli emülsiyonların hazırlanmasına yönelik yöntemlerin geliştirilmesinden sonra, farmasötik, ilaç taşıma, kozmetik, gıda endüstrisi ve benzeri birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle emülsiyonların küçük moleküler, emülgatörler ve bazı makromoleküller ile stabilize edilebildiği bilinmektedir, ancak bazıları alerji benzeri reaksiyonlara ve kanserojenliğe neden olmaktadırlar. Pickering emülsiyonu, iki karışmayan sıvı (tipik olarak yağ ve su fazı olarak adlandırılır) arasındaki ara yüzde biriken ve damlacıkları birleşmeye karşı stabilize eden katı parçacıkları stabilizatörler olarak tek başına kullanmaktadır (Şekil 1.18). Pickering emülsiyonu uzun süredir bilinmesine rağmen son zamanlarda aşağıdaki avantajlarından dolayı birçok alanda önemli araştırmaların ilgi odağı olmuştur: (i) katı parçacıklar, emülsiyonlara daha fazla kararlılık kazandırarak birleşme olasılığını azaltırlar; (ii) ve yine katı parçacıklar hazır malzemelere iletkenlik, yanıt verebilirlik, gözeneklilik ve benzeri yararlı özellikler kazandırlar; (iii) bazı gıda sınıfı katı partiküllerin toksisitesi düşüktür, bu nedenle in vivo kullanım için daha yüksek güvenlik sağlar.

Silika, kil ve hidroksiapatit gibi bazı inorganik partikül türlerinin ve bazı organik partiküllerin Pickering emülsiyonlaştırıcıları olarak etkili bir şekilde hizmet edebileceği birçok araştırma ile gösterilmiştir [44]. Katı parçacıklar, yağ/su ara yüzünde geri dönüşümsüz olarak adsorbe edilebilir veya tutturulabilir ve Pickering emülsiyonlarını stabilize etmek için kompakt tabakanın sert bir sterik bariyerini oluşturabilir. Geleneksel emülsiyonlar, biyopolimerler (polisakkaritler ve proteinler) ve düşük moleküler ağırlıklı emülgatörler ile sterik elastik bir film oluşturarak veya ara yüzey gerilimi azaltılarak stabilize edilir.

Geleneksel emülsiyonlarla karşılaştırıldığında, katı parçacıklar tarafından yağ-su ara yüzünü stabilize eden Pickering emülsiyonları, "yüzey aktif madde içermeyen", birleşme ve Ostwald olgunlaşmasına karşı yüksek kararlılık gösterme gibi avantajları nedeniyle son yıllarda yoğun ilgi görmüştür.

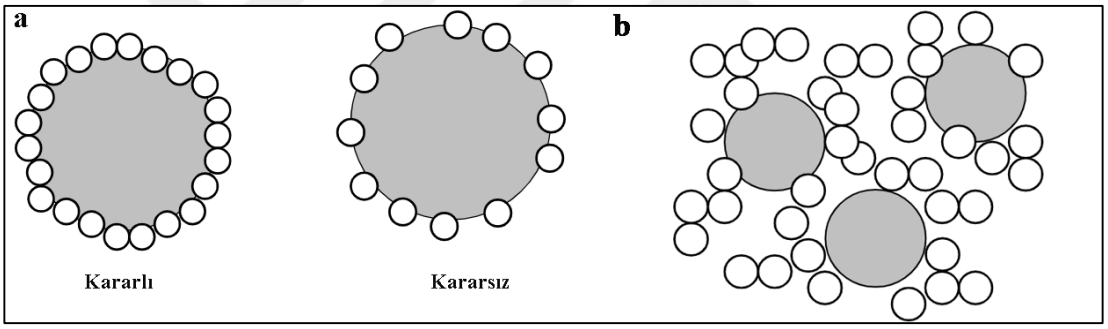



Şekil 1.18. Yağ/Su Klasik Emülsiyonu ve Yağ/Su Pickering Emülsiyonu şematik gösterimi

Stabilize edici katı parçacıklar emülsiyon damlacıklarından mutlaka daha küçük olmalıdır. Nanometre boyuttaki katı parçacıklar (veya mikron altı, ~100 nm), mikrometre çapı kadar küçük damlacıkların dengelenmesine izin verir; daha büyük damlacıkların stabilizasyonu da mümkündür. Mikron boyutlu katı parçacıklar, çapı muhtemelen birkaç milimetreye ulaşan daha büyük damlacıkları stabilize edebilir. Milimetre boyutundaki kararlı emülsiyonların hazırlanabilmesi, klasik emülsiyonlara göre Pickering emülsiyonlarının gösterdiği ilave bir faydadır ve bu olasılık, birleşmeye karşı yüksek kararlılıklarından kaynaklanmaktadır. Emülsiyon damlacıklarının yüzeyinde katı parçacıkların adsorpsiyon mekanizması, yüzey aktif maddelerden çok farklıdır, çünkü katı parçacıkların amfifilik olmaları gerekmez.

Katı parçacıkların yüzeyinin su ve yağ ile kısmen ıslatılması, katı parçacıkların yağ-su ara yüzünde güçlü bir şekilde tutturulmasının sonucudur [45]. Pickering stabilizasyonu geleneksel olarak, Şekil 1.19a'da şematik olarak gösterildiği gibi, damlacık yüzeyinde adsorbe edilmiş parçacıkların sıkı bir şekilde tek katmanlı kaplanmasının varlığını gerektirir. Bununla birlikte, pratikte, emülsiyonlaştırma sırasında adsorpsiyon için mevcut olan partiküllerin konsantrasyonu sınırlandırılabilir, bunun sonucunda, başlangıçta köprüleme topaklaşması ve birleşmeye göre kararsız olan dağılmış yüzey kaplamalı damlacıklar oluşturulur. Partikül konsantrasyonu yeterince yüksek ve emülsiyon oluşturma koşulları uygun olsa bile, ideal bir tek katmanlı homojen partikül

modeli pratikte nadiren elde edilir. Çünkü gerçek koloidal parçacıklar boyut ve biçim açısından çok yönlüdürler ve sıklıkla yoğun biçimde toplanırlar. Aslında, kolloidal katı parçacıklar emülsiyonlaştırma sırasında yağ-su ara yüzeyinde en uygun adsorpsiyon için gereken hidrofilik ve lipofilik karakterin gerekli dengesine (hidrofilik lipofilik balance, HLB) sahiptir ve emülsiyon sürekli fazında zayıf bir birikim durumunda bulunma eğilimindedir. Bu, emülsiyon kararlılığının, damlacıkların çevresinde ve arasında birbirine bağlı sterik bir bariyer oluşturan, adsorbe edilmiş agregalar sayesinde tamamen doymuş tanecikli bir tek tabaka olmadan elde edilebileceği sonucuna sahiptir (Şekil 1.19b). Parçacıkların toplanması, damlacıkların jel benzeri bir parçacık ağında immobilizasyonuyla kararlılık sağlar. Bu toplanmış partikül ağı, emülsiyonu sadece damlacık-damlacık birleşmesine karşı değil aynı zamanda yerçekimine bağlı krem/sedimantasyon ve makroskobik faz ayrışmasına karşı da korumaya yarar [46].




Şekil 1.19. Emülsiyon damlacıklarının katı parçacıklarla stabilizasyonunun şematik gösterimi

# 2. MALZEME VE YÖNTEM

## 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması için kullanılan kimyasallar ve özellikleri Tablo 2.1'de liste halinde verildi.

Tablo 2.1. Sentez, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler

| Adı | Firma | Saflık Derecesi |
|---|---|---|
| Aktif karbon tozu (Charcoal) | Aldrich | Toz |
| Aljinik asit sodyum tuzu | Sigma | Toz |
| Alüminyum isopropoksit ($Al(O\text{-}i\text{-}Pr)_3$) | Aldrich | > %98 |
| Alüminyum klorür ($AlCl_3$) | Merck | Susuz, % 99,9 |
| Amonyum hidroksit | Aldrich | ACS reaktif |
| Asetik anhidrit | Aldrich | ≥ %98 |
| Asetik asit (AcOH) | C.Erba | Glasiyal |
| Aseton | Aldrich | > %99,8 |
| Bakır (II) sülfat ($CuSO_4$) | Aldrich | > %99,99 |
| Benzoil klorür | Aldrich | %99 |
| Borhidrür-THF kompleksi ($BH_3$-THF) | Aldrich | 1 M THF |
| t-Butil alkol (t-BuOH) | Aldrich | ACS reaktifi |
| Celite | BDH | Analitik filtre |
| Çinko tozu (Zn) | Aldrich | > 10µ, > %98 |
| Dietileter ($Et_2O$) | C. Erba | Analiz için |
| Diklorometan (DCM) | Aldrich | HPLC için |
| 4-Dimetilaminopiridin (DMAP) | Aldrich | > %99 |
| N,N'-Disiklohekzilkarbodiimit (DCC) | A. Aesar | %99 |
| Dimetilformamid (DMF) | Aldrich | %99,8 |
| Dimetiloksietan (DME) | Aldrich | > %99 |
| Diosgenin | Aldrich | > %93 |
| Etanol | Aldrich | HPLC için |
| Etilasetat (EtOAc) | VWR | HPLC için |
| Etilformat | Fluka | GC için |
| n-Hekzan | Merck | Sentez için |
| Hidrojen peroksit ($H_2O_2$) | Merck | %30 |
| Hidroklorik Asit (HCl) | RielHaen | %37 |
| N-Hidroksiftalimit (NHPI) | Aldrich | %97 |
| Hidroksilaminhidroklorür ($NH_2OH.HCl$) | Aldrich | %98 |
| Hindistan cevizi yağı | Aldrich | %100 |
| İmatinib mesilat | Aldrich | ≥ %98 HPLC |
| Jojoba yağı | Aldrich | %100 |
| Kalay oktoat ($Sn(Oct)_2$) | Aldrich | %92,5-100 |

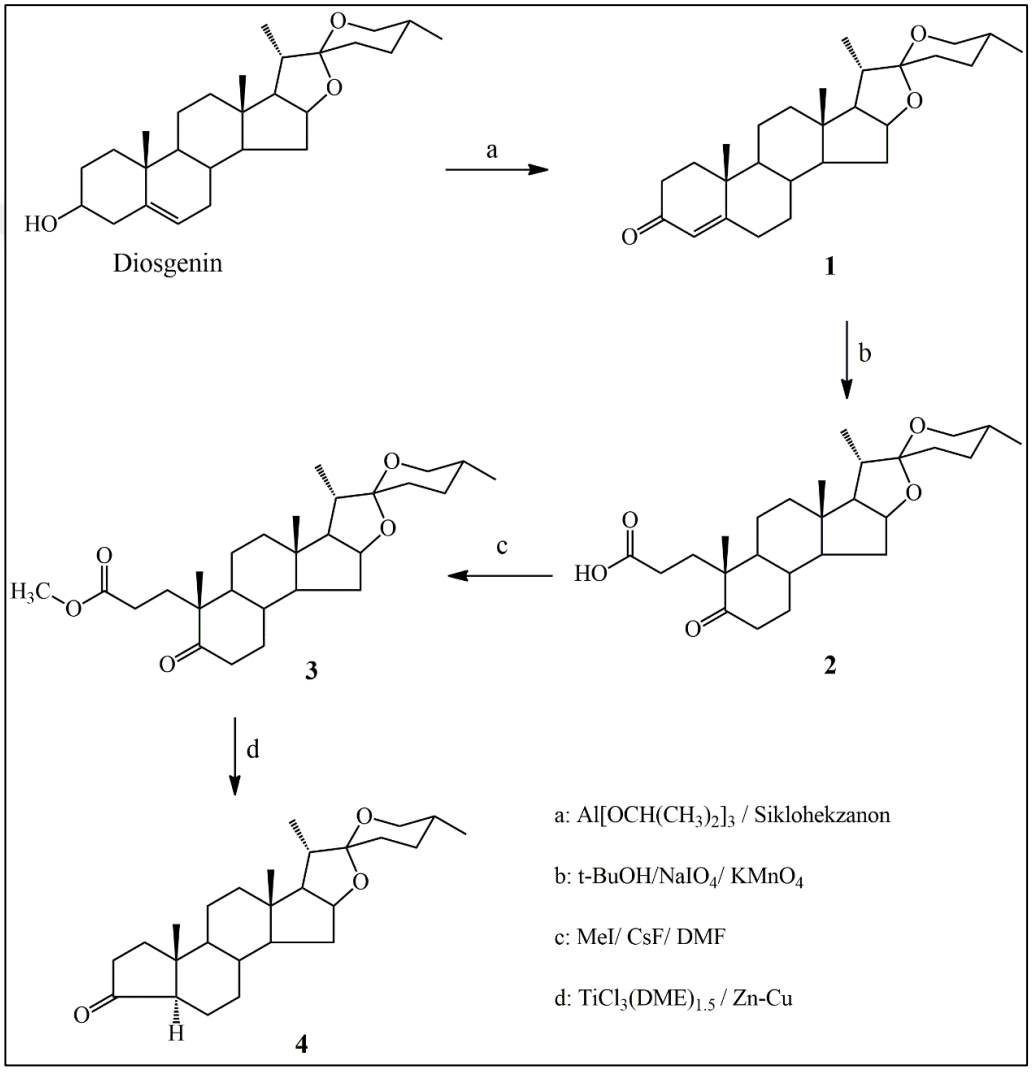
Tablo 2.1. (Devam) Sentez, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler

| Adı | Firma | Saflık Derecesi |
|---|---|---|
| Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) | Fluka | Susuz |
| ε-Kaprolakton (ε-cL) | A. Aesar | %99 |
| Kloroform ($CHCl_3$) | Merck | ACS reaktifi |
| (3-kloro-2-hidroksipropil)trimetilamonyum klorür | Aldrich | %60 su içinde |
| m-Kloroperbenzoik asit (mCPBA) | Aldrich | ≤ %77 |
| Krom trioksit ($CrO_3$) | Merck | Analiz için |
| Kurkumin | Sigma | Longa tozu |
| Lityum alüminyum hidrür($LiAlH_4$) | Aldrich | Reagent grade |
| Metil iyodür (MeI) | Aldrich | > %99,5 |
| Metoksi poli (etilen glikol) 5000 (mPEG-5000) | Aldrich | Toz |
| Mikro kristalin selüloz | A. Aesar | 20 μm |
| Piridin | Merck | Analiz saflığı |
| Piridinyum klorokromat (PCC) | Aldrich | %98 |
| Polisorbat 80 (Tween 80) | Aldrich | Analiz saflığı |
| Poli (vinil alkol) | Aldrich | %98-99 |
| Potasyum karbonat ($K_2CO_3$) | Aldrich | > %99 |
| Potasyum permanganat ($KMnO_4$) | A. Aesar | > %98 |
| Propargil bromür | Aldrich | % 80 ksilen |
| Sezyum flüorür (CsF) | Aldrich | > %99 |
| Siklohekzanon | Merck | Sentez için |
| Sodyum aljinat | Aldrich | 120-200 KDa |
| Sodyum asetat (NaOAc) | Merck | ACS reaktifi |
| Sodyum askorbat | A. Aesar | %99 |
| Sodyum azid ($NaN_3$) | Aldrich | > %99 |
| Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) | Merck | Reagent grade |
| Sodyum bisülfit ($NaHSO_3$) | Aldrich | ACS Reagent |
| Sodyum bor hidrür ($NaBH_4$) | Sigma | %99 |
| Sodyum hidroksit (NaOH) | Aldrich | Pellet |
| Sodyum hidrür (NaH) | Aldrich | Kuru |
| Sodyum iyodür (NaI) | Aldrich | > %99,5 |
| Sodyum metoksit (NaOMe) | A. Aesar | %98 |
| Sodyum nitrit ($NaNO_2$) | Aldrich | ACS |
| Sodyum ortofosfat ($NaH_2PO_4$) | Merck | ACS reaktifi |
| Sodyum periyodat ($NaIO_4$) | Aldrich | > %99 |
| Sodyum sülfat ($Na_2SO_4$) | Merck | Susuz |
| Sodyum sülfit ($Na_2SO_3$) | Merck | Susuz |
| Sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) | Aldrich | %99 |
| Süksinik anhidrit | Aldrich | > %99 |
| Sülfürik asit ($H_2SO_4$) | C. Erba | %95-97 |
| Tetrahidrofuran (THF) | Aldrich | HPLC için |
| Trietilamin ($Et_3N$) | Merck | Sentez için |
| Titanyum (III) klorür ($TiCl_3$) | Aldrich | Reagent Plus |
| p-Toluen sülfonil klorür (TsCl) | Aldrich | > %99 |
| Quinalizarin | Aldrich | ≥ %95 |

## 2.2. Deneysel Yöntem

### 2.2.1. A halkasındaki reaksiyonlar

Bu kısımda A halkasındaki reaksiyonlar ile türev maddelerin sentezi gerçekleştirildi. Bu türev maddelere ait reaksiyon basamakları, 3-Keto A-Norspirostanlar ve 2-Keto Nor-spirostanlar olmak üzere sırasıyla Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de özetlendi.




Şekil 2.1. 3-Keto A-Nor-spirostanın sentezi

#### 2.2.1.1. Bileşik 1'in sentezi

Diosgenin (5 g; 12,05 mmol) önce oda sıcaklığında toluen (30 mL) içerisinde çözündü. Reaksiyon karışımına sırasıyla siklohekzanon (11,835 g; 120,5 mmol) ve $Al(O\text{-}i\text{-}Pr)_3$ (1,247 g; 6,105 mmol) ilave edildi.

Reaksiyon karışımı 2 saat boyunca 120 °C kaynama sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK (4:1 etilasetat: hekzan) sistemi ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım oda sıcaklığına soğutularak üzerine sulu $H_2SO_4$ çözeltisi (%10, 50 mL) ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Karışımdan toluen fazı döner buharlaştırıcı yardımı ile uzaklaştırıldı. Geriye kalan faz EtOAc (2x 150 mL) ile ekstrakte edildi. Toplanan organik fazlar $Na_2SO_4$ ile kurutuldu ve süzüldü. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım bir gece oda sıcaklığında bekledikten sonra beyaz katı kristal olarak ayrıldı ve süzüldü. Kristaller hekzan ile yıkandı ve vakum etüvünde 50 °C'de bir gece boyunca kurutuldu. Bileşik 1'in ((25R)-Spirost-4-en-3-on) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 4,5 g (%90), beyaz katı. EN: 185-190 °C (lit:188-190 °C).

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2857, 1675, 1615, 1452, 1250, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,72 (s, 1H, H-4); 4,42-4,37 (dd, $J_1$= 12,0 Hz, $J_2$= 6,0 Hz, 1H, H-16); 3,47-3,45 (m, 1H, H-26); 3,36 (t, J= 17,0 Hz, 1H, H-26); 2,43 (m, 1H), 2,40 (m, 1H); 1,19 (s, 3H, H-21); 0,97 (d, J= 5,6 Hz, 3H, H-19); 0,81 (s, 3H, H-18); 0,78 (d, J= 5,0 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{27}H_{40}O_3$ hesaplanan C, 78,60; H, 9,77; O, 11,63, bulunan C, 78,51; H, 9,67; O, 11,35.

### 2.2.1.2. Bileşik 2'nin sentezi

Bileşik 1 (4g; 9,69 mmol) ve $K_2CO_3$ (4.019g; 29,08 mmol) yaklaşık 85 °C'de kaynayan t-BuOH (380 mL) içerisinde çözündü. Daha sonra reaksiyon karışımına $NaIO_4$ (9,745g; 45,56 mmol) ve potasyum permanganatın (0,612g; 3,87 mmol) 380 mL sudaki çözeltisi eklendi ve reaksiyon karışımı 60 °C'ye ısıtıldı. Reaksiyon karışımı 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (6:4 etilasetat: hekzan) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra yükseltgenme reaktiflerinin fazlasını gidermek için karışıma katı $NaHSO_3$ ilave edildi ve seyreltik HCl ile asitlendirildi.

Reaksiyon karışımı ayırma hunisine alınarak dietileter ile ekstrakte edildi. Organik faz daha sonra iki kere sulu $NaS_2O_3$ çözeltisi ve ardından tuz çözeltisi ile yıkandı. Toplanan organik fazlar susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu ve süzüldü. Çözücüsü döner

buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Bileşik 2'nin (5-okso-3,5-seko-4-Norspirostan-3-karbosiklik asit) yapısı $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 3,7 g, (%88), beyaz katı, EN: 197-199 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2940, 2859, 1708, 1646, 1455, 1259, 1051.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,43-4,39 (dd, $J_1$= 12,0 Hz, $J_2$= 6,0 Hz, 1H, H-16); 3,49-3,46 (m, 1H, H-16); 3,34-3,38 (t, J= 17,6 Hz, 1H, H-26); 2,52-2,59 (td, $J_1$= 16,4, Hz, $J_2$= 5,0 Hz, 1H, H-2); 1,13 (s, 3H, H-21); 0,97 (d, J= 6,0 Hz, 3H, H-19); 0,84 (s, 3H); 0,78 (d, J= 5,0 Hz, 3H, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 214,8; 179,4; 109,4; 80,6; 67,0; 62,0; 55,6; 50,5; 48,0; 41,7; 40,6; 39,4; 38,1; 34,6; 31,9; 31,5; 31,4; 30,4; 29,3; 29,2; 28,9; 21,3; 20,6; 17,2; 16,5; 14,6.

Elementel analiz: $C_{26}H_{40}O_5$ hesaplanan C, 72,19; H, 9,32; O, 18,49, bulunan C, 71,91; H, 9,26; O, 18,18.

HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{26}H_{40}O_5$ hesaplanan 455,27516; bulunan 455,27374.

### 2.2.1.3. Bileşik 3'ün sentezi

Bileşik 2 (3 g; 6,93 mmol), CsF (1,58 g; 10,4 mmol) ve MeI'ün (1,47g; 10,4 mmol) DMF (20 mL) içerisindeki karışımı 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (0,5:9,5 EtOAc: petrol eteri) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra üzerine doygun $NaHCO_3$ çözeltisi ilave edildi ve bu şekilde bir süre karıştırıldı. Daha sonra EtOAc ile ekstrakte edildi ve toplanan organik fazlar susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Bileşik 3 silika jel üzerinde EtOAc: petrol eteri (%15-25) yürütücü sistemi ile saflaştırıldı. Bileşik 3'ün (Metil 5-okso-3,5-seko-4-Norspirostan-3-karboksilat) yapısı $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,7 g (87%), beyaz katı. EN: 104-106 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2948, 2856, 1738, 1709, 1456, 1250, 1051.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,42-4,38 (dd, $J_1$= 11,8 Hz, $J_2$= 5,4 Hz, 1H, H-16); 3,65 (s, 3H); 3,48-3,46 (m, 1H); 3,35 (t, J= 17,4 Hz, 1H); 2,59-2,51 (td, $J_1$= 16,8, Hz, $J_2$= 5,0 Hz, 1H, H-2); 1,12 (s, 3H, H-21); 0,97 (d, J= 5,0 Hz, 3H, H-19); 0,83 (s, 3H); 0,78 (d, J= 5,2 Hz, 3H, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 214,4; 174,4; 109,2; 80,5; 67,2; 62,3; 56,0; 51,9; 50,8; 48,1; 42,0; 40,9; 39,8; 38,3; 34,9; 32,1; 31,7 (2C); 30,6; 29,8; 29,4; 29,1; 21,6; 20,9; 17,5; 16,7; 14,8.

Elementel analiz: $C_{27}H_{42}O_5$ hesaplanan C, 72,61; H, 9,48; O, 17,91, bulunan C, 72,34; H, 9,36; O, 17,83.

HRMS (m/z):$(M+H)^+$, $C_{27}H_{42}O_5$ hesaplanan 447,30656; bulunan 447,30872.

#### 2.1.1.4. Bileşik 4'ün sentezi

Çinko-Bakır (Zn-Cu) alaşımının hazırlanması

Zn tozu (20g; 305,85 mmol), içerisinden azot gazı geçirilmiş saf su (80 mL) üzerine ilave edildi ve karışım 15 dakika boyunca tekrar azot gazı ile muamele edildi. Daha sonra bu karışıma $CuSO_4$ (1,53 g; 9,59 mmol) ilave edildi. Bu siyah renkli karışım azot gazı altında süzüldü. Daha sonra sırasıyla içerisinden azot gazı geçirilmiş su, aseton ve eter ile yıkandı. Daha sonra vakum etüvünde 60 °C'de kurutuldu. Vakum altında saklandı.

Üç boyunlu bir reaksiyon balonuna geri soğutucu ve damlatma hunisi yerleştirildi. Bu sistem içerisindeki hava 15 dakika boyunca vakum ile alındı ve ardından sistem içerisinden 15 dakika boyunca azot gazı geçirildi. $TiCl_3(DME)_{1.5}$ (mavi-siyah renkli karışım) kompleksinin hazırlanması için reaksiyon balonuna $TiCl_3$ (12,94g; 83,96 mmol) (mor) ve kuru DME (180 mL) ilave edildi. Reaksiyon karışımı 24 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Bu süre sonrasında karışıma azot gazı altında Zn-Cu alaşımı (17,26 g; 245,17 mmol) ilave edildi ve iki saat daha kaynatmaya devam edildi. Daha sonra bileşik 3'ün (2,5 g; 5,59 mmol) kuru DME (50 ml ) içerisindeki çözeltisi reaksiyon karışımına 3 saat boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı 12 saat daha kaynatıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: petrol eteri (0,3:9,7)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve çözücüsü döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar uçuruldu. Ham ürün sırasıyla DCM içerisinde çözündü, doygun tuz çözeltisi ile yıkandı, organik faz ayrıldı, susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu ve filtre edildi.

Çözücüsü tekrar döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve bileşik 4 silika jel üzerinde EtOAc: hekzan (% 0,5-1) yürütücü sistemi ile saflaştırıldı. Bileşik 4'ün (A-Nor-5β-Spirostan-3-on) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,05 g (%47), beyaz kristal. EN: 193-195 $^{\circ}$C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2949, 2850, 1729, 1456, 1250, 1051.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,38-4,33 (dd, $J_1$= 11,8 Hz, $J_2$= 6,0 Hz, 1H, H-16); 3,47-3,44 (m, 1H, H-26); 3,35 (t, J= 17,4 Hz, 1H, H-26); 2,28-2,18 (m, 1H); 1,15 (s, 3H, H-21); 0,95 (d, J= 5,6 Hz, 3H, H-19); 0,78 (d, J= 5,0 Hz, 6H, H-18, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 220,1; 109,5; 80,8; 67,0; 62,5; 59,1; 56,3; 45,2; 41,7; 41,6; 40,7; 40,0; 34,9; 34,9; 31,8; 31,5; 31,4; 30,4; 28,9; 28,3; 22,4; 22,3; 19,8; 17,3; 16,8; 14,9.

Elementel analiz: $C_{26}H_{40}O_3$ hesaplanan C, 77,95; H, 10,06; O, 11,98, bulunan C, 77,80; H, 9,09; O, 18,12.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{26}H_{40}O_3$ hesaplanan 401,30922; bulunan 400,30867.

### 2.2.1.5. Bileşik 5'in sentezi

Diosgenin (5 g; 12,08 mmol) oda sıcaklığında DCM (250 mL) içerisinde çözündü ve içerisine sırasıyla PCC (2,16 g; 10,04 mmol) ve $CaCO_3$ (1 g; 10,04 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra karışım dietileter (100 mL) ile seyreltildi. Krom kalıntılarını uzaklaştırmak için karışım kısa bir kolondan (Celite) geçirildi. Çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra, ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (silika jel, mobil faz: etilasetat: hekzan (1:9)). Bileşik 5'in ((25R)-Spirost-5-en-3-on) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 4,2 g (%84), beyaz kristal. EN: 195-196 °C (lit: 194-195 °C) [47].

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2960, 2850, 1720,1680, 1460, 1240, 1050.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, δ, ppm): 5,3 (s, 1H, H-6); 4,41 (dt, $J_1$= 8,0 Hz, $J_2$= 6,5 Hz, 1H, H-16); 3,45 (m, 1H, H-26α); 3,36 (t, J= 10,8 Hz, 1H, H-26β); 1,19 (s, 3H, H-19); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,81 (s, 3H, H-18); 0,78 (d, J= 6,4 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{27}H_{40}O_3$ hesaplanan C, 78,60; H, 9,77; O, 11,63, bulunan C, 78,35; H, 9,69; O, 11,52.

### 2.2.1.6. Bileşik 6'nın sentezi

$CrO_3$ (3,24 g; 32,44 mmol); $H_2SO_4$ (%98; 4,76 mL) ve su (22,6 mL) ile hazırlanmış karışım, bileşik 5'in (3,5 g; 8,48 mmol) asetik asit (24 mL) içerisinde 65 °C'ye ısıtılmış çözeltisine damla damla ilave edildi. Reaksiyon 70 °C'de bir saat boyunca karıştırıldı.

Ardından su-buz karışımı (150 mL) reaksiyon karışımına ilave edildi ve bir saat daha oda koşullarında karıştırılmaya devam edildi. Bu süre sonunda çöken ürün sırasıyla filtre edildi, bol miktarda su ile yıkandı ve bir gece oda sıcaklığında vakum altında kurutuldu. Bileşik 6'nın (2,3-seko-5α-spirostan-2,3-dioik asit) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,8 g (%71), beyazımsı katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3150, 2950, 2850, 1720,1690, 1050.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,3 (s, 1H, H-6); 4,47 (q, J= 7,0 Hz, 1H, H-16); 3,49 (m, 1H, H-26α); 3,36 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 1,25 (s, 3H, H-19); 0,96 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,79 (s, 3H, H-18); 0,77 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{27}H_{40}O_6$ hesaplanan C, 70,41; H, 8,75; O, 20,84, bulunan C, 70,15; H, 8,53; O, 20,62.

### 2.2.1.7. Bileşik 7'nin sentezi

Bileşik 6 (2 g; 4,34 mmol), asetik anhidrit (13 mL) ve sodyum asetat (0,385 g; 4,7 mmol) karışımı bir gece boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Asetik anhidrit vakum altında uzaklaştırıldı. Karışım su içerisine alındı ve DCM (3x100 mL) ile ekstrakte edildi. Toplanan organik fazlar sırasıyla %10'luk $NaHCO_3$ ve tuz çözeltisi ile yıkanarak susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uçurulduktan sonra elde edilen Bileşik 7'nin (A-Nor-5α-spirostan-2-on) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,03 g (%60), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2850, 1740, 1456, 1250, 1051.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,51 (s, 1H, H-6); 4,38-4,33 (q, J= 7,2 Hz 1H, H-16); 3,47-3,44 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,35 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 3,10 (dd, 2H); 2,22 (dt, 2H); 1,15 (s, 3H); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,78 (d, 3H); 0,77 (s, 3H).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 217,0; 141,7; 122,1; 109,8; 80,8; 67,0; 62,7; 58,8; 56,4; 41,7; 41,6; 40,4; 40,1; 34,8; 31,9; 31,8; 31,5; 30,1; 28,9; 22,3; 22,4; 22,1; 19,8; 17,8; 16,6; 14,1.

Elementel analiz: $C_{26}H_{38}O_3$ hesaplanan C, 78,35; H, 9,61; O, 12,03, bulunan C, 78,27; H, 9,41; O, 11,98.

HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{26}H_{38}O_3$ hesaplanan 421,26537; bulunan 421,26388.

### 2.2.1.8. Bileşik 8'in sentezi

Bileşik 1'in (4 g; 9,69 mmol) THF (30 mL) içerisindeki çözeltisine oda sıcaklığında etil format (2,51 g; 33,93 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımının sıcaklığı 0 °C'ye soğutulduktan sonra üzerine NaH (0,465 g; 19,38 mmol) ilave edildi. Reaksiyon sıcaklığı yavaş yavaş oda sıcaklığına getirildi ve 1,5 saat boyunca karıştırıldı. Başlangıçta beyaz süspansiyon halinde olan reaksiyon karışımı reaksiyon ilerledikçe koyu turuncu bir renge dönüştü. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım THF ile seyreltildi ve organik faz sırasıyla doygun $NaH_2PO_4$ çözeltisi (2x20 mL), doygun $NaHCO_3$ çözeltisi (2x20 mL) ve su (2x20 mL) ile yıkandı. Sonra susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutularak çözücüsü döner buharlaştırıcı ile uçuruldu. Bileşik 8'in (2-hidroksimetilen-spirost-4-en-3-on) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 4 g (%94), sarı-turuncu katı. EN: 91-93 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2960, 2850, 1630, 1580, 1450, 1380, 1180,1060, 970, 890.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,73 (bs, 1H, =CH-OH); 7,37 (s, 1H, =CH-OH); 5,77 (s, 1H, H-4); 4,41 (dt, $J_1$= 15,0 Hz, $J_2$= 7,4 Hz, 1H, H-16); 3,46 (m, 1H, H-26α), 3,36 (t, $J_1$= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 1,04 (s, 3H, H-19); 0,98 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,81 (s, 3H, H-18); 0,78 (d, J= 6,4 Hz, 3H, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 189,2; 170,1; 165,3; 123,1; 109,4; 106,6; 80,7; 67,0; 62,2; 55,8; 53,2; 41,8; 40,5; 40,1; 39,8; 37,6; 35,4; 32,5; 31,9; 31,6; 31,5; 30,4; 28,9; 21,3; 18,2; 17,3; 16,4; 14.7.

Elementel analiz: $C_{28}H_{40}O_4$ hesaplanan C, 76,33; H, 9,15; O, 14,52, bulunan C, 76,14; H, 9,03; O, 14,27.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{28}H_{40}O_4$ hesaplanan 441,28662; bulunan 441,28516.

### 2.2.1.9. Bileşik 9'un sentezi

Bileşik 8'in (0,5 g; 1,134 mmol), THF (16 mL) ve $CH_3OH$ (11 mL) içerisindeki karışımının sıcaklığı 0 °C'ye düşürüldükten sonra üzerine $NaBH_4$ (0,166 g; 4,4 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyonu durdurmak için karışım üzerine su (1 mL) eklendi ve etil asetat (30 mL) ile seyreltildi. Daha sonra sırasıyla su ve doygun tuz çözeltisi ile yıkandı, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu.

Çözücüsü döner buharlaştırıcı yardımı ile vakum altında uzaklaştırıldı. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: petrol eteri: aseton (2:1)). Bileşik 9'un (2-hidroksimetil-3-hidroksi-spirost-4-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,35 g (%70), beyaz katı. EN: 231-234 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3410, 2950, 2860, 1450, 1240, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,23 (s, 1H, H-4); 4,39 (td, $J_1$= 18,0 Hz, $J_2$= 3,2 Hz, 1H, H-16); 4,08 (d, J= 9,0 Hz, 1H, H-3); 3,74 (m, 2H, 2´-$CH_2$OH); 3,46 (m, 1H, H-26α); 3,36 (t, J= 11,0 Hz, 1H,H-26β); 1,08 (s, 3H, H-19); 0,95 (dd, $J_1$= 7,0 Hz, J= 2,2 Hz, 3H, H-21); 0,79 (d, J= 1,8 Hz, 3H, H-18); 0,77 (s 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{28}H_{44}O_4$ hesaplanan C, 75,63; H, 9,97; O, 14,39, bulunan C, 75,42; H, 9,86; O, 14,26.

### 2.2.2. B halkasındaki reaksiyonlar

Bu kısımda B halkasındaki reaksiyonlar ile spirostan türevlerinin sentezi üç farklı yöntem ile gerçekleştirildi. Bu türev maddelere ait reaksiyon basamakları Şekil 2.3, Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te özetlendi.

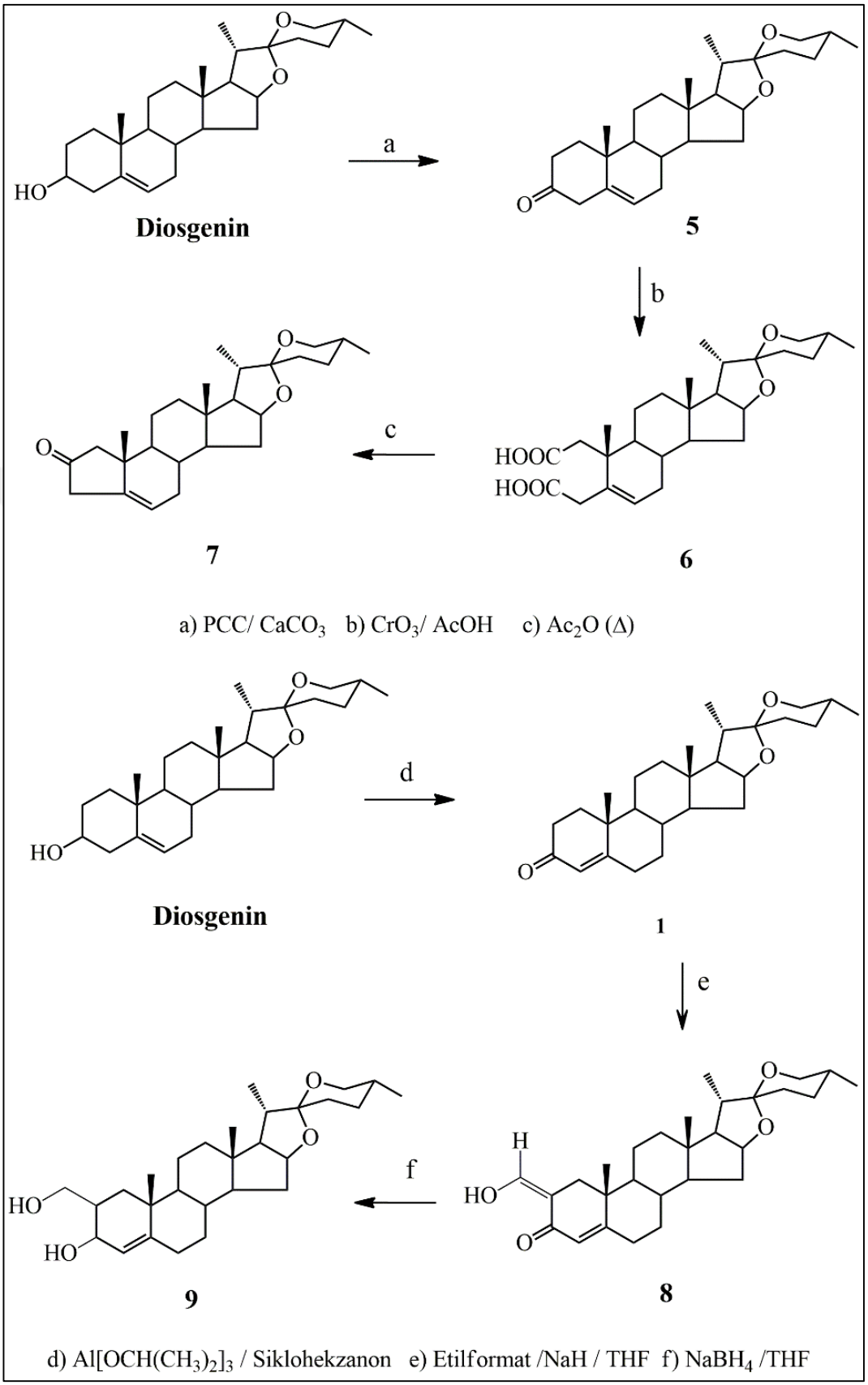
#### 2.2.2.1. Bileşik 10'un sentezi

Diosgenin (5 g, 12,05 mmol) piridin (10 mL) içerisinde çözündü. Üzerine asetik anhidrit (5 mL, 52,5 mmol) ilave edildi ve reaksiyon karışımı bir gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (etilasetat: n-hekzan (1:1)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon balonunun içerisine buz parçaları atıldı ve bir saat boyunca karıştırıldı. Oluşan beyaz çökelek süzüldü ve az miktarda n-hekzan ile yıkandı. Bileşik 1 saflaştırma işlemi yapılmadan elde edildi.

Ham ürün EtOAc ile kristallendirme yapıldı ve iğne formunda kristal halinde elde edildi. Bileşik 10'un ((25R)-3β-asetoksi-spirost-5-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 5,17 g (%94), beyaz iğne kristal. EN: 181-185 °C (lit:188,5-189 °C) [48].

FTIR (ATR, $cm^{-1}$) :2940, 2857, 1720, 1450, 1235, 1045.




Şekil 2.2. A halkasındaki reaksiyon ile türev maddelerin ve 2-Keto A-Nor-spirostanların sentezi

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,36 (d, J= 4,4 Hz, 1H, H-6); 4,59 (m, 1H, H-3); 4,40 (q, J= 7,2 Hz 1H, H-16); 3,45 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,36 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 2,02 (s, 3H, $OCOCH_3$); 1,03 (s, 3H, H-19); 0,96 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,78 (d, J= 4,0 Hz, 6H, H-18, H-27).
Elementel analiz: $C_{29}H_{44}O_4$ hesaplanan C, 76,27; H, 9,71; O, 14,01, bulunan C, 75,97; H, 9,62; O, 13,87.

### 2.2.2.2. Bileşik 11'in sentezi

Bileşik 10'un (4,6 g; 10 mmol) aseton (100 mL) içerisindeki çözeltisine sırasıyla NHPI (0,163 g; 1 mmol), $Co(OAc)_2$ (0,019 g; 0,1 mmol) ve TBHP (5,149 g; 40 mmol) eklendi. Oda sıcaklığında 12 saat boyunca reaksiyon karıştırıldı. Reaksiyon kontrolü İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (1:4)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra $Na_2SO_3$ çözeltisi (%10'luk) ile muamele edildi ve DCM ile ekstrakte edildi. Organik faz $NaHCO_3$ doygun çözeltisi ile yıkandı ve susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Filtre edildikten sonra döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel mobil faz: n-hekzan/ EtOAc (8:1)). Bileşik 11'in ((25R)-3β-asetoksi-spirost-5-en-7-on) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.
Verim: 4,7 g (%79), beyaz katı. EN: 187-188 °C (lit:184,5-185,5 °C) [49].
FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2850, 1730, 1670, 1640, 1460, 1240, 1050.
$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,70 (d, J= 1,8 Hz, 1H, H-6); 4,69 (m, 1H, H-3) 4,47 (m, 1H, H-16); 3,47 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,38 (t, J= 11,00 Hz, 1H, H-26 aks.), 2,04 (s, 3H, $OCOCH_3$); 1,22 (s, 3H, H-19); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,79 (s, 3H, H-18); 0,77 (s, 3H, H-27).
Elementel analiz: $C_{29}H_{42}O_5$ hesaplanan C, 74,01; H, 8,99; O, 17,00; bulunan C, 73,82; H, 8,81; O, 16,93.

### 2.2.2.3. Bileşik 12'nin sentezi

Bileşik 11 (3 g; 6,37 mmol) ve $K_2CO_3$ (2,642 g; 19,12 mmol) yaklaşık 85 °C'de kaynayan t-BuOH (250 mL) içerisinde çözündü. Daha sonra $NaIO_4$ (6,408 g; 29,95 mmol) ve $KMnO_4$'ın (0,402 g; 2,54 mmol) 250 mL sudaki çözeltisi reaksiyon karışımına eklendi ve karışım 60 °C'ye ısıtıldı. Reaksiyon karışımı 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (6:4)) ile yapıldı.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra yükseltgenme reaktiflerinin fazlasını gidermek için karışıma katı $NaHSO_3$ ilave edildi ve seyreltik HCl ile asitlendirildi. Reaksiyon karışımı ayırma hunisine alınarak dietileter (4 x 200 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz daha sonra iki kere sulu $Na_2S_2O_3$ çözeltisi (2 x 150 mL) ve ardından tuz çözeltisi ile yıkandı. Toplanan organik fazlar susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu ve süzüldü. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Bileşik 12'nin (5-okso-5,7-seko-6-Norspirost-3-en-7-karboksilik asit) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,85 g (%91), beyaz katı. EN: 116-120 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2960, 2840, 1730, 1670, 1460, 1240, 1040.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,81 (m, 1H, H-3); 5,92 (dt, $J_1$= 10,8 Hz, $J_2$= 2,4 Hz, 1H, H-4), 4,37 (m, 1H, H-16); 3,43 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,33 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 1,06 (s, 3H, H-19); 0,96 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,77 (d, J= 7,0 Hz, 6H, H-18, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 202,3; 180,9; 146,8; 129,1; 109,3; 80,08; 66,9; 61,8; 51,2; 47,6; 43,9; 42,0; 40,8; 40,1; 39,1; 33,1; 32,6; 31,5; 30,3; 28,8; 22,8; 22,6; 18,3; 17,2; 15,8; 14,5.

Elementel analiz: $C_{26}H_{38}O_5$ hesaplanan C, 72,53; H, 8,90; O, 18,58, bulunan C, 72,26; H, 8,89; O, 18,37.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{26}H_{38}O_5$ hesaplanan 431,27483; bulunan 431,27486.

#### 2.2.2.4. Bileşik 13'ün sentezi

Bileşik 12 (2 g; 4,64 mmol), CsF (1,05 g; 6,96 mmol) ve MeI'ün (0,98 g; 6,96 mmol) DMF (10 mL) içerisindeki karışımı 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (etilasetat: petrol eteri (0,5:9,5)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra üzerine doygun $NaHCO_3$ çözeltisi ilave edildi ve bir süre karıştırıldı. Daha sonra EtOAc ile ekstrakte edildi ve toplanan organik fazlar susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Bileşik 4 silika jel üzerinde etilasetat: petrol eteri (1:99) yürütücü sistemi ile saflaştırıldı. Bileşik 13'ün (Metil-5-okso-5,7-seko-6-Norspirost-3-en-7-karboksilat) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,8 g (%87), beyaz katı. EN: 146,8-150,2 °C.

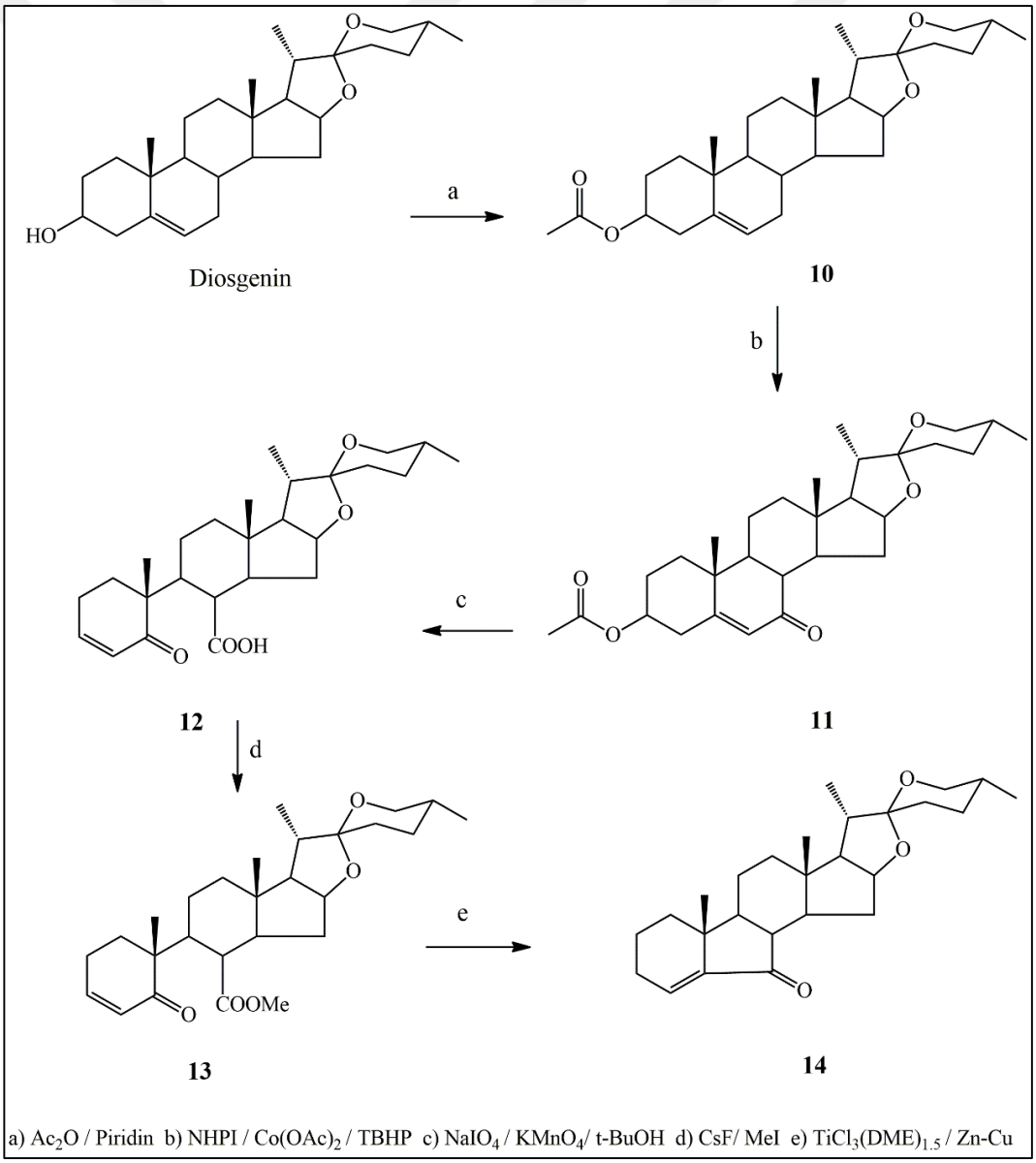
FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2870, 1733, 1677, 1450, 1250, 1051.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,78 (m, 1H, H-3); 5,83 (dt, $J_1$= 10,0 Hz, $J_2$= 2,2 Hz, 1H, H-4); 4,35 (m, 1H, H-16); 3,56 (s, 3H, $COOCH_3$); 3,44 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,32 (t, J= 10,8 Hz, 1H, H-26 aks.); 1,04 (s, 3H, H-19); 0,96 (s, 3H, H-21); 0,77 (s 6H, H-18, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 204,5; 175,7; 146,8; 129,1; 109,3; 80,08; 66,9; 61,8; 52,9; 51,2; 47,6; 43,9; 42,0; 40,8; 40,1; 39,1; 33,1; 32,6; 31,5; 30,3; 28,8; 22,7; 22,6; 18,3; 17,2; 15,8; 14,7.

Elementel analiz: $C_{27}H_{40}O_5$ hesaplanan C, 72,94; H, 9,07; O, 17,99; bulunan C, 72,78; H, 8,91; O, 17,77.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{27}H_{40}O_5$ hesaplanan 445,29816; bulunan 445,29322.




Şekil 2.3. B-Nor-spirostanın sentezi

### 2.2.2.5. Bileşik 14'ün sentezi

Çinko-Bakır (Zn-Cu) alaşımının hazırlanması

Zn tozu (20 g; 305,85 mmol), içerisinden azot gazı geçirilmiş saf su (80 mL) üzerine ilave edildi ve karışım 15 dakika boyunca azot gazı ile muamele edildi. Daha sonra bu karışıma bakır (II) sülfat (1,53 g; 9,59 mmol) ilave edildi. Bu siyah renkli karışım azot gazı altında süzüldü. Daha sonra sırasıyla içerisinden azot gazı geçirilmiş su, aseton ve eter ile yıkandı. Daha sonra vakum etüvünde 60 °C'de kurutuldu. Vakum pompası bağlı desikatör içerisinde oda sıcaklığında saklandı.

Üç boyunlu bir reaksiyon balonuna geri soğutucu ve damlatma hunisi yerleştirildi. Bu sistem içerisindeki hava 15 dakika boyunca vakum ile alındı ve ardından sistem içerisinden 15 dakika boyunca azot gazı geçirildi. $TiCl_3(DME)_{1.5}$ (mavi-siyah renkli karışım) kompleksinin hazırlanması için reaksiyon balonuna $TiCl_3$ (5 g; 32,42 mmol) (mor) ve kuru DME (70 mL) ilave edildi. Reaksiyon karışımı 24 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Bu süre sonrasında karışıma azot gazı altında Zn-Cu alaşımı (5,7 g; 81,05 mmol) ilave edildi ve iki saat daha kaynatmaya devam edildi. Daha sonra bileşik 13'ün (0,6 g; 1,34 mmol) kuru DME (12 mL) içerisindeki çözeltisi reaksiyon karışımına 3 saat boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı 12 saat bu sıcaklıkta karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (etil asetat: petrol eteri (0,5:9,5)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ham ürün sırasıyla, DCM ile çözündü, doygun tuz çözeltisi ile yıkandı, organik faz ayrıldı, sodyum sülfat üzerinde kurutuldu ve filtre edildi.

Çözücüsü tekrar döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve silika jel üzerinde EtOAc: n-hekzan (0,5:99,5) yürütücü sistemi ile saflaştırıldı. Bileşik 14'ün (B-Nor-5β-spirost-3-en-6-on) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,25 g (%46), beyaz kristal. EN: 190-193,8 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2952, 2868, 1733, 1452, 1240, 1051.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,60 (t, J= 3,8 Hz, 1H, H-4); 4,45 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,44 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,39 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 1,06 (s, 3H, H-19); 0,98 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,79 (d, J= 5,2 Hz, 6H, H-18, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 217,8; 146,4; 131,8; 109,5; 81,5; 67,0; 61,2; 54,6; 50,9; 48,6; 42,9; 41,6; 39,7; 38,6; 35,0; 31,7; 31,5; 30,4; 28,8; 25,1; 21,3; 19,1; 18,1; 17,2; 16,8; 14.6.

Elementel analiz: $C_{26}H_{38}O_3$ hesaplanan C, 78,35; H, 9,61; O, 12,04, bulunan C, 78,11; H, 9,50; O, 12,00.

HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{26}H_{38}O_3$ hesaplanan 421,26614; bulunan 421,26552.

### 2.2.2.6. Bileşik 15'in sentezi

Bileşik 10'un (5,2 g; 11,38 mmol) $CHCl_3$ (20 mL) içerisindeki çözeltisine m-CPBA (3,14 g; 18,21 mmol) oda sıcaklığında ilave edildi. Reaksiyon yaklaşık yarım saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (3:1)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım $CHCl_3$ (25 mL) ile seyreltildi ve sırasıyla sulu $Na_2SO_3$, sulu $Na_2CO_3$ ve su ile yıkandı. Organik faz susuz $Na_2SO_4$ ile kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Epoksitlendirme reaksiyonunda 5α, 6α-epoksit ve 5β, 6β-epoksit karışımı elde edildi ve saflaştırma yapmadan diğer aşamaya geçildi. Bileşik 15'in (3β-Asetoksi-5,6-epoksi-spirostan) yapısı FTIR ve $^1$H-NMR spektroskopisi teknikleri ile aydınlatıldı.

Verim: 5,12 g (%95), beyaz kristal. EN: 204-208 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2944, 2560, 1730, 1454, 1240, 1040.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,94-4,76 (m, 1H, H-3); 4,37 (m, 1H, H-16); 3,45 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,35 (td, $J_1$= 11,00 Hz, $J_2$= 4,0 Hz,1H, H-26 aks.); 3,08-2,89 (m, 1H, H-6); 2,01 (s, 3H, $OCOCH_3$); 1,06 (s, 3H, H-19); 0,98 (s, 3H, H-21); 0,79 (s, 3H, H-27); 0,78 (s, 3H, H-18).

### 2.2.2.7. Bileşik 16'nın sentezi

Bileşik 15'in (4,2 g; 8,88 mmol) aseton (50 mL) içerisindeki çözeltisine, $CrO_3$'in (3,47 g; 34,74 mmol) su (16,5 mL) içerisindeki çözeltisi 0 °C'de 10 dakika boyunca damla damla ilave edildi.

Daha sonra karışım oda sıcaklığına getirildi ve aynı miktar $CrO_3$ sulu çözeltisi reaksiyon karışımına 20 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (1:3)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı içerisine su-buz karışımı (150 mL) ilave edildi. Oluşan kristaller filtre edildi ve 70 °C'de 3 saat boyunca vakum etüvünde kurutuldu.

Oluşan ham ürün Bileşik 16'nın (3β-asetoksi-5α-hidroksi-spirostan-6-on) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 3,7 g (%85), beyaz kristal. EN: 267-270 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3375, 2950, 2870, 1734, 1705, 1452, 1240, 1045.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,02 (m, 1H, H-3); 4,40 (q, J= 7,2 Hz, 1H, H-16); 3,47 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,35 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 2,7 (t, J= 12,2 Hz, 1H, H-7); 1,99 (s, 3H, $OCOCH_3$); 0,96 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,81 (s, 3H, H-19); 0,78 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-27); 0,74 (s, 3H, H-18).

Elementel analiz: $C_{29}H_{44}O_6$ hesaplanan C, 71,28; H, 9,08; O, 19,64, bulunan C, 71,00; H, 8,82; O, 19,53.

### 2.2.2.8. Bileşik 17'in sentezi

Bileşik 16 (3,5 g; 7,16 mmol), $CHCl_3$ (30 mL) içerisinde çözüldü ve soğuk su banyosu ile soğutuldu. m-CPBA (3,7 g; 21,48 mmol) reaksiyon balonuna 30 dakikalık bir sürede yavaş yavaş eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 20 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (1:4)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Bileşik 17 (3β-asetoksi-5-keto-5,6-seko-spirostan-6-karbosiklik asit) ve m-CPBA karışımı (7,53 g) elde edildi.

### 2.2.2.9. Bileşik 18'in sentezi

Asit karışımı (Bileşik 17 ve m-CPBA) (7 g) piridin (25 mL) içerisinde çözündü ve üzerine benzoil klorür (13,6 g; 97,09 mmol) eklendi.

Karışım oda sıcaklığında 16 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (1:4)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımına su (200 mL) ilave edildi ve etilasetat ile ekstrakte yapıldı. Organik faz sırasıyla NaOH (0,5 N), su ve doygun tuz çözeltisi ile yıkandı. Susuz $Na_2SO_4$ ile kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Oluşan ham ürün Bileşik 18'in (3β-Asetoksi-5β-hidroksi-B-norsiprostan-6β-oik asit-5,6-lakton) yapısı $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 3,47 g (%86), beyaz kristal. EN: 179-181°C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2925, 2850, 1799, 1730, 1452, 1240, 1050.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,99 (m, 1H, H-3); 4,41 (q, J= 7,5 Hz, 1H, H-16); 3,47 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,37 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 3,47 (d, J= 7,6 Hz, 1H, H-7); 2,04 (s, 3H, $OCOCH_3$); 1,02 (s, 3H, H-19); 0,97 (d, J= 6,8 Hz, 3H, H-21); 0,80 (s, 3H, H-27); 0,78 (s, 3H, H-18).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 170,9; 170,5; 109,4; 88,5; 80,6; 67,8; 67,0; 62,5; 61,8; 59,2; 55,0; 43,2; 42,6; 41,5; 39,1; 38,8; 35,1; 32,5; 31,5; 30,4; 30,4; 28,8; 25,1; 21,6; 21,4; 17,3; 17,2; 16,6; 14,6.

Elementel analiz: $C_{29}H_{42}O_6$ hesaplanan C, 71,57; H, 8,70; O, 19,73, bulunan C, 71,41; H, 8,52; O, 19,48.

HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{29}H_{42}O_6$ hesaplanan 509,28557; bulunan 509,28622.

### 2.2.2.10. Bileşik 19'un sentezi

Bileşik 18 (1 g; 2,05 mmol) 190 °C'ye getirilmiş silikon yağı banyosunda 10-15 dakika boyunca ısıtıldı. Bu işlem karbondioksit çıkışı bitene kadar sürdürüldü. Viskoz reaksiyon ürünü silika jel üzerinde saflaştırıldı. Yürütücü faz olarak etilasetat: petrol eteri (5:95) çözücü sistemi kullanıldı. Bileşik 19, EtOAc: petrol eteri karışımından kristallendirildi. Bileşik 19'un (3β-asetoksi-B-Norspirost-5en) yapısı $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,78g (%86), beyaz pelet. EN: 177-179 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2940, 2855, 1733, 1454, 1238, 1048.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,40 (s, 1H, H-6); 4,62 (m, 1H, H-3); 4,44 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,48 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,37 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 2,63 (dd, $J_1$= 4,8 Hz, $J_2$= 2,0 Hz, 1H, $H_\alpha$-4); 2,44 (dd, $J_1$= 5,0 Hz, $J_2$= 2,1 Hz, 1H, $H_\beta$-4); 2,03 (s, 3H, $OCOCH_3$); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,89 (s, 3H, H-19), 0,79 (s, 3H, H-27), 0,78 (s, 3H, H-18).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 170,6; 148,1; 126,1; 109,5; 81,3; 73,8; 67,0; 62,6; 61,9; 54,1; 45,6; 44,9; 42,5; 41,4; 40,2; 37,0; 32,8; 32,3; 31,5; 30,4; 28,9; 28,1; 21,5; 21,0; 17,3; 16,7; 15,1; 14,6.

Elementel analiz: $C_{28}H_{42}O_4$ hesaplanan C, 75,98; H, 9,56; O, 14,46, bulunan C, 75,72; H, 9,40; O, 14,13.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{28}H_{42}O_4$ hesaplanan 443,31581; bulunan 443,31482.

### 2.2.2.11. Bileşik 20'nin sentezi

Bileşik 19 (0,5 g; 1,12 mmol) MeOH (15 mL) içerisinde çözündü ve üzerine KOH (0,38 g; 3,8 mL su) sulu çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (3:7 EtOAc: n-hekzan) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra asetik asit ile nötralleştirildi ve çözücüsü vakum altında döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün $CHCl_3$ ile seyretildi ve organik faz sulu $NaHCO_3$ çözeltisi ve su ile yıkandı. Susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Çözücüsü vakum altında döner buharlaştırıcıda uçuruldu ve ürün EtOAc: petrol eteri ile kristallendirildi. Bileşik 20 'nin (3β-Hidroksi-B-Norspirost-5en) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,40 g (%90), beyaz iğne kristal. EN: 164-166 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3360, 2950, 2860, 1450, 1240, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,37 (s, 1H, H-6); 4,42 (q, J= 7,5 Hz, 1H, H-16); 3,55 (m, 1H, H-3); 3,48 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,37 (t, J= 10,8 Hz, 1H, H-26 aks.); 2,61 (dd, $J_1$= 4,6 Hz, $J_2$= 2,2 Hz, 1H, $H_\alpha$-4); 2,45 (dd, $J_1$= 4,8 Hz, $J_2$= 2,0 Hz, 1H, $H_\beta$-4); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,88 (s, 3H, H-19); 0,79 (d, J= 8,0 Hz, 6H, H-27, H-18).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 149,4; 125,1; 109,5; 81,3; 71,7; 67,0; 62,8; 61,8; 54,2; 46,6; 44,9; 42,5; 41,4; 40,2; 37,2; 36,7; 32,4; 32,1; 31,5; 30,4; 28,9; 21,1; 17,2; 16,7; 15,1; 14,6.

Elementel analiz: $C_{26}H_{40}O_3$ hesaplanan C, 77,95; H, 10,06; O, 11,98, bulunan C, 77,85; H, 10,01; O, 11,55.

HRMS (m/z):$(M+H)^+$, $C_{26}H_{40}O_3$ hesaplanan 400,29686, bulunan 400,29548.

### 2.2.2.12. Bileşik 21'in sentezi

Bileşik 18 (2 g; 4,10 mmol) taze hazırlanmış THF (75 mL) içerisinde çözündü ve $LiAlH_4$ (1,18 g; 31,23 mmol)'ün inert ortamda taze THF (75 mL) içerisinde çözülerek hazırlanmış çözeltisine damla damla ilave edildi. Ekleme tamamlandıktan sonra, reaksiyon karışımı 2 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (4:6)) ile yapıldı.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra sıcaklık oda sıcaklığına getirildi ve su-buz karışımı ile soğutularak reaksiyon karışımı içerisine yavaş yavaş THF-su karışımı (100:10 mL) ilave edildi. Oluşan çökelek filtre edildi ve taze hazırlanmış THF ile yıkandı.

Süzüntünün çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve etilasetat ile kristallendirildi. Bileşik 21'in (3β, 5β-Dihidroksi-6β-hidroksimetil-B-Norspirostan) yapısı $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,01 g (%55), beyaz iğne kristal. EN: 215-217 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3375, 2930, 2870, 1452, 1240, 1046.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,41 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 4,10 (m, 1H, H-3); 3,66 (td, $J_1$= 10,4 Hz, $J_2$= 9,0 Hz, 1H, $H_b$ ($CH_2$-OH)); 3,55 (dd, $J_1$= 11,0 Hz, $J_2$= 3,5 Hz, 1H, $H_a$ ($CH_2$-OH)); 3,47 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,36 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 0,96 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,92 (s, 3H, H-19); 0,78 (d, J= 6,6 Hz, 3H, H-27); 0,76 (s, 3H, H-18).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 109,5; 82,8; 81,3; 67,7; 67,0; 64,8; 61,8; 56,3; 54,2; 50,1; 45,3; 45,1; 42,8; 41,4; 40,0; 39,9; 32,5; 31,5; 30,3; 28,8; 28,1; 26,8; 21,3; 19,1; 17,2; 17,0; 14,6.

Elementel analiz: $C_{27}H_{44}O_5$ hesaplanan C, 72.28; H, 9.89; O, 17.83, bulunan C, 72.12; H, 9.63; O, 17.56.

HRMS (m/z): $(M+H)^+$, $C_{27}H_{44}O_5$ hesaplanan 449,32632, bulunan 449,32506.

### 2.2.2.13. Bileşik 22'nin sentezi

Diosgenin (2 g; 4,8 mmol) kuru THF (100 mL) içerisindeki çözeltisine azot gazı altında 0 °C'de 1 M $BH_3$-THF kompleksi (14,5 mL; 14,5 mmol) yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında bir gece boyunca karıştırıldı. Sonra reaksiyon karışımına NaOH (10 N, 3 mL, 30 mmol) çözeltisi 0 °C'de 30 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Hemen ardından %30'luk $H_2O_2$ çözeltisi (3 mL, 26 mmol) eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 2 saat boyunca şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Reaksiyon karışımı DCM ile (3x200 mL) ekstrakte edildi ve sırasıyla 1 M HCl, doygun $NaHCO_3$ ve tuz çözeltileri ile yıkandı, susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu, filtre edildi. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: EtOAc: hekzan (1:3)). Bileşik 22'nin (klorogenin) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,9 g (%91), beyaz katı. EN: 244-246 °C (lit: 241–243 °C) [18].

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3500, 3250, 2960, 2850, 1460, 1370, 1240, 1050, 950.

$^1$H-NMR (500 MHz, Piridin-$d_5$, δ, ppm): 4,57 (q, J= 7,6 Hz; 1H, H-16); 3,95-3,89 (m, 1H, H-3); 3,69 (dt, $J_1$= 10,6 Hz, $J_2$= 4,6 Hz, 1H, H-6); 3,58 (m, 1H, H-26α); 3,50 (t, J= 10,6 Hz, 1H, H-26β); 3,03 (d, J= 12,0 Hz, 1H); 2,27 (dt, J= 12,2 Hz, J= 4,0 Hz, 1H); 1,15 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-19); 0,90 (s, 3H, H-21); 0,87 (s, 3H, H-18); 0,69 (d, J= 5,8 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{27}H_{44}O_4$ hesaplanan C, 74,96; H, 10,25; O, 14,79, bulunan C, 74,56; H, 10,13; O, 14,77.

#### 2.2.2.14. Bileşik 23'ün sentezi

Diosgenin (6 g; 14,47 mmol) ve TsCl'ün (4,13 g; 21,7 mmol) piridin (25 mL) içerisindeki karışımı oda sıcaklığında bir gece boyunca karıştırıldı. Daha sonra karışım buz-su karışımı (500 mL) içerisine döküldü. Oluşan çökelek filtre edildi ve su ile yıkandı, kurutuldu. Bileşik 23 (diosgenil-p-toluen sülfonat) çok çabuk bozulmaya başladığından saflaştırma yapılmadan diğer aşamaya geçildi.

Verim: 8 g (%97).

#### 2.2.2.15. Bileşik 24'ün sentezi

Bileşik 23 (7 g; 12,3 mmol) ve NaI'ün (5,53 g; 36,9 mmol) aseton (250 ml) içerisindeki karışımı bir gece boyunca 50 °C'de karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Ürün su ile yıkanarak DCM (3x200 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz sırasıyla su, doygun tuz çözeltisi ile yıkanıp susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı (silika jel, mobil faz: petrol eteri: EtOAc (15:1)). Bileşik 24'ün (3β-iyodo-spirost-5-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 5,2 g (%80), beyazımsı katı. EN: 90-92 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2960, 2850, 1450, 1360, 1050, 970.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,41 (s, 1H, H-6); 4,37 (m, 1H, H-16); 4,07 (s, 1H, H-3); 3,47 (m, 1H, H-26α); 3,35 (t, J= 10,6 Hz, 1H, H-26β); 1,01 (s, 3H, H-19); 0,95 (d, J= 7,2 Hz, 3H, H-21); 0,77 (s, 6H, H-27, H-18).

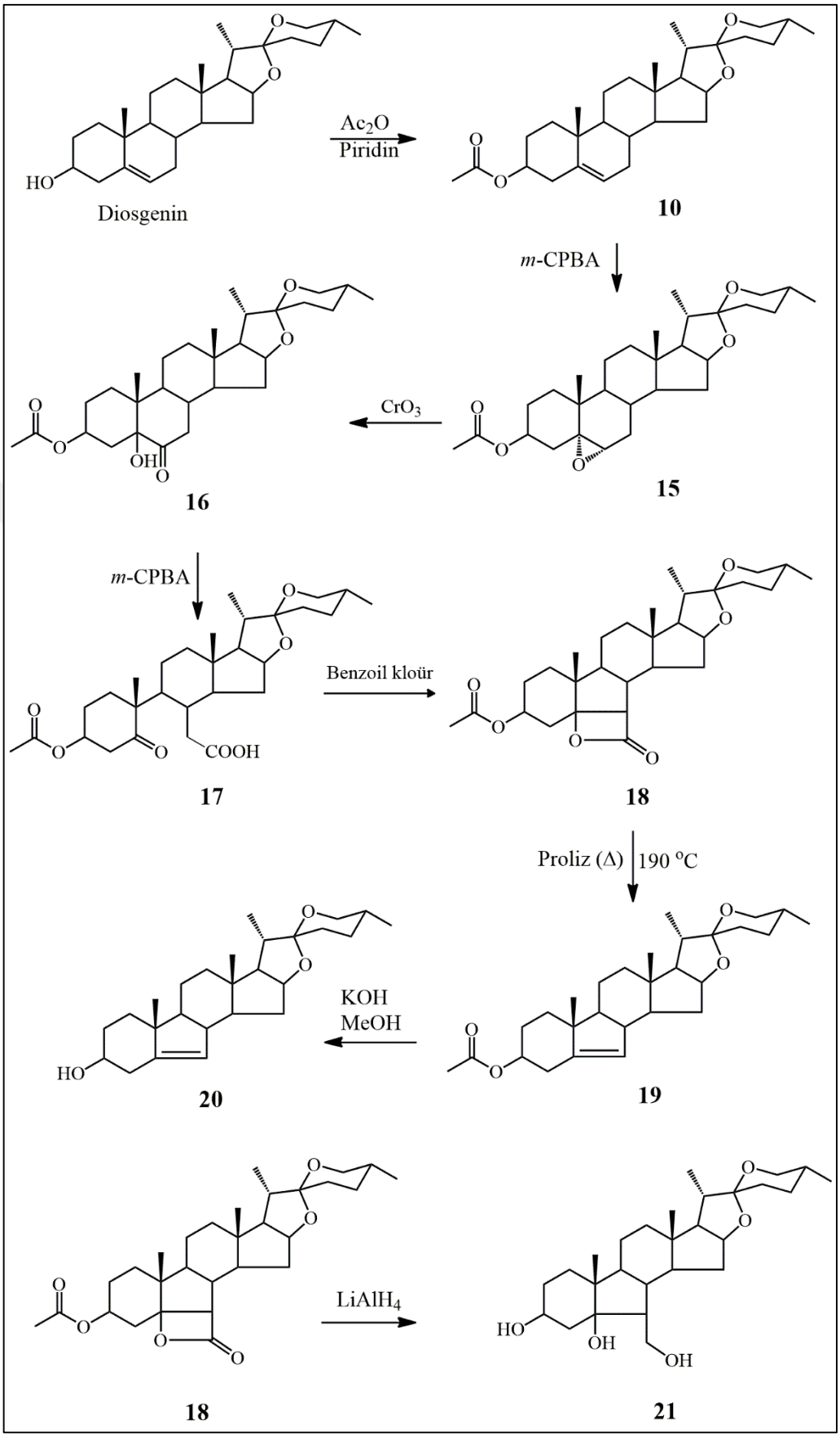
Elementel analiz: $C_{27}H_{41}O_2$ hesaplanan C, 61,83; H, 7,88; O, 6,10, bulunan C, 61,68; H, 7,23; O, 6,07.

### 2.2.2.16. Bileşik 25'in sentezi

Bileşik 24 (1,2 g; 2,28 mmol) glasiyal asetik asit (30 mL) içerisinde çözündü. Reaksiyon balonu içerisine taze olarak hazırlanmış aktif Zn tozu (4,48 g; 68,63 mmol) eklendi ve reaksiyon 15 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Filtre edildi ve filtrat asetik asit ile yıkandı. Daha sonra asetik asit döner buharlaştırıcı yardımı ile vakum altında uzaklaştırıldı. Oluşan yağlı ürün etil asetat ile seyreltildi ve tekrar döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırıldı. Ürün metanolden kristallendirildi. Bileşik 25'in (Spirost-5-en) yapısı FTIR ve $^{1}$H-NMR spektroskopisi teknikleri ile aydınlatıldı.
Verim: 0,72 g (%80), beyaz parlak kristal. EN: 192-195 °C.
FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2860, 1580, 1455, 1360, 1050, 970.
$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,26 (sd, J= 5.2 Hz, 1H, H-6); 4,41 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,46 (m, 1H, H-26α); 3,39 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 2,05 (m, 2H, H-3); 1,01 (s, 3H, H-19); 0,97 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,79 (s, 3H, H-18); 0,78 (d, J= 2,6 Hz, 3H, H-27).
$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 143,9; 118,9; 109,4; 81,0; 69,0; 62,3; 56,8; 50,7; 41,8; 40,4; 40,1; 40,0; 37,8; 33,0; 32,2; 32,0; 31,6; 31,5; 30,5; 29,0; 28,2; 22,7; 20,7; 19,6; 17,3; 16,5; 14,7.
Elementel analiz: $C_{27}H_{42}O_2$ hesaplanan C, 81,35; H, 10,62; O, 8,03, bulunan C, 81,14; H, 10,23; O, 7,87.
HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{27}H_{42}O_2$ hesaplanan 421,30662, bulunan 421,20516.

### 2.2.2.17. Bileşik 26'nın sentezi

Bileşik 25'in (5,2 g; 11,38 mmol) kloroform (12 mL) içerisindeki çözeltisine m-CPBA (1,17 g; 6,79 mmol) oda sıcaklığında ilave edildi. Reaksiyon yaklaşık yarım saat karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: n-hekzan (3:1)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım $CHCl_3$ (25 mL) ile seyreltildi ve sırasıyla sulu $Na_2SO_3$, sulu $Na_2CO_3$ çözeltileri ve su ile yıkandı. Organik faz susuz $Na_2SO_4$ ile kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Epoksitlendirme reaksiyonunda 5α, 6α-epoksit ve 5β, 6β-epoksit karışımı elde edildi ve saflaştırma yapmadan diğer aşamaya geçildi. Bileşik 26'nın (5α, 6α-epoksit ve 5β, 6β-epoksit karışımı) yapısı FTIR ve $^{1}$H-NMR spektroskopisi teknikleri ile aydınlatıldı.
Verim: 0,83 g (%89), beyaz kristal. EN: 104-107 °C.




Şekil 2.4. B halkasındaki reaksiyonlar ile türev bileşiklerin sentezi

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2950, 2560, 1450, 1240, 1040.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,41 (m, 1H, H-16); 3,46 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,36 (td, $J_1$= 14,6 Hz, $J_2$= 3,6 Hz, 1H, H-26 aks.); 2,90 (d, J= 4,6 Hz, 1H, H-6); 1,06 (s, 3H, H-19); 0,96 (dd, $J_1$= 7,0 Hz, $J_2$= 1,8 Hz, 3H, H-21); 0,79 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-27); 0,71 (s, 3H, H-18).

#### 2.2.2.18. Bileşik 27'nin sentezi

Bileşik 26 (0,25 g; 0,60 mmol) metanol (10 mL) içerisinde çözündü. TCNE (0,007 g; 0,06 mmol) karışım üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon çözücüsü döner buharlaştırıcı yardımı ile uzaklaştırıldı. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve etilasetat ile kristallendirildi. (silika jel, mobil faz: petrol eteri: EtOAc (10:1)). Bileşik 27'nin yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,17 g (%65), beyaz kristal.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3350, 2950, 2860, 1450, 1240, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,42 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,48 (m, 1H, H-26 ekv.); 3,37 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26 aks.); 3,31 (s, 3H, $COOCH_3$); 2,99 (m, J= 4,0 Hz, 1H, H-6); 2,61 (m, 2H, H-4); 1,02 (s, 3H, H-19); 0,97 (d, J= 7,6 Hz, 3H, H-21); 0,79 (d, J= 3,0 Hz, 3H, H-27); 0,78 (s, 3H, H-18).

Elementel analiz: $C_{28}H_{46}O_4$ hesaplanan C, 75,29; H, 10,38; O, 14,33; bulunan C, 75,10; H, 10,12; O, 14,02.

### 2.2.3. F-halkasındaki reaksiyonlar ile türevlerin sentezi

Bu kısımda F halkasındaki reaksiyonlar ile sentezlenen spirostan türevlerinin reaksiyon basamakları Şekil 2.6'da özetlendi.

#### 2.2.3.1. Bileşik 28'in sentezi

$AlCl_3$'ün (102,9 g; 771 mmol) susuz soğuk dietileter (300 mL) içerisinde çözünmüş çözeltisine dikkatli bir şekilde $LiAlH_4$ (7,32 g; 192,9 mmol) eklendi (şiddetli reaksiyon gerçekleşti). Karışım 0 °C'de yarım saat süre ile karıştırıldı. Daha sonra diosgeninin (8 g; 19,29 mmol) dietileter (300 mL) içerisinde çözünmüş çözeltisi yavaş yavaş 15 dakika süreyle eklendi. Karıştırma işlemine 15 dakika 0 °C'de ve ardından bir saat oda

sıcaklığında devam edildi. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: petrol eteri: kloroform (1:1:1)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımına yavaş yavaş su (100 mL) ve ardından %10'luk $H_2SO_4$ çözeltisi (100 mL) ilave edildi. Reaksiyon karışımı dietileter ile ekstrakte edildi ve toplanan organik fazlar doygun $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı. Ardından susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Filtre edildikten sonra çözücüsü kuruluğa kadar döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: EtOAc: petrol eteri: kloroform (1:1:1)). Bileşik 28'in (3β, 26-dihidroksi-(25R)-furost-5-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 5,25 g (%65), beyaz kristal. EN: 160-165 (lit: 164-166) °C [50].

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3260, 2950, 2850, 1670, 1460, 1240, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, δ, ppm): 5,25 (d, J= 4,8 Hz, 1H, H-6); 4,20 (m, 1H, H-16); 3,25-3,13 (m, 4H, H-3, H-26, H-22); 0,95 (d, J= 7,0 Hz, 6H, H-21, H-19); 0,80 (d, J= 6,6 Hz, 3H, H-27); 0,73 (s, 3H, H-18).

Elementel analiz: $C_{27}H_{44}O_3$ hesaplanan C, 77,83; H, 10,64; O, 11,52, bulunan C, 77,64; H, 10,42; O, 11.28.

**2.2.3.2. Bileşik 29'un sentezi**

Bileşik 28'in (5 g; 12 mmol) piridin (15 mL) içerisindeki çözeltisine iki saat süre ile dört porsiyon halinde TsCl (4,7 g; 24 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı 0 °C'de 12 saat boyunca karıştırıldıktan sonra buz-su karışımı (300 mL) içerisine döküldü ve DCM ile ekstrakte edildi (3x200 mL).

Toplanan organik fazlar sırasıyla %10'luk HCl çözeltisi ve su ile yıkandı ardından susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Filtre edildikten sonra çözücüsü kuruluğa kadar döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: petrol eteri: EtOAc (5:1)). Kolon sonrası Bileşik 29a (4,7 g, %55) ve Bileşik 29b (2,4 g, %35) olarak iki ürün elde edildi. Dönüşüm için bileşik 29a (4,5 g, 6,2 mmol) su: aseton (3:7) (620 mL) içerisinde çözündü ve bir buçuk saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Daha sonra oda sıcaklığına kendiliğinden soğumaya bırakıldı bu sürede renksiz çözeltide kristalleşme görüldü. Reaksiyon karışımı 20 saat 0 °C'de bekletildikten sonra oluşan çökelek süzüldü, su ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Daha sonra çökelek DCM: dietileter karışımında kristallendirildi. Bileşik

29'un (3β-hidroksi-26-tosiloksi-(25R)-furost-5-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 5,4 g (%80), beyaza yakın katı. EN: 103-106 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3250, 2960, 2850, 1670, 1460, 1360, 1240, 1180, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 7,78 (d, J= 8,6 Hz, 1H, Ar (2', 6')); 7,34 (d, J= 8,2 Hz, 1H, Ar (3', 5')); 5,33 ( sd, J= 5,0 Hz, 1H, H-6); 4,27 (m, 1H, H-16); 3,85 (dd, $J_1$= 9,4 Hz, $J_2$= 5,6 Hz, 1H, H-26α); 3,83 (dd, $J_1$= 9,2 Hz, $J_2$= 6,6 Hz, 1H, H-26β); 3,51 (m, 1H, H-3); 3,24 (m, 1H, H-22); 2,44 (s, 3H, Ar (4'-Me); 1,01 (s, 3H, H-21); 0,98 (s, 3H, H-27); 0,89 (s, 3H, H-18); 0,77 (s, 3H, H-19).

Elementel analiz: $C_{34}H_{50}O_5S$ hesaplanan C, 71,54; H, 8,83; O, 14,01; S, 5,62, bulunan C, 71,22; H, 8,16; O, 13,89; S, 5.56.

### 2.2.3.3. Bileşik 30'un sentezi

Bileşik 29 (4 g; 7 mmol) ve $NaN_3$'in (1,82 g; 28 mmol) DMF (90 ml) içerisindeki karışımı 50-70 °C arasında iki saat boyunca karıştırıldı. Sonra reaksiyon karışımına buz-su karışımı (500 mL) ilave edildi ve °C'de 12 saat bekletildikten sonra oluşan çökelek sırasıyla süzüldü, bol miktarda su ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: petrol eteri: EtOAc (20:6)). Bileşik 30'un (26-azido-3β-hidroksi-(25R)-furost-5-en) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,78 g (%90), beyaz amorf katı. EN: 94-96 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3500, 3270, 2960, 2850, 2099, 1670, 1450, 1050.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,35 (d, $J_1$= 5,4 Hz, 1H, H-6); 4,28 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,52 (m, 1H, H-3); 3,30 (m, 1H, H-22); 3,21 (dd, $J_1$= 12,0 Hz, $J_2$= 5,8 Hz, 1H, H-26α); 3,10 (dd, $J_1$= 12,0 Hz, $J_2$= 7,0 Hz, 1H, H-26β); 1,02 (s, 3H, H-21); 0,99 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-19); 0,95 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-27); 0,80 (s, 3H, H-18).

Elementel analiz: $C_{27}H_{43}N_3O_2$ hesaplanan C, 73,43; H, 9,82; N, 9,51; O, 7,25, bulunan C, 73,20; H, 9,64; N; 9,39; O, 7,18.

### 2.2.3.4. Bileşik 31'in sentezi

$AlCl_3$'ün (6,65 g; 49,92 mmol) susuz soğuk dietileter (20 mL) içerisinde çözünmüş çözeltisine dikkatli bir şekilde $LiAlH_4$ (0,473 g; 12,48 mmol) eklendi (şiddetli reaksiyon gerçekleşti). Karışım 0 °C'de yarım saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra

hazırlanan karışıma Bileşik 22'nin (0,54 g; 1,248 mmol) dietileter (20 ml) içerisinde çözünmüş çözeltisi 15 dakika boyunca yavaş yavaş eklendi. Karıştırma işlemine 15 dakika boyunca 0 °C'de, ardından da bir saat boyunca oda sıcaklığında devam edildi. Reaksiyon takibi İTK sistemi (EtOAc: petrol eteri: $CHCl_3$ (1:1:1)) ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışıma yavaş yavaş su (100 mL) ve ardından %10'luk $H_2SO_4$ (100 mL) ilave edildi. Reaksiyon karışımı dietileter ile ekstrakte edildi ve toplanan organik fazlar doygun $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı. Ardından susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kurutuldu. Filtre edildikten sonra çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: EtOAc: petrol eteri: $CHCl_3$ (1:1:1)). Bileşik 31'in (3β, 6β, 26-trihidroksi-(25R)-furostan) yapısı FTIR ve $^1$H-NMR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,48 g (%90), beyaz kristal. EN: 210-213 °C (lit: 208-209 °C) [51].

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3230, 2950, 2850, 1460, 1050, 940.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,30 (m, H-16); 4,09 (m, 1H, H-6); 3,60 (m,1H, H-3); 3,43 (m, 2H, AB(X) çatı sistemi, H-26); 3,33 (m, 1H, H-22); 1,33/2,00 (m,1H, H-15); 1,77 (H-20); 1,66 (H-25); 1,61 (H-17); 1,59/1,54 (H-23); 1,12 (H-5); 1,04 (s, H-19); 0,99 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,90 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-27); 0,82 (s, H-18).

Elementel analiz: $C_{27}H_{46}O_4$ hesaplanan C, 74,61; H, 10,67; O, 14,72, bulunan C, 74,53; H, 10,44; O, 14,09.

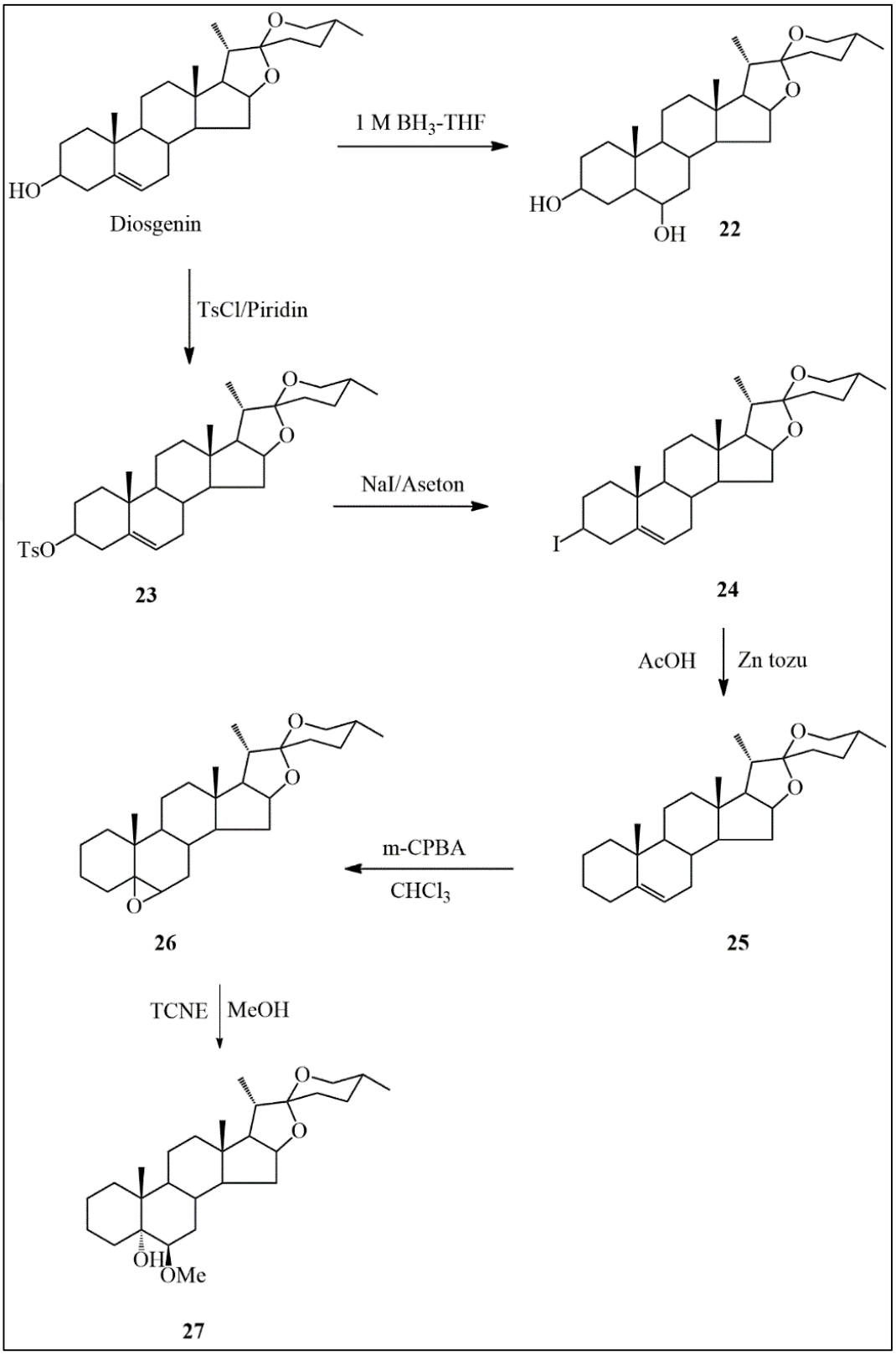
### 2.2.4. Hetero halkalı diosgenin türevlerinin hazırlanması

Bu kısımda sentezlenen hetero halkalı spirostan türevlerinin reaksiyon basamakları Şekil 2.7'de özetlendi.

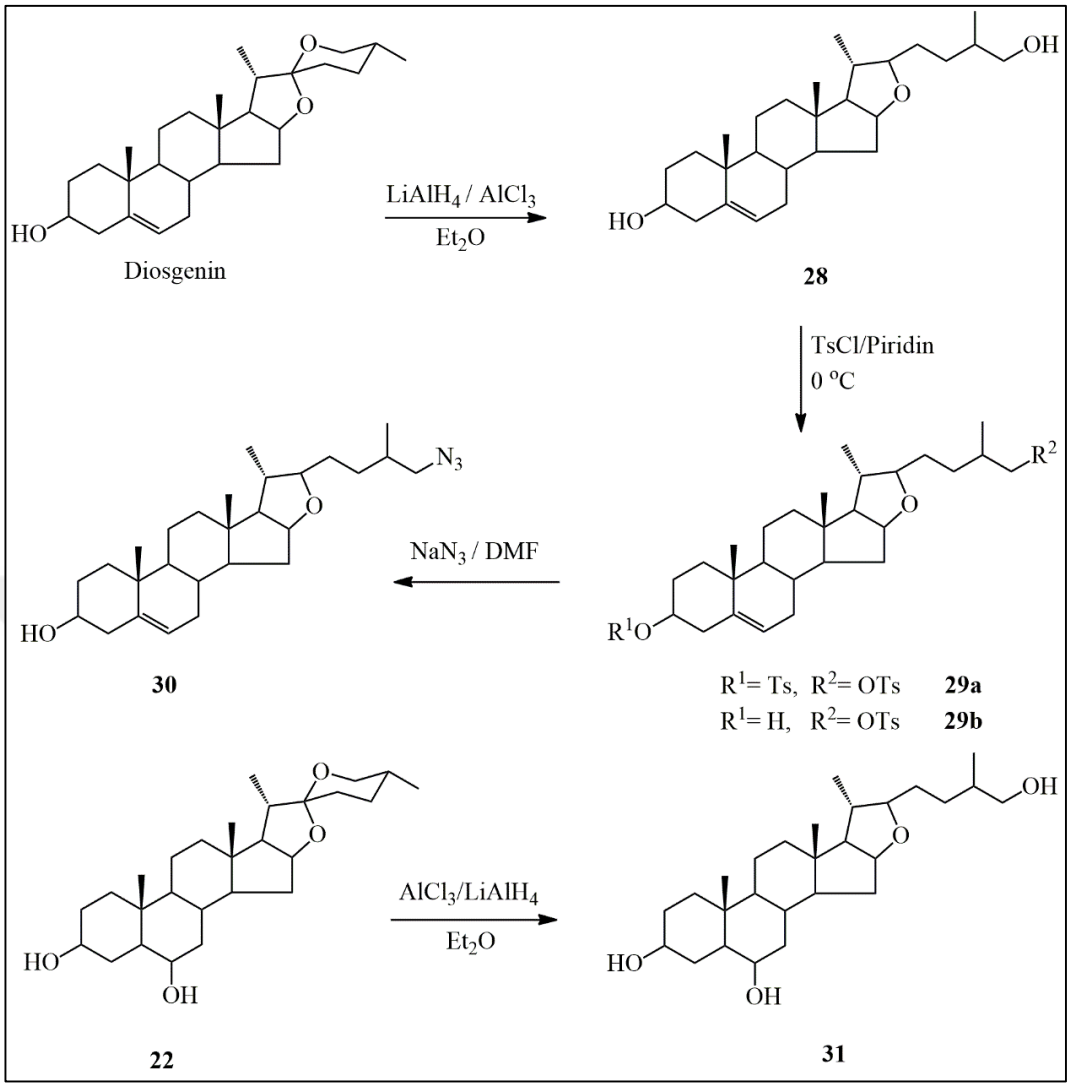
#### 2.2.4.1. Bileşik 32'nin sentezi

Bileşik 8'in (0,8 g; 1,76 mmol) %95'lik etanol (13 mL) içerisindeki çözeltisine 7 M $NaNO_2$ (1,38 mL) çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımı 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı, sonra 0 °C'ye soğutuldu ve %35'lik HCl çözeltisi (1 mL) damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımına bir saat sonra su (125 mL) eklenerek çözelti pH'ı 8 olacak şekilde %5'lik $NaHCO_3$ çözeltisi ile muamele edildi. Ürün çöktürüldü ve filtre edildi. Bileşik 32 metanolden kristallendirildi. Bileşik 32'nin (2-hidroksimino-spirost-4-en-3-on) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,7 g (%91), açık sarı katı. EN: 178-181 °C.




Şekil 2.5. B halkasındaki reaksiyonlar ile diğer türev bileşiklerin sentezi




Şekil 2.6. F halkasındaki reaksiyonlar ile türev bileşiklerin sentezi

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3450, 2960, 2850, 1680, 1450, 1430, 1370, 1180,1050, 970, 860.
$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, δ, ppm): 12,16 (s, 1H, =N-OH); 5,88 (d, J= 1,4 Hz, 1H, H-4); 4,29 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,40 (m, 1H, H-26α); 3,20 (t, $J_1$= 11,2 Hz, 1H, H-26β); 1,06 (s, 3H, H-19); 0,90 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,77 (s, 3H, H-18); 0,74 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-27).
Elementel analiz: $C_{27}H_{39}NO_4$ hesaplanan C, 73,43; H, 8,90; N, 3,17; O, 14,49, bulunan C, 73,26; H, 8,83; N, 3,01; O, 14,22.

### 2.2.4.2. Bileşik 33'ün sentezi

Bileşik 8 (1,5 g; 3,4 mmol), $NH_2OH$. HCl (0,7 g; 10,21 mmol) ve sodyum asetatın (0,837 g; 10,21 mmol) asetik asit (40 mL) içerisindeki karışımı 1,5 saat boyunca geri

soğutucu altında kaynatıldı. Sonra sırasıyla oda sıcaklığına getirildi, içerisine buz-su karışımı ilave edildi, filtre edildi ve kurutuldu.

Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: petrol eteri: aseton (20:1)). Bileşik 33'ün (Spirost-4-en-[3,2-d] izoksazol) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,25 g (%84), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3350, 2960, 2850, 1650, 1600, 1450, 1380, 1050, 970.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 8,00 (s, 1H, H-28); 6,18 (d, J= 2,4 Hz, 1H, H-4); 4,42 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,48 (m, 1H, H-26α); 3,38 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 1,02 (s, 3H, H-19); 0,99 (d, J= 7,0 Hz, 3H, H-21); 0,83 (s, 3H, H-18); 0,79 (d, J= 6,8 Hz, 3H, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 165,1; 154,5; 148,8; 109,4; 108,9; 107,7; 80,8; 67,0; 62,3; 55,8; 54,3; 41,8; 41,2; 40,6; 40,0; 36,1; 32,4; 32,0; 31,5; 31,4; 30,4; 29,8; 28,9; 21,5; 18,9; 17,3; 16,5; 14,7.

Elementel analiz: $C_{28}H_{41}NO_3$ hesaplanan C, 76,50; H, 9,40; N, 3,19; O, 10,92, bulunan C, 76,38; H, 9,33; N, 3,05; O, 10.81.

HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{28}H_{41}NO_3$ hesaplanan 462.29650, bulunan 462.29524.

### 2.2.4.3. Bileşik 34'ün sentezi

Bileşik 8'in (0,3 g; 0,68 mmol) etanol-asetik asit karışımı içindeki çözeltisine (0,04 mL AcOH, 7,1 mL etanol) hidrazin hidrat (0,073 g; 1,47 mmol) eklendi. Reaksiyon sekiz saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon çözücüsü düşük basınçta döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırıldı. Reaksiyon karışımı su ile seyreltildi ve dietileter ile ekstrakte edildi. Organik faz sırasıyla, doymuş $NaHCO_3$ çözeltisi, su ve tuz çözeltisi ile yıkandı ve susuz $Na_2SO_4$ ile kurutuldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve ham ürün etanolden kristallendirildi. Bileşik 34'ün (Spirost-4-en-[3,2-d] pirazol) yapısı $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,25 g (%80), beyaz kristal. EN: 282-285 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2972, 2864, 1651, 1456, 1210, 1190, 1150, 1053.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 7,30 (s, 1H, H-pirazol); 6,22 (s, 1H, H-4); 4,46 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,90 (m, 1H, H-26α); 3,42 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 1,02 (s, 3H, H-19); 1,00 (s, 3H, H-21); 0,86 (s, 3H, H-18); 0,84 (d, J= 6,4 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{28}H_{40}N_2O_2$ hesaplanan C, 77,02; H, 9,23; N, 6,42; O, 7,33, bulunan C, 76,84; H, 9,17; N, 6,33, O, 7,11.

### 2.2.4.4. Bileşik 35'in sentezi

Buz banyosunda soğutulmuş Bileşik 33'ün (0,2 g; 0,45 mmol) MeOH (7 mL) ve dietileter (15 mL) çözücü karışımı içindeki çözeltisine NaOMe (0,84 g; 15,5 mmol) eklendi. Reaksiyon oda sıcaklığında 45 dakika boyunca karıştırıldı. Reaksiyon karışımı DCM: $Et_2O$ (1:2, 15 mL x 2) çözücü karışımı ile ekstrakte edildi. Daha sonra organik faz %5'lik sulu HCl çözeltisi ile (20 mL x 3) ile yıkandı. Asidik faz tekrar DCM: $Et_2O$ (1:2) çözücü karışımı ile yıkandı. Toplanan organik fazlar $NaHCO_3$ ve tuz çözeltisi ile yıkandı. Susuz $Na_2SO_4$ ile kurutularak döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırıldı. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: siklohekzan: aseton (15:1)). Bileşik 35'in (Spirost-4-en-3-karbonitril) yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,178 g (%65), parlak sarı kristal. EN: 235-238 °C.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3432, 2927, 2859, 2204, 1640, 1456, 1222, 1193, 1167, 1086.

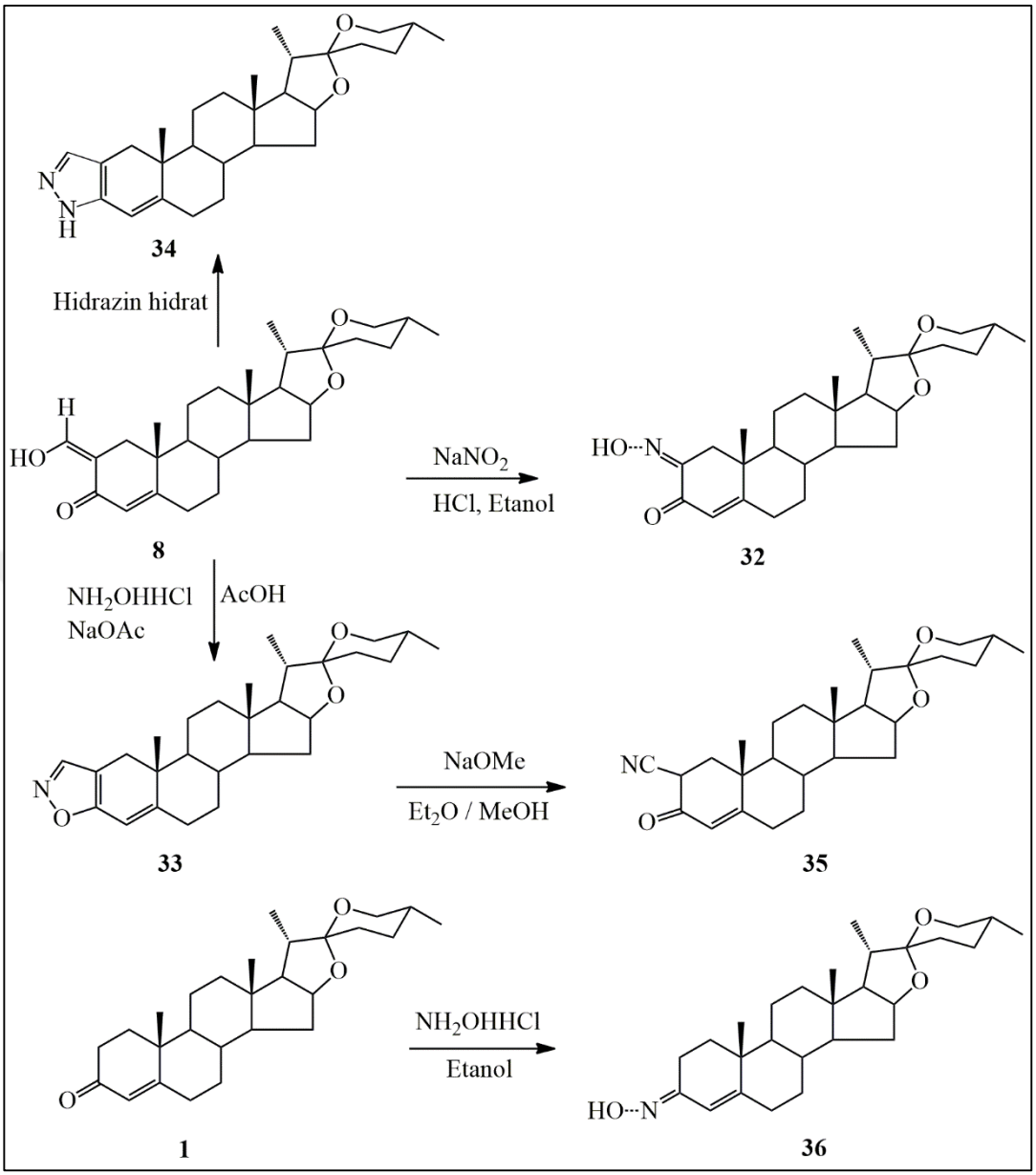
$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,81 (d, J= 1,5 Hz, 1H, H-4); 4,41 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,60 (dd, $J_1$= 14,6 Hz, $J_2$= 4,6 Hz, 1H, H-2); 3,47 (m, 1H, H-26α); 3,36 (t, J= 11.0 Hz, 1H, H-26β); 1,25 (s, 3H, H-19); 0,96 (d, J= 7.0 Hz, 3H, H-21); 0,82 (s, 3H, H-18); 0,79 (d, J= 6,4 Hz, 3H, H-27).

Elementel analiz: $C_{28}H_{39}NO_3$ hesaplanan C, 76,85; H, 8,98; N, 3,20; O, 10,97, bulunan C, 76,74; H, 8,46; N, 3,00; O, 10,86.

### 2.2.4.5. Bileşik 36'nın sentezi

Bileşik 1 (1 g; 2,42 mmol) %95'lik etanol (100,0 mL) içerisinde çözüldü ve içerisine sırasıyla sodyum asetat (0,795 g; 9,69 mmol) ve $NH_2OH.HCl$ (0,842 g, 12,11 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı 1,5 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra içerisine su ilave edildi ve pH'ı 8 oluncaya kadar doygun $NaHCO_3$ çözeltisi eklendi. Beyaz çökelek filtre edildi ve su ile yıkandı. Bileşik 36 metanolden kristallendirildi. E ve Z oksim olarak elde edildi. Bileşik 36'nın (3(E)- ve 3(Z)-hidroksimino-spirost-4-en) yapısı $^1$H-NMR, $^{13}$C-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1 g (%96), beyaz amorf kristal. EN: 226-228 °C.




Şekil 2.7. Hetero halkalı türev bileşiklerin sentezi

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3280, 2960, 2850, 1640, 1460, 1430, 1370, 1180,1060, 970, 890.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, δ, ppm): 10,44 (s, 1H, =N-OH); 10,18 (s, 1H, =N-OH); 6,33 (s, 1H, H-4); 5,70 (s, 1H, H-4); 4,26 (q, J= 7,6 Hz, 1H, H-16); 3,41 (m, 1H, H-26α); 3,20 (t, J= 11,0 Hz, 1H, H-26β); 1,04 (s, 3H, H-19); 0,90 (d, J= 7,2 Hz, 3H, H-21); 0,75 (s, 3H, H-18); 0,72 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-27).

$^{13}$C-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, δ, ppm): 156,3; 154,1; 152,5; 151,0; 118,0; 110,8; 108,4; 80,1; 65,9; 61,8; 55,2; 55,1; 53,5; 53,2; 41,1; 38,4; 37,5; 36,1; 34,9; 34,8; 34,4; 32,5; 32,1; 31,6; 31,4; 31,0; 29,8; 28,5; 24,3; 20,8; 20,6; 18,5; 17,8; 17,5; 17,1; 16,1; 14,6.

Elementel analiz: $C_{27}H_{41}NO_3$ hesaplanan C, 75,84; H, 9,66; N, 3,28; O, 11,22, bulunan C, 75,68; H, 9,52; N, 3,16; O, 11,01.
HRMS (m/z): $(M+Na)^+$, $C_{27}H_{41}NO_3$ hesaplanan 450,29568, bulunan 450,29481.

### 2.2.5. Polimerik miselin hazırlanması

Kurkumin bağlı diosgenin konjuge mPEG sentezi ve polimerik miselin hazırlanmasına ait şematik gösterim sırasıyla Şekil 2.8a ve Şekil 2.8b'de özetlendi.

#### 2.2.5.1. Monokarboksilik uçlu mPEG sentezi (mPEG-COOH)

mPEG-5000 (5 g; 1 mmol) ara ara ısı verilerek aseton (40 mL) içerisinde çözündü. Bu çözeltiye Jones reaktifi (0,85 mL; 0,01 M $CrO_3$ içeren $H_2SO_4$ çözeltisi) tek porsiyonda eklendi ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında bir gece boyunca karıştırıldı.
Reaksiyonu durdurmak için karışıma isopropil alkol ilave edildi. Reaksiyon sırasında oluşan krom tuzlarını uzaklaştırmak için karışıma ince çekilmiş aktif karbon (0,5 g) eklendi ve iki saat boyunca karıştırmaya devam edildi. Daha sonra fitre edildi. Çözücüsü vakum altında döner buharlaştırıcı yardımı ile uçuruldu. mPEG-COOH yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopi teknikleri ile aydınlatıldı.
Verim: 4,33 g (%86), beyaz katı. EN: 58-60 °C.
FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3450, 2950, 2800, 1730, 1460, 1100, 1050, 950, 840.
$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,13 (s, 2H, -$CH_2$-COOH); 3,63 (t, -($CH_2CH_2O$)-); 3,36 (s, 3H, $CH_3$-O-).

#### 2.2.5.2. mPEG-Diosgenin konjugatının sentezi (mPEG-DGN)

Azot atmosferi altında, mPEG-COOH'in (2,83 g; 0,566 mmol) kuru DCM (35 mL) içerisindeki çözeltisine bileşik 30 (2 g; 4,53 mmol) eklendi. Karışım 0 °C'ye soğutuldu ve üzerine sırasıyla EDC (0,395g; 2,547 mmol) ve DMAP (0,553g; 4,528 mmol) eklendi. Karışım önce 0 °C'de 1 saat, daha sonra da gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda yaklaşık 10 mL DCM kalıncaya kadar uçuruldu. Ham ürün, soğuk dietileter (300 mL) içerisine çöktürüldü. Süzüldükten sonra, katı madde iki kez dietileter ile (2x250 mL) yıkandı. Daha sonra mPEG-DGN sabit tartıma gelinceye kadar vakum altında iki gün kurutuldu.
Verim: 2,77 g (%90), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3500, 2950, 2800, 2100, 1730, 1640, 1450, 1050.
$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,34 (d, 1H, H-6); 4,75 (m, 1H, H-3); 4,31 (m, 1H, H-16); 3,63 (t, -($CH_2CH_2O$)-); 3,39 (s, 3H, $CH_3$-), 3,32 (dd, 1H, H-26α), 3,26 (dd, 1H, H-26β).

### 2.2.5.3. Kurkumin mono alkin sentezi (CMA)

Kurkumin (CUR) (5 g; 8,82 mmol (saflık derecesi %65)) ve $K_2CO_3$ (1,21 g; 8,82 mmol) susuz aseton (70 mL) ve DMF (5 mL) karışımı içerisinde çözündü. Reaksiyon karışımına propargil bromür (0,78 mL; 8,82 mmol (ağırlıkça %80 toluen içerisinde)) eklendi. Karışım azot gazı altında oda sıcaklığında 48 saat boyunca karıştırıldı. Ardından çözücüsü vakum altında döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün DCM ile ekstrakte edildi. Toplanan organik fazlar sırasıyla su, tuz çözeltisi ile yıkandı ve susuz $Na_2SO_4$ üzerinde kuruldu. Çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçuruldu.
Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: aseton: DCM (0,5:9,5)). Bileşik CMA'nin yapısı $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.
Verim: 2,5 g (%42), açık turuncu katı. EN: 144-147 °C.
FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3290, 3260, 2970, 2920, 1620, 1578, 1410, 1250.
$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 7,62–7,58 (d, 2H); 7,15–6,98 (m, 6H); 6,52–6,49 (d, 2H); 5,93 (d, 1H); 5,80 (s, 1H); 4,81 (d, 2H); 3,92 (s, 6H); 2,54 (s, 1H).

### 2.2.5.4. Kurkumin mono alkin bağlı mPEG-DGN sentezi (mPEG-DGN-CUR)

Bileşik mPEG-DGN-CUR "klik" kimyası tekniği kullanılarak sentezlendi. CMA (0,149 g; 0,367 mmol) ve mPEG-DGN (2 g; 0,367 mmol) t-BuOH:THF (1:1, 32 mL) karışımı içerisinde çözündü. Reaksiyon karışımı içerisine taze olarak hazırlanan $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,02 g; 0,089 mmol) ve sodyum askorbatın (0,026 g; 0,134 mmol) su içerisindeki (1 mL) çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımı 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı ve reaksiyon takibi İTK sistemi (etilasetat:petrol eteri (1:1)) ile yapıldı. Çözücüsü düşük basınç altında döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Ürün DCM ile seyreltildi ve soğuk dietileter (500 mL) içerisinde çöktürme işlemi yapıldı. Filtre işlemi yapıldıktan sonra, katı madde dietileter (2x250 mL) ile yıkandı. Açık kahve renkli ürün kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. (silika jel, mobil faz: kloroform: metanol (9:1). mPEG-DGN-CUR'ün yapısı FTIR ve $^1$H-NMR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı.

Verim: %70, turuncu katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 2940, 2800, 2100, 1730, 1640, 1450, 1050.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 8,14 (s); 7,71-7,67 (d); 7,53 (m); 6,78-6,66 (d); 5,96 (d); 5,88 (s, 1H); 5,39 (br d); 4,81 (d); 4,71 (m); 3,83 (s); 3,77 (t); 3,71 (t); 3,69 (t); 3,60 (m); 3,55 (m); 3,47 (s); 2.25 (t).

#### 2.2.5.5. Polimerik misellerin hazırlanması

Polimerik miselin hazırlanması için diyaliz yöntemi kullanıldı. mPEG-DGN-CUR (5 mg) THF içerisinde çözündü ve sonra 24 saat boyunca deiyonize suya (1,5 L) karşı diyaliz edildi. Molekül ağırlığı ayırma sınırı (MWCO, Molecular weight cut-off) 3500Da olan diyaliz membramının ortamı her 6 saatte bir yenilendi. Daha sonra, polimerik miseller dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yapıldıktan sonra toz halinde elde edildi ve sonraki analizler için buzdolabında saklandı.

#### 2.2.5.6. Kritik misel konsantrasyonu

Kritik misel konsantrasyonu (CMC), daha önce tarif edildiği gibi piren floresan prob olarak kullanılarak floresan spektroskopisi ile belirlendi [52]. Önce polimerik misel sulu çözeltileri (0,4 ile 400 μg/mL arasında değişen konsantrasyonlar) sabit piren konsantrasyonu 2 $\times 10^{-9}$ μM olacak şekilde hazırlandı. Ölçümden önce, numuneler karanlıkta 25 °C'de 1 gün boyunca dengelendi. CMC, piren floresan yoğunluğu oranının ($I_{375}/I_{373}$) logaritmik konsantrasyona (log C) (C, (mg/mL)) karşı hesaplandı.

### 2.2.6. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

Bu kısımda polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan diosgenin konjuge polimerlerin sentezi gerçekleştirildi. Polimerlerin sentezi ve polimerik nanopartiküllerin hazırlanması sırasıyla Şekil 2.9 ve 2.10'da özetlendi.

#### 2.2.6.1. M1-PCL sentezi

Azot gazı altında olan kuru bir balon içerisine sırasıyla başlatıcı olarak diosgenin (0,15 g; 0,361 mmol), monomer olarak ε-cL (3,3 g; 28,94 mmol) ve katalizör olarak $Sn(Oct)_2$ (0,039 g; 0,096 mmol) alındı. Reaksiyon 12 saat boyunca 120 °C'de karıştırıldı.

Sonra reaksiyon karışımının sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesi beklendi, ardından DCM (5 mL) ile seyreltildi. Soğuk metanolde çöktürüldü. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra G4 sinterli süzgeçten süzüldü. Sabit tartıma gelinceye kadar iki gün vakum altında kurutuldu. M1-PCL'nin yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 3,3 g (%96), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3400, 2950, 2850, 1720, 1470, 1240.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 11922, $M_w$: 20581), PDI: 1,72.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,37 (s, 1H, H-6 (DGN)); 4,60 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,30 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,06 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,65 (t, 2H, ($CH_2OH$) son uç grup PCL); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL).

### 2.2.6.2. M2-PCL sentezi

Azot gazı altında olan kuru bir balon içerisine sırasıyla başlatıcı olarak bileşik 22 (0,10 g; 0,24 mmol), monomer olarak ε-cL (2,19 g; 19,26 mmol) ve katalizör olarak $Sn(Oct)_2$ (0,026 g; 0,064 mmol) alındı. Bölüm 2.2.6.1'de anlatıldığı gibi reaksiyona devam edildi. M2-PCL'nin yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,2 g (%95), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3450, 2950, 2850, 1720, 1470, 1240.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 10900, $M_w$: 18400, PDI: 1,68.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,64 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,37 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,05 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,64 (t, 2H, ($CH_2OH$) son uç grup PCL); 2,29 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL).

### 2.2.6.3. M3-PCL sentezi

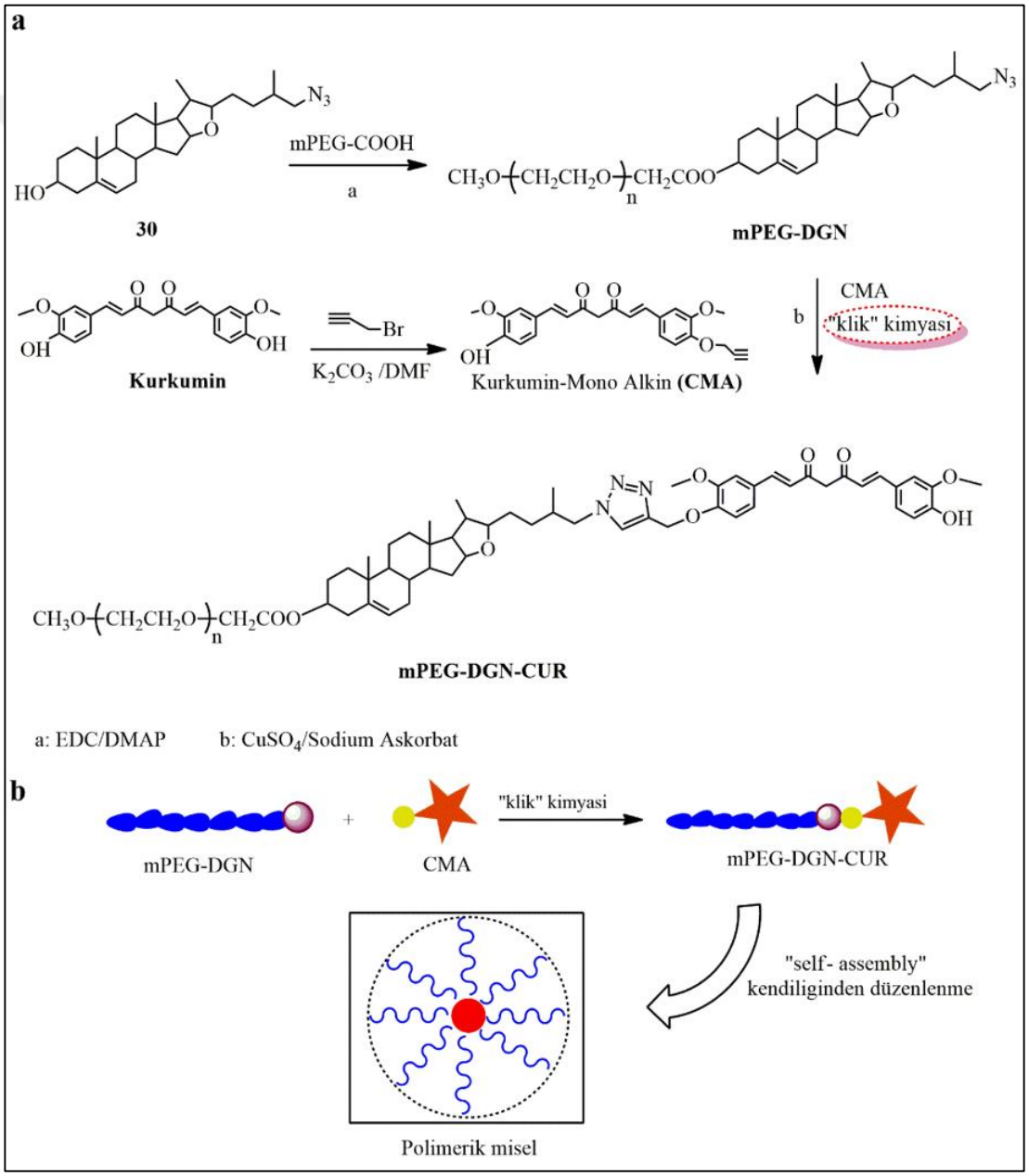
Azot gazı altında olan kuru bir balon içerisine sırasıyla başlatıcı olarak bileşik 28 (0,10 g; 0,24 mmol), monomer olarak ε-cL (2,2 g; 19,35 mmol) ve katalizör olarak $Sn(Oct)_2$ (0,026 g; 0,064 mmol) alındı. Bölüm 2.2.6.1'de anlatıldığı gibi reaksiyona devam edildi. M3-PCL'nin yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 2,15 g (%93), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3450, 2950, 2850, 1720, 1470, 1240.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 11600, $M_w$: 16900, PDI: 1,46.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,35 (br, s, 1H, H-6 (DGN)); 4,59 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,29 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,04 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,95-3,84 (m, 2H, H-26); 3,64 (t, 2H, ($CH_2OH$) son uç grup PCL); 3,28 (m, 1H, H-22); 2,29 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,02 (s, 3H, H-21); 0,99 (d, 3H, H-19 (DGN)); 0,92 (d, 3H, H-27 (DGN)); 0,79 (s, 3H, H-18 (DGN)).




Şekil 2.8. mPEG-DGN-CUR sentezi (a) ve polimerik miselin hazırlanması şematik gösterimi (b)

### 2.2.6.4. M4-PCL sentezi

Azot gazı altında olan kuru bir balon içerisine sırasıyla olarak Bileşik 31 (0,1 g, 0,230 mmol), monomer olarak ε-cL (1,575 g, 13,80 mmol) ve katalizör olarak $Sn(Oct)_2$ (0,018 g; 0,046 mmol) alındı. Bölüm 2.2.6.1'de anlatıldığı gibi reaksiyona devam edildi. M4-PCL'nin yapısı GPC, $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 1,52 g (%91), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3450, 2950, 2850, 1720, 1470, 1240.

GPC (PS, THF, 0,5 ml/dk): $M_n$: 14340, $M_w$: 20620, PDI: 1,43.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,69 (m, 1H, H-6 (DGN)); 4,65 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,28 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,06 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,65 (t, 2H, ($CH_2OH$) son uç grup PCL); 3,41 (m, H-26); 3,30 (m, H-22); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL).

### 2.2.6.5. M1-PCL-MPEG sentezi

mPEG-COOH (0,5 g; 0,102 mmol), DMAP (0,012 g; 0,102 mmol) ve DCC (0,02 g; 0,102 mmol) DCM (5 mL) içerisinde sırasıyla çözündü. Damlatma hunisi içerisine M1-PCL'nin (0,8 g; 0,102) DCM (5 mL) içerisindeki çözeltisi alındı ve damla damla reaksiyona eklendi. Reaksiyon karışımı 12 saat boyunca oda sıcaklığında ve azot gazı altında devam edildi. Ürün önce filtre edildi ve sonra soğuk n-hekzanda üç kere çöktürüldü. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra G4 sinterli süzgeçten süzüldü. Sabit tartıma gelinceye kadar iki gün vakum altında kurutuldu. M1-PCL-MPEG'in yapısı GPC, $^1$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,94 g (%94), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3530, 2950, 2850, 1735, 1470, 1240, 1100, 1050, 950, 840.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 15800, $M_w$: 24200, PDI: 1,52.

$^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,37 (s, 1H, H-6 (DGN)); 4,60 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,37 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,24 (t, 2H, -$CH_2CH_2$OCO-); 4,06 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,65 (m, 4H, -O($CH_2CH_2$O)-); 3,36 (s, 3H, $CH_3$-O-); 2,62 (t, 4H, -OCO$CH_2CH_2$COO-); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL).

### 2.2.6.6. M2-PCL-MPEG sentezi

mPEG-COOH (0,45 g; 0,09 mmol), DMAP (0,011 g; 0,09 mmol) ve DCC (0,018 g; 0,09 mmol) DCM (5 mL) içerisinde sırasıyla çözündü. Damlatma hunisi içerisine M2-PCL'nin (0,8 g; 0,09 mmol) DCM (5 mL) içerisindeki çözeltisi alındı ve damla damla reaksiyona eklendi. Reaksiyona Bölüm 2.2.6.5'te anlatıldığı gibi reaksiyona devam edildi. M2-PCL-MPEG'in yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,89 g (%88), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3530, 2950, 2850, 1735, 1470, 1240, 1100, 1050, 950, 840.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 15500, $M_w$: 22200, PDI: 1,43.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,68 (m, 2H, H-3, H-6 (DGN)); 4,38 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,23 (t, 2H, -$CH_2CH_2OCO$-); 4,06 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,63 (m, 4H, -O($CH_2CH_2O$)-); 3,37 (s, 3H, $CH_3$-O-); 2,62 (t, 4H, -$OCOCH_2CH_2COO$-); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,63 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2O$(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2O$(C=O)) PCL).

### 2.2.6.7. M3-PCL-MPEG'in sentezi

mPEG-COOH (0,52 g; 0,106 mmol), DMAP (0,013 g; 0,106 mmol) ve DCC (0,022 g; 0,106 mmol) DCM (5 mL) içerisinde sırasıyla çözündü. Damlatma hunisi içerisine M3-PCL'nin (0,8 g; 0,106 ) DCM (5 mL) içerisindeki çözeltisi alındı ve damla damla reaksiyona eklendi. Reaksiyona Bölüm 2.2.6.5'te anlatıldığı gibi devam edildi. M3-PCL-MPEG'in yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,89 g (%91), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3530, 2950, 2850, 1735, 1470, 1240, 1100, 1050, 950, 840.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 15400, $M_w$: 20800, PDI: 1,35.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5,35 (br, s, 1H, H-6 (DGN)); 4,59 (m, 1H, H-3 (DGN)); 4,29 (m, 1H, H-16 (DGN)); 4,20 (t, 2H, -$CH_2CH_2OCO$-); 4,04 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,95-3,84 (m, 2H, H-26); 3,63 (m, 4H, -O($CH_2CH_2O$)-); 3,37 (s, 3H, $CH_3$-O-); 3,29 (m, 1H, H-22); 2,42 (t, 4H, -$OCOCH_2CH_2COO$-); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,63 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2O$(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2O$(C=O)) PCL).

### 2.2.6.8. M4-PCL-MPEG sentezi

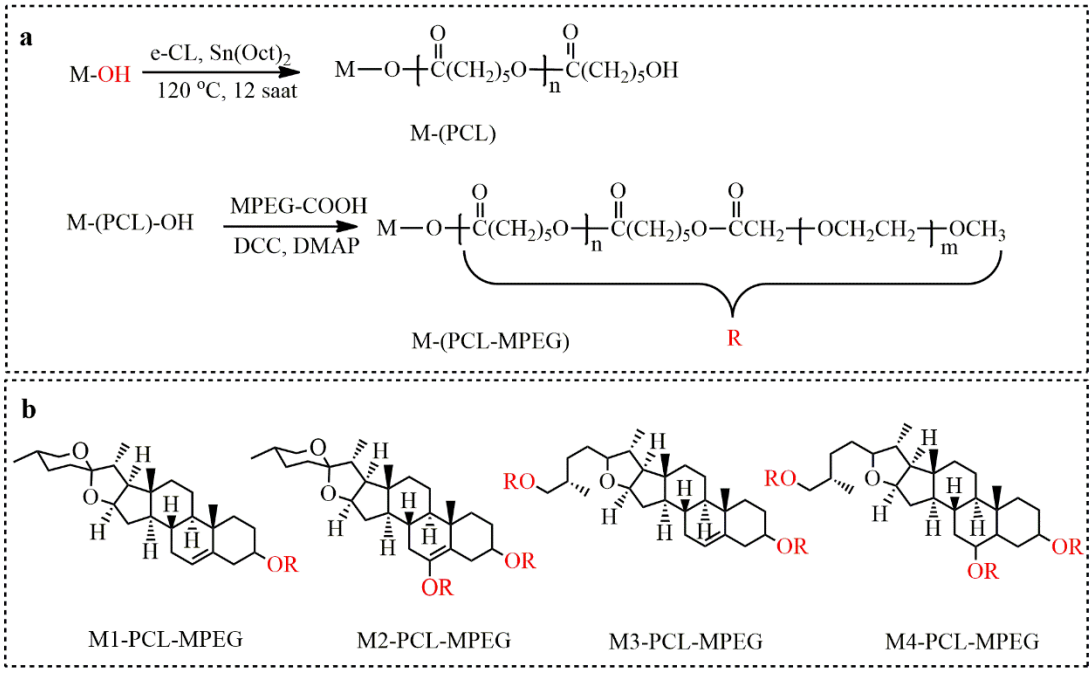
mPEG-COOH (0,54 g; 0,109 mmol), DMAP (0,013 g; 0,109 mmol) ve DCC (0,022 g; 0,109 mmol) DCM (5 mL) içerisinde sırasıyla çözüldü. Damlatma hunisi içerisine M4-PCL'nin (0,8 g; 0,109) DCM (5 mL) içerisindeki çözeltisi alındı ve damla damla reaksiyona eklendi. Reaksiyona Bölüm 2.2.6.5'te anlatıldığı gibi devam edildi. M4-PCL-MPEG'in yapısı GPC, $^{1}$H-NMR ve FTIR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

Verim: 0,95 g (%94), beyaz katı.

FTIR (ATR, $cm^{-1}$): 3530, 2950, 2850, 1735, 1470, 1240, 1100, 1050, 950, 840.

GPC (PS, THF, 0,5 mL/dk): $M_n$: 16100, $M_w$: 22900, PDI: 1,42.

$^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 4,68 (m, 2H, H-3, H-6 (DGN)); 4,27 (t, 2H, -$CH_2CH_2OCO$-); 4,05 (t, ($CH_2O$(C=O) PCL); 3,66 (m, 4H, -O($CH_2CH_2O$)-); 3,27 (s, 3H, $CH_3$-O-); 2,43 (t, 4H, -$OCOCH_2CH_2COO$-); 2,30 (t, (O(C=O)$CH_2$) PCL); 1,64 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL); 1,37 (t, (O(C=O)$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$O(C=O)) PCL).

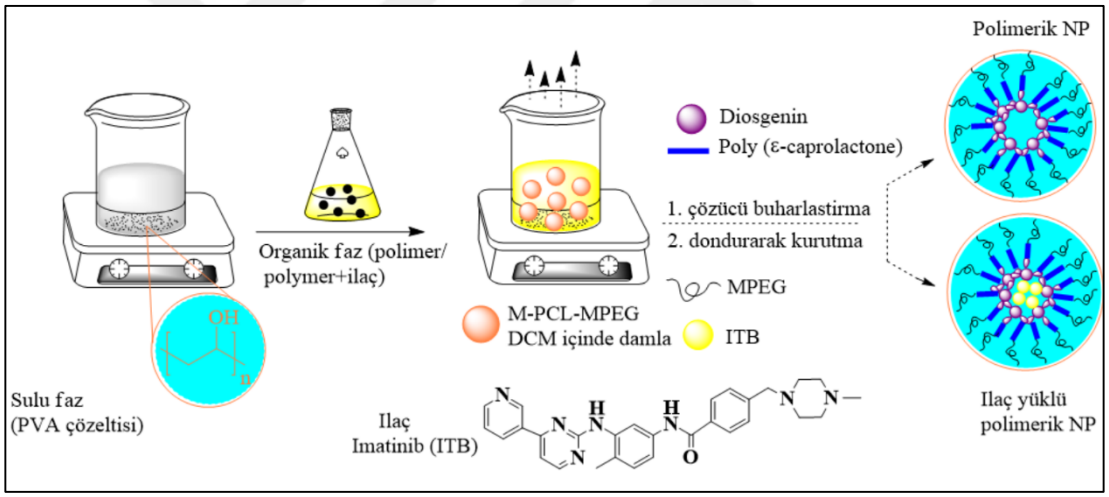



Şekil 2.9. M-PCL-MPEG polimerlerinin sentezi

### 2.2.6.9. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

Bu çalışmada polimerik nanopartiküller (NP) ve ilaç yüklü polimerik NP'ler tekli emülsiyon (yağ/su tipi (o/w)) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlandı.

Polimer veya polimer ve ilaç öncelikle DCM içerisinde çözülerek organik faz hazırlandı. Organik faz, üç dakika süreyle mikrotip sonikatör ile poli (vinil alkol) (PVA) içerisinde emülsifiye edildi. Daha sonra o/w tipi bir emülsiyon oluşturmak için, içinde yüzey aktif madde olarak PVA bulunan sulu çözeltiye damla damla ilave edildi. Bu emülsiyon, bir sonikatör yardımı ile buz banyosu içerisinde dört dakika boyunca 50 volt enerji uygulanarak 5 döngüde homojen nano damlalar haline getirildi. Bu nano damlalar, organik çözücüsü 2 saat boyunca oda sıcaklığında 750 rpm manyetik karıştırıcıda buharlaştırılarak NP haline getirildi (Şekil 2.9b). NP'ler önce 2 dakika boyunca 10,000 g hızda UltraTurrax kullanılarak daha sonra 10 dakika boyunca ultra sonifikasyon ile homojen hale getirildi. Ardından 48 saat boyunca dondurarak kurutma işlemi (Labconco dondurarak-kurutma sistemi, Labconco Corp., Kansas, MO) ile kuru toz ya da katı madde olarak kazanıldı ve ileriki kullanımlar için buzdolabında 4 °C'de muhafaza edildi.




Şekil 2.10. Polimerik NP'lerin hazırlanmasının şematik gösterimi

### 2.2.6.10. Nanopartiküllerin kararlılığı ve optimizasyonunun belirlenmesi

NP'lerin depolanma süresine ve çözelti pH'ına karşı fiziksel ve kimyasal kararlılıkları, partikül büyüklüğü dağılımı (PSD) ve polidispersite indeksi (PDI) açısından değerlendirildi. NP'lerin hazırlanmasında en uygun koşulu belirlemek için çeşitli değişkenler belirlendi. Organik fazdaki polimer konsantrasyonu, sulu fazdaki PVA konsantrasyonu ve sulu/organik faz oranı olmak üzere değişkenlerin partikül büyüklüğü üzerindeki etkileri incelendi.

İlaç yüklü NP'ler (100 μL, 4 mg polimer), mide ortamını taklit eden 0,1 N HC1çözeltisi (1 mL) içerisinde ve hafif mekanik karıştırma altında 37 °C'de inkübe edildi. Aynı protokol NP kararlılığını aç mide bağırsak sıvısı taklit edilerek uygulandı. Bu sıvı $KH_2PO_4$ (22,4 mM), NaOH (pH 6,5), sodyum taurokolat (3 mM), lesitin (0,75 mM) ve KCI (0,1 M) karışımından hazırlandı. Zamana karşı nanopartikül büyüklüğü izlendi.

### 2.2.6.11. Kapsülleme verimliliği ve ilaç yükleme kapasitesinin belirlenmesi

İlaç (Imatinib, ITB) yüklü NP'lerde ilaç yükleme (% DL) ve kapsülleme verimliliği yüzdeleri (% EE), UV-vis spektrofotometre kullanılarak belirlendi. % EE, nanopartiküle yüklenen nihai ilaç miktarının, NP'lerin hazırlanmasında kullanılan başlangıç ilaç miktarına göre yüzdesi olarak tanımlandı. Kısaca, dondurularak kurutulmuş ilaç yüklü NP'ler (10 mg) fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) (10 mL) santrifüjlendi (10 dakika boyunca 6000 gr) ve çökelekten ayrılan kısım toplandı. Çözeltinin absorbansı spektrofotometrik olarak 265 nm'de ölçüldü.

Absorbans ölçümleri daha sonra standart kalibrasyon eğrileri yardımı ile ilaç konsantrasyonlarına dönüştürüldü ($R^2$= 0,999). ITB yüklü NP'lerin kapsülleme verimliliği (% EE) ve ilaç yüklemesi (% DL) yüzdeleri, Denklem (2.1) ve (2.2) kullanılarak hesaplandı;

$$\text{DL (\%)} = \frac{\text{Yüklenen ITB miktarı (mg)}}{\text{Nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \qquad (2.1)$$

Deneysel ilaç yüklemesi (EDL), dondurularak kurutma sonrası ilacın ağırlığının, dondurularak kurutma sonrası ilacın ve polimerlerin ağırlığına oranı olarak hesaplandı. Teorik ilaç yüklemesi (TDL), ilave edilen ilacın ağırlığının, polimerlerin ağırlığına ve ilacın ilavesine oranı olarak hesaplandı [53];

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Deneysel ilaç yükleme (EDL)}}{\text{Teorik ilaç yükleme (TDL)}} \times 100 \qquad (2.2)$$

### 2.2.6.12. Nanopartiküllerden in vitro ilaç salımı

İlaç yüklü NP'lerin in vitro ilaç salım çalışmaları, 100 rpm'lik bir hızda diyaliz tekniği kullanılarak yapıldı. İlaç salım mekanizması, vücudun fizyolojik sıcaklığı, plazmanın ve kanserli hücrelerin fizyolojik pH'ları taklit edilerek test edildi.

ITB yüklü NP (10 mg), PBS (2 mL) içerisinde süspanse edildi ve bir diyaliz membranına aktarıldı (MWCO, 12 kDa). Diyaliz membranları, 37 °C'de PBS (50 mL) pH (7,4 ve 3,5) çözeltileri içeren şişelere yerleştirildi. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında, ilaç içeriğinin analizi için salım ortamından 1 mL örnek alındı ve orijinal hacmini korumak için 1 mL taze ortam ile değiştirildi. İlaç salım miktarı, 265 nm'de standart eğriye dayanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm analizler üç bağımsız çalışmanın ortalaması alınarak yapıldı. Kümülatif ilaç salım (CDR) yüzdesi Denklem (2.3) kullanılarak hesaplandı;

$$\text{CDR } (\%) = \frac{D_1}{D_0} \times \frac{V_1}{V_0} \times 100 \qquad (2.3)$$

Burada $D_o$ ve $V_o$, sırasıyla diyaliz membranı içindeki konsantrasyon ve hacimdir. $D_1$ ve $V_1$ ise sırasıyla diyaliz membranı dışındaki konsantrasyon ve hacimdir.

### 2.2.7. Pickering emülsiyonlarının hazırlanması

#### 2.2.7.1. Nano kristalin selülozun hazırlanması

Bu kısımda kullanılan nanokristalin selüloz (NS), önceki çalışmaların prosedürlerinde bazı küçük değişiklikler yapılarak $H_2SO_4$ hidrolizi ile hazırlandı [54, 55].

İlk olarak, kurutulmuş mikrokristalin selüloz (MS) (1g) tozunun destile su (10 mL) içinde dağıtılmasıyla ağırlıkça %10'luk bir çözelti hazırlandı. İstenen son konsantrasyonu (ağırlıkça %62) elde etmek için belirlenen hacimde $H_2SO_4$ stok çözeltisi buz halinde MS çözeltisine damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı 50 °C'de 120 dakika boyunca karıştırıldı. Hidroliz işlemini durdurmak için suyla seyreltildi (10 kat). Süspansiyon, asidi gidermek için destile su kullanılarak 4000 g ve beş döngü halinde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra pH 7'ye kadar diyaliz edildi ve kararlı bir kolloidal dispersiyon elde etmek için ultrasonikatör homojenleştirici kullanılarak 30 dakika boyunca ultrasonik hale getirildi. Son olarak bir kez daha 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve daha sonra süpernatan NS olarak toplandı ve bir liyofilizer kullanılarak dondurularak kurutuldu (NS: 50-200 nm uzunluğunda, çubuk yapısında ve ağırlıkça %1,07 sülfür içermektedir).

### 2.2.7.2. NS veriminin ve çözünürlüğünün belirlenmesi

Santrifüjleme kullanılarak, selüloz numunesinin çözünmeyen kısımları asitten ayrıldı, yıkandı ve dondurularak kurutuldu. Asitle muamele edilmiş selüloz numunelerinin NS verimi, çözünürlük ve MS kalıntı yüzdeleri Denklem (2.4) ve (2.5) kullanılarak hesaplandı;

$$\text{Verim} = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \tag{2.4}$$

$$\text{Çözünürlük} = \left[1 - \frac{W_1}{W_0}\right] \times 100 \tag{2.5}$$

$W_0$, MC numunesinin başlangıç kuru ağırlığı ve $W_1$, NS numunesinin kurutulmuş ağırlığıdır.

### 2.2.7.3. NS'nin desülfasyonu

NS nanopartiküllerinin hazırlanması, selüloz omurgası üzerindeki hidroksil (-OH) gruplarının, son ürün olarak negatif yüklü NS matrisi üreten sülfat grupları ile değiştirilmesi yoluyla gerçekleştirildi. NS omurgasında hidroksil gruplarını yeniden koordine etmek için, hafif alkali koşullarda kükürt giderme işlemi yapıldı. Daha önce tarif edildiği gibi, ağırlıkça %9 NS çözeltisi hazırlandı ve ağırlıkça %7 NaOH çözeltisi ile karıştırıldı [56]. Karışım daha sonra 4 saat boyunca 65 °C'de karıştırılarak tam kükürt oluşması sağlandı. Desülfatlanmış nanokristalin selüloz (DNS) 4000 g'de 5 dakika santrifüjlendi, birkaç kez yıkandı ve destile su kullanılarak pH 7'ye karşı diyaliz edildi. Numune daha sonra dondurarak kurutuldu ve ayrıca sülfat gruplarının varlığı için analiz edildi.

### 2.2.7.4. Kuaternize-nano selüloz sentezi

Nanoselüloz'un (NS) katyonizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, NS bazikleştirilmesi ve 3-kloro-2-hidroksi propil trimetilamonyum klorürün (CHPTAC) hidroksit iyonları reaksiyon yoluyla epoksi propil trimetilamonyum klorüre (EPTAC) dönüştürülmesidir. İkinci aşamada ise, selülozun anhidroglikoz birimi (AGU) üzerindeki C6'ya bağlanmış hidroksil grubunun nükleofilik yerdeğiştirmesidir.

NS (2,5 g) 1M NaOH (50 mL) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 90 dakika boyunca süspansiyon haline getirildi ve şişirildi. Karışım, buz banyosunda 10 dakika boyunca homojenleştirildi. EPTAC oluşumu ise buz banyosu içerisindeki ayrı bir reaksiyon balonunda, CHTAC (ağırlıkça %65, 16 mL) katyonlama ajanıyla 1,5 M NaOH (50 mL) ile reaksiyona sokularak gerçekleştirildi. NS'un tamamen AGU'dan oluştuğu varsayılarak, hazırlanan EPTAC karışımı, CHTAC: AGU 4:1 molar oranına sahip son süspansiyon elde etmek için bazik aktifleştirilmiş NS'ye ilave edildi. Karışım kuaternize-nanoselüloz (Q-NS) elde etmek için 15 saat boyunca 600 rpm karıştırma hızında 60 °C'de ısıtıldı. Reaksiyon karışımı sırasıyla HC1 ile nötralleştirildi, süzüldü ve destile su ile iyice yıkandı. Elde edilen Q-NS, destile suda (0,5 ağırlıkça/hacim) tekrar süspansiyon haline getirildi ve 400 rpm karıştırma hızında 24 saat boyunca karıştırıldı. Örnek daha sonra reaksiyona girmemiş kısımları gidermek için sırasıyla nötr pH'a karşı diyaliz edildi (MWCO, 12 kDa), dondurularak kurutuldu, ileriki analizler ve uygulamalar için buzdolabında saklandı.

#### 2.2.7.5. Diosgenin konjuge aljinat (DGN-ALG) hazırlanması

DGN-ALG'nin hazırlanması, daha önce tarif edildiği gibi esterleşme reaksiyonu kullanılarak gerçekleştirildi [57]. Aljinik asit sodyum tuzu (1 g; 5,05 mmol heksuronik asit birimi) yavaşça su: DMSO (100 mL, 1:1 hacimce) karışımına eklendi ve iyi süspanse olmuş aljinat elde etmek için gece boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Aljinat omurgasında karboksil gruplarını aktive etmek için, karışıma DCC (0,1 g; 0,5 mmol) ve DMAP (0,05 g; 0,4 mmol) ilave edildi ve bir saat daha karıştırıldı. Daha sonra DGN'nin (1 g; 2,4 mmol) DMSO (50 mL) içindeki karışımı ilave edildi ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırma devam edildi. Daha sonra elde edilen karışım önce iki gün boyunca DMSO'ya karşı ardından üç gün boyunca destile suya karşı diyaliz edildi (MWCO, 12 kDa). Elde edilen çökelti önce dietileter sonra destile su ile yıkandı. Kuru DGN-ALG elde etmek için dondurularak kurutuldu.

#### 2.2.7.6. Nanoemülsiyonların hazırlanması ve optimizasyonu

Nanoemülsiyonlar (NE) su içinde yağ (o/w) yaklaşımıyla, suda çözünebilen emülgatör (Tween 80) varlığında yağ ve sulu fazların birbirine hızlı bir şekilde karıştırılması ile hazırlandı [58]. Değişen miktarlarda jojoba yağı ve Tween 80 içeren yağ fazı 40 °C'de

30 dakika boyunca manyetik olarak karıştırıldı. Sulu faza damla damla aktarıldı ve 15 dakika 1000 rpm'de karıştırıldı.

Öncelikle karışım 10,000 g'da 2 dakika süreyle UltraTurrax® karıştırıcıda emülsiyon haline getirilerek, su içinde yağ emülsiyonları üretildi. Daha sonra emülsiyonlar, buz-su banyosu içinde 10 dakika boyunca NE damlacıkları üretmek için ultrasonik olarak homojenleştirildi. Bununla birlikte, hazırlanan NE'ler için en uygun koşulu belirlemek için, yağ/sulu faz oranı, elde edilen NE'lerin partikül büyüklüğü ve PDI üzerindeki etkisini saptamak üzere değiştirildi.

#### 2.2.7.7. Çok katmanlı Pickering emülsiyonlarının hazırlanması

Pickering emülsiyon (PE) sistemleri daha önce açıklanan protokolde küçük değişiklikler yapılarak hazırlandı [59]. İstenilen boyutlarda emülsiyon damlacıkları elde etmek için, önceden farklı oranlarda Tween 80 ve jojoba yağı kullanılarak NE'ler hazırlandı. Hazırlanan NE'ler için en uygun koşullar, o/w oranı 10/90 olduğu belirlenerek Q-NS ve DGN-ALG polielektrolitleri ile kararlılaştırılmış çok katmanlı PE'ler elde edildi. Çok katmanlı PE sistemi için birinci katman, yağ fazı (Tween 80 + jojoba yağı) fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS= pH 7) içinde ağırlıkça %0,2 eşit miktarda dağılmış Q-NS içeren sulu faza damla damla enjekte edilerek hazırlandı. Karışım, yüksek hızlı vorteks kullanılarak 2 dakika boyunca 10,000 rpm'de homojenleştirildi, ardından 10 dakika boyunca ultrasonikasyon yapıldı. İkinci katman olarak ayrı hazırlanan değişken DGN-ALG konsantrasyonları (ağırlıkça %0,2; 0,4 ve 0,6) içeren sulu faz, birinci katman üzerine damla damla ilave edildi. Anyonik aljinatın katyonik emülsiyon damlacığı yüzeylerine elektrostatik etkileşim yoluyla adsorpsiyonunu ve ikinci emülsiyon katmanının oluşumunu arttırmak için sistemin pH'ı 9'a ayarlandı. Hazırlanma sırasında oluşan topaklanmış damlacıkları bozmak için katmanlar arası ara yüzey sırasıyla 30 dakika boyunca karıştırıldı, vorteks ve ultrasonik yöntemlerle homojenize edildi ve kararlı hale getirildi. Emülsiyonlar daha sonra analizler için bir gece saklandı.

#### 2.2.7.8. Emülsiyon kararlılığı ve damlacık büyüklüğü üzerine etkilerin incelenmesi

Farklı koşulların emülsiyon damlacıklarının kararlılığı üzerindeki etkileri, parametrik değerdeki değişimin bir fonksiyonu olarak dinamik ışık saçılım cihazı (DLS, Zetasizer,

Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) ile ortalama emülsiyon damlacık çapındaki (Z-ortalama) ve PDI değişimler ölçülerek incelendi. Bu parametereler aşağıdaki sırasıyla verildi.

İyonik kuvvet (NaCl) etkisi: Tuz konsantrasyonunun emülsiyon damlacıklarının kararlılığı üzerindeki etkisi, PBS (pH 7,4) çözeltisinde önceden belirlenmiş PE emülsiyon miktarlarının, farklı NaCl konsantrasyonları (10, 50 ve 100 mmol/L) ile karıştırılmasıyla incelendi.

Depolama süresi: Q-NS/DGN-ALG ile kararlılaştırılmış PE'lerin uzun süreli kararlılığını incelemek için, emülsiyonlar bir ay boyunca yaklaşık 25 °C oda sıcaklığında depolandı. İlk miktarlar 30 gün boyunca aralıklarla toplandı ve ardından kararlılık için analiz edildi.

Isıl işlem: PE'ler bir gün boyunca belirlenen sıcaklıklarda (4 °C, 25 °C ve 40 °C) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, PE'ler analizden önce oda sıcaklığına (25 °C) getirildi.

Polimerik stabilizatör konsantrasyonunun etkisi: DGN-ALG konsantrasyonunun (emülsiyon damlacık dış kaplama katmanı olarak) etkisine ilişkin değerlendirmeler, emülsiyon kararlılığı üzerindeki etkilerini inceleyerek yapıldı. Değişken DGN-ALG içeriği ağırlıkça %0,2; %0,4 ve %0,6 olan emülsiyonlar, PBS (pH 7,4) çözeltisi kullanılarak hazırlandı ve PE'lerin kararlılığı üzerindeki etkileri için analiz edildi.

### 2.2.7.9. İlaç kapsülleme ve yük içeriğinin belirlenmesi

Model ilaç olarak quinalizarin, yağ fazında çözüldü ve karışım, tam çözünmenin sağlanması için 1 saat boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Karışım, çözünmeyen kısmı ayırmak için 6000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant içindeki ilaç miktarı, bir UV/vis spektrofotometresi ile belirlendi.

Standart ölçüm eğrileri geliştirilerek, farklı konsantrasyonlarda quinalizarin absorbansının, etanol/PBS çözeltisi (9,5:0,5 hacim/hacim) içinde 492 nm'de maksimum dalga boyu (λ) absorpsiyonuna sahip olduğu belirlendi. Absorbans ölçümleri daha sonra Denklem (2.6) kullanılarak quinalizarin konsantrasyonlarına dönüştürüldü;

$$\text{Absorbans} = 0{,}0641 \times \left[\text{ilaç } (\frac{\mu g}{mL})\right] - 0{,}0379 \qquad (R^2 = 0{,}968) \qquad (2.6)$$

İlacın kapsülleme verimliliği yüzdesi (EE (%)) Denklem (2.7) kullanılarak hesaplandı;

$$EE\ \% = \frac{\text{toplam yüklenen ilaç-serbest kalan ilaç}}{\text{toplam yüklenen ilaç}} \quad (2.7)$$

### 2.2.7.10. PE sistemlerinde ilaç kararlılığı ve ilacın in vitro salım çalışmaları

Q-NS/DGN-ALG ile kararlaştırılmış PE'lerde quinalizarinin kararlılığı, numuneleri karanlıkta oda sıcaklığında 8 günlük bir süre boyunca saklayarak, depolama zamanının bir fonksiyonu olarak araştırıldı. 24 saatlik zaman aralıklarında quinalizarin konsantrasyonu, yukarıda belirlenen yöntem kullanılarak λ= 492 nm'de UV/vis spektrofotometresi ile belirlendi. Yüklenen ilacın bozunma yüzdesi Denklem (2.8)'e göre hesaplandı;

$$\text{Bozunma}\ \% = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100 \quad (2.8)$$

Burada $D_0$, PE'de başlangıçta yüklenen ilaç konsantrasyonu, $D_t$, belirli zaman aralıklarında PE'deki yüklü ilaç konsantrasyonudur.

PE'lerden quinalizarin in vitro salım yüzdesi, diyaliz yöntemi ile belirlendi. Plazmanın fizyolojik pH'ı (pH 7,4) taklit ederek değerlendirmeler yapıldı. Kısaca, 20 mL ilaç yüklü PE diyaliz membranlarına aktarıldı (MWCO, 12 kDa) ve 0,1 M PBS çözeltisi (100 mL) ve hacimce %15 etanol içeren pH 7,4 çözeltsinde süspanse edildi. Daha sonra 100 rpm çalkalama hızında ve 37 °C çalkalamalı su banyosuna alındı. Numuneler 18 günlük düzenli zaman aralıklarında toplandı ve λ = 492 nm'de UV/vis spektrofotometresi ile analiz edildi. Daha sonra emülsiyon sisteminden kümülatif ilaç salım yüzdesi (% CDR) Denklem (2.9) kullanılarak hesaplandı;

$$CDR\ \% = \frac{\text{Salım olan ilaç miktarı}}{\text{Kapsüllenen toplam ilaç miktarı}} \times 100 \quad (2.9)$$

### 2.2.7.11. Bulanıklık ve kritik toplanma konsantrasyon analizi

Hazırlanan NE ve PE'lerin bulanıklığı, bir UV/vis spektrofotometresi kullanılarak λ = 600 nm'de ölçüldü. Ölçümlerden önce emülsiyonlar, PBS çözeltileri (pH 7,4) kullanılarak ağırlıkça %0,01 ile %0,3 arasında değişen yağ konsantrasyonlarına

seyreltildi. Okumalar üç tekrar halinde yapıldı ve ortalamalar kaydedildi. Bulanıklık artışını belirlemek için yağ fazı konsantrasyonuna karşı bir bulanıklık grafiği oluşturuldu [60]. Ek olarak, hazırlanan emülsiyon sistemlerinin türüne ilişkin değerlendirmeler analiz edildi. 1 mL hazırlanmış NE, sırasıyla saf jojoba yağına (10 mL) ve saf distile suya (10 mL) yavaş ve ayrı bir şekilde ilave edildi. Sulu fazda dağılmış emülsiyon damlacıkları ve yağ fazında gösterilen aglomerasyon göz önüne alındığında, sistemin bir yağ/su tipi emülsiyonu olduğu ve bunun su/yağ emülsiyon sisteminin tam tersi olduğu teyit edildi. Çok katmanlı PE'lerin kritik toplanma konsantrasyonları (CAC), hidrofobik floresan probu olan piren kullanılarak belirlendi. Aseton içindeki piren çözeltisi (10 μL, $10^{-4}$ M) boş numune şişelerine aktarıldı. Asetonun buharlaşmasının ardından, örnek şişelerine konsantrasyonları 0,01 ile 0,000005 mg/mL arasında değişen PE çözeltileri (1 mL) ilave edildi. Karışımlar analizden önce oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat bekletildi. Piren ve PE çözeltilerinin emisyon spektrumları, 25 °C'de floresan spektrofotometresi kullanılarak $\lambda = 390$ nm'de elde edildi. Piren uyarılma piklerinin 338 ve 335 nm'lerde şiddetlerinin oranı kaydedildi ve polimer konsantrasyonunun (log C) logaritmik değerine karşı grafik çizildi. İki eğim çizgisinin kesişiminin karşılık geldiği apsis koordinatı CAC olarak kaydedildi. İki eğim çizgisi, $I_{338}/I_{335}$ karşı log C grafiğindeki ani bir artıştan önce ve sonra olarak belirlendi.

#### 2.2.7.12. Kremleşme indeksi ölçümleri

İlaç yüklenmemiş ve yüklü sistemler için PE'ler (3 mL) şişelerde saklandı ve bir hafta boyunca izlendi. Krema katmanının kalınlığı, farklı zaman aralıklarında ölçüldü ve kaydedildi. Kremleşme indeksi yüzdesi (% KI) Denklem (2.10) kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ KI} = \frac{L_S}{L_E} \times 100 \qquad (2.10)$$

$L_S$, üst krem katmanının yüksekliği ve $L_E$ ise toplam emülsiyon yüksekliğidir.

### 2.2.8. Karakterizasyon metodları

$^1$H NMR spektrumları, tetrametilsilan (TMS) iç standard olarak kullanılarak Bruker Avance III 500 MHz spektrometresi ve FTIR spektrumları zayıflatılmış toplam

yansıtma (ATR) usulü kullanılarak Perkin-Elmer Paragon 1000 spektrometresi üzerinde kaydedildi. Tam kütle tayini (HRMS) analizleri MS-High Resolution Mass Time-of-Flight (TOF) cihazında ölçüldü. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri, bir pompa, bir kırılma indeksi detektörü, iç standart olarak toluen ve 23 °C'de 0,5 mL/dakika akış hızında THF kullanılarak iki Waters Styragel kolonu (HR 5E) içeren bir Agilent GPC Enstrümanında (Model 1100) gerçekleştirildi. Sentezlenen polimerlerin ortalama moleküler ağırlıkları ve moleküler ağırlık dağılımları, moleküler ağırlıkları bilinen lineer polistiren (PS) standartları ile geliştirilen bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak Chem Station (Rev. A. 10.02) yazılımı ile belirlendi. Polimerlerin erime noktalarını ve kristalleşme sıcaklıklarını belirlemek için 10 mL/dakikalık azot akışı altında diferansiyel tarama kalorimetri analizi (DSC) DSC 4000'de (Perkin Elmer) yapıldı. Numuneler ilk önce belirlenen metodta 10 °C/dk'lık bir hızla iki kez ısıtıldı ve soğutuldu. Termogravimetrik analiz (TGA), azot atmosferi altında oda sıcaklığından 700 °C'ye kadar 10 °C/dak'lık bir ısıtma oranına sahip TGA/SDTA 851 (Mettler Toledo) termogravimetrik analizör üzerinde yapıldı. Faz geçiş davranışları polarize optik mikroskopi (POM, Nikon Eclipse LV100POL Polarizing Mikroskobu) ile gözlendi. Erime noktaları, açık cam kılcal boru ile Stuart erime noktası cihazında (SMP-30) kaydedildi. UV-vis ve floresans spektrumları, sırasıyla Shimadzu 2001 UV ve Varian Eclipse spektrofotometrelerinde 1 cm yol uzunluğu küvetler kullanılarak kaydedildi. Partikül boyutu dağılımı, hidrodinamik büyüklük ve nanopartikül süspansiyonlarının zeta potansiyeli, DLS kullanan bir Zetasizer'da (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments Ltd, UK/Zetasizer yazılımı V2.3) belirlendi. Taze hazırlanmış örnekeler deiyonize su içinde uygun şekilde seyreltildi ve ultrasonikasyon yapılarak homojenleştirildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında yapıldı ve üç ölçümün ortalaması olarak kaydedildi. NP'lerin morfolojileri ve büyüklüğü, bir JEOL JEM200CX cihazında 200 kV hızlanma voltajında analiz edildi. Örnekler başlangıçta seyreltilmiş dispersiyonlar oluşturmak için ultrasonik hale getirildi. Süspansiyonun bir damlası, numune kabının yüzeyine yerleştirilen bakır bant üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Görüntüleme daha sonra bir Philips CM-10 TEM (New York, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Yüzey katyonik yer değiştirme oranını hesaplamak için element analiz cihazı (LECO, CHNS-932) kullanıldı. MTT testi bir mikroplaka okuyucu (Elisa, ABD)

kullanılarak yapıldı. Hücresel alım görüntüleme çalışmaları konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM, PS8, Leica, Almanya) üzerinde yapıldı.

#### 2.2.8.1. İn vitro sitotoksisite çalışması

Fibroblast hücre hatları (L929), akciğer (A549), meme (MCF-7), kemik (SAOS-2) ve ilik (K562) kanseri hücreleri, FBS (Fetal Bovine Serum) (%10 v/v), penisilin (10000 U/ml) (%1 v/v) ve streptomisin (10 mg/mL) ile birlikte DMEM çözeltisine (Dulbeco Modifiye Eagle's Medium) kültürlendi. Hücreler T-75 geçirilmiş polistiren doku şişelerinde büyütüldü ve %5 $CO_2$'li nemli ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Kültür ortamı farklı günlerde değiştirildi ve hücreler PBS içinde tripsin/etilendiamin tetraasetik asit (%0,02:%0,25) ile ayrılarak geçirildi. Elüsyon testi yöntemi, örneklerden bir özüt elde etmek için kullanıldı. %5 FBS ve 100 µg/mL penisilin-streptomisin ile birlikte DMEM çözeltisi içine alınan 0,5 g/mL analizi istenen örnekler, %5 $CO_2$ ve 37 °C'de 24 saat için inkübatöre yerleştirildi ve böylece herhangi bir çözünür faktör DMEM içine sızması engellendi. Daha sonra, alınan elüsyonlar 0.22 µm şırınga kullanılarak steril hale getirildi. WST ve MTT analizleri için taze DMEM çözeltisi kullanılarak %1 konsantrasyonda fenol (kontrol olarak) çözeltisi ve tüm örneklerin belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. L929, A549, MCF-7, SAOS-2, K562 hücreleri $10^5$ hücre/mL'lik bir ekim yoğunluğuna sahip 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekimden sonra, hücreler 37 °C'de %5 $CO_2$ içeren bir ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Ekimden sonra, kuyucuklardaki kültür ortamı, 100 µL/kuyucuk olarak hazırlanan örnek elüsyon konsantrasyonları ile değiştirildi (üç kez). Ekstrakt içermeyen serbest ortamlı hücreler, yaşayan hücreleri belirlemek için kullanıldı. Hücreler, pozitif kontrol olarak DMSO ile muamele edildi. Ekstre konsantrasyonlarının eklenmesinden sonra, hücreler sitotoksisite ve proliferatif etkileri gözlemlemek için 24 saat inkübe edildi. Son olarak, sitotoksisite ve çoğalmayı belirlemek için bir kolorimetrik WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum) veya MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi kullanıldı.

Her bir kuyucuğa 10 µL WST veya MTT çözeltisi (5 mg WST(MTT)/ml PBS) ilave edildi ve 3 saat 37 °C'de inkübe edildi, böylece hücrelerde formazan kristalleri oluşması sağlandı. Daha sonra, formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 100 µL

DMSO eklendi. 30 dakika sonra, optik yoğunluk (OD), Elisa Reader cihazı (Thermoscientific Multiskan GO) kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

Ekstresi olmayan negatif kontrol grubunun ortalama OD570 değeri %100 canlı olarak standardize edildi ve test örneklerinin OD570 değerleri bu değerle karşılaştırıldı. Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon ($IC_{50}$), OriginPro 9 (OriginLab, Northampton, ABD) programında Boltzmann sigmoidal fonksiyonu kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi ile belirlendi. PE'lerde kullanılan iki ilaç arasındaki kombinasyon etkisini (CI) Denklem (2.11) kullanılarak belirlendi;

$$CI = \frac{D_{C1}}{D_{S1}} + \frac{D_{C2}}{D_{S2}} \tag{2.11}$$

Burada $D_{C1}$ ve $D_{C2}$ kombinasyon tedavisinde kullanılan ilaçların $IC_{50}$ değerlerini, $D_{S1}$ ve $D_{S2}$ ise ilaçların tek tek $IC_{50}$ değerlerini gösterdi. CI değeri 1'den küçükse ilaç sinerjizmini, 1'den büyük ise antagonistik, ve 1'e eşit ise eşit katkı olduğunu gösterdi [25]. İlaç yüklü PE'lerin hücresel alımı konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) ile analiz edildi. CLSM gözlemi için hücreler altı oyuklu bir plakaya (oyuk başına $5x10^4$ hücre) kaplandı ve 24 saat boyunca DMEM ortamı içinde inkübe edildi. Daha sonra ortam, ilaç yüklü PE'ler ile (ilaç konsantrasyonu= 3,5 μg/mL) değiştirildi ve 4 saat boyunca inkübasyona devam edildi. Daha sonra, hücreler PBS çözeltisi ile üç kez durulandı ve 30 dakika boyunca %4 paraformaldehit ile sabitlendi. Son olarak, çekirdekler 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, mavi) ile lekelendi. Floresans davranışları CLSM (PS8, Leica, Almanya) ile gözlendi.

### 2.2.9. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler %5 olasılık düzeyinde varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Farklı gruplar arasındaki istatistiksel önemi belirlemek için ANOVA ve OriginPro 9 yazılımı (Origin Lab Northampton, MA, ABD) kullanıldı. Tüm ölçümler üç tekrar halinde yapıldı ve sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak rapor edildi (n = 3). P değerleri< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

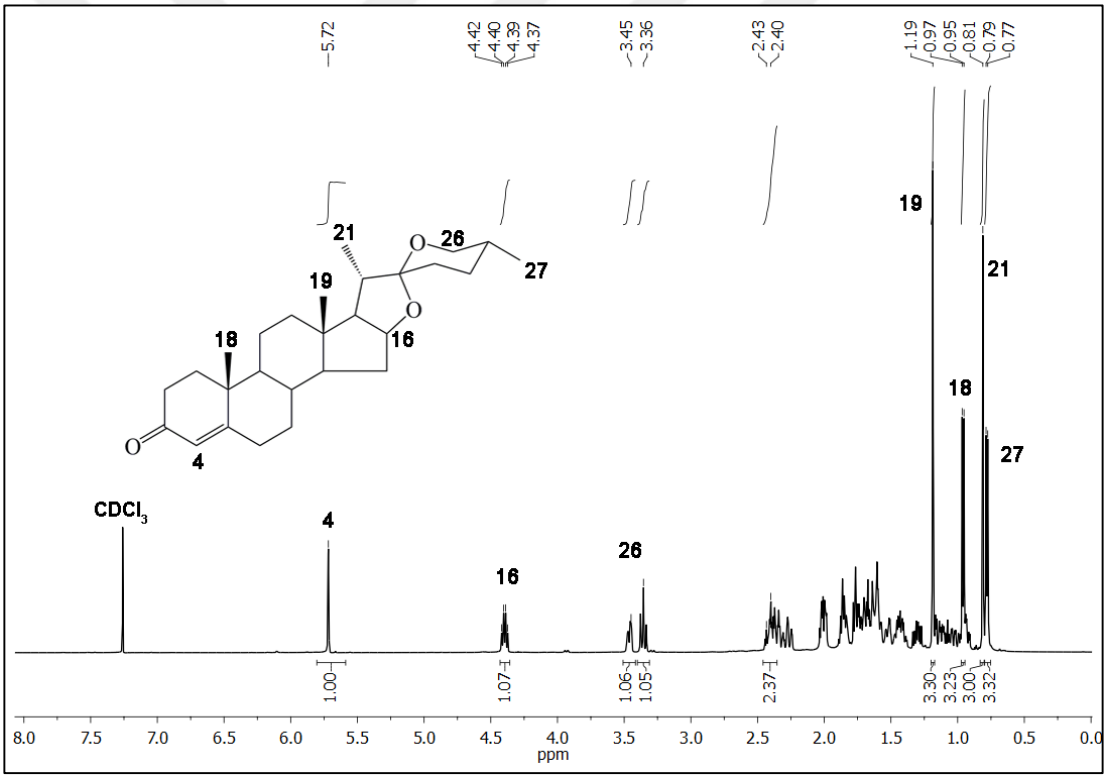
# 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 3.1. A-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türev Bileşiklerin Sentezi

3-Keto A-Nor-spirostanların sentezi dört basamaklı reaksiyon süreci ile elde edildi (Şekil 2.1). Birinci basamakta, diosgenin başlangıç bileşiği olarak kullanılarak "Oppenauer oksidasyonu" yöntemi ile yükseltgenme reaksiyonu gerçekleştirildi. Yükseltgenme sonucunda yaygın adı ile diosgenon olarak bilinen bileşik 1 %90 verimle elde edildi. Oppenauer reaksiyonu, ikincil alkollerin ketonlara yükseltgenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Yükseltgeyici olarak alüminyum isopropoksit, alüminyum tri-sek-butoksit, alüminyum ter-bütoksit gibi alüminyum reaktifleri kullanılır. Bu reaktifler arasında en çok kullanılan alüminyum isopropoksittir. Alüminyum reaktifinin başlangıç bileşiğine oranı 0,3-1,5 arasında olması öngörülmektedir. Aynı zamanda bu reaksiyonda kullanılan çözücünün benzen, toluen, ksilen veya mesitilen gibi su sevmeyen çözücüler olması gerekir. En çok tercih edilen çözücü toluendir. En çok kullanılan indirgeyici ajanlar ise aseton, etilmetilketon, asetofenon ve siklohekzanondur. Bunların arasında en çok tercih edilen siklohekzanondur. Reaksiyon süresi kullanılan çözücü ve reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak 30 dakika ile 4 saat arasında değişmektedir. En uygun reaksiyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir. Reaksiyon mekanizması halka geçiş hali üzerinden yürür [61]. Bu reaksiyon tersinir bir reaksiyondur. O nedenle indirgeyici ajanın aşırısının kullanımı ürün oluşumu yönüne olur. Bileşik 1'e ait oda sıcaklığında alınan FTIR spektrumu incelendiğinde; 2950 ve 2857 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler C-H gerilme frekansına karşılık gelmektedir. Spektrumda 1675 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pik karbonil (C=O) gerilme frekansına karşılık gelmektedir. Bileşik 1'in yapısında bulunan çift bağ ise 1615 $cm^{-1}$'de gözlenmektedir. 1100 $cm^{-1}$'de gözlenen pik ise C-O-C gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. Gözlenen FTIR sinyalleri bileşik 1'in beklenen yapısı ile uyumluluk göstermektedir.

$^{1}$H-NMR spektroskopisinden elde edilen veriler α,β-doymamış keton olan bileşik 1'in sentezlendiğini göstermektedir.

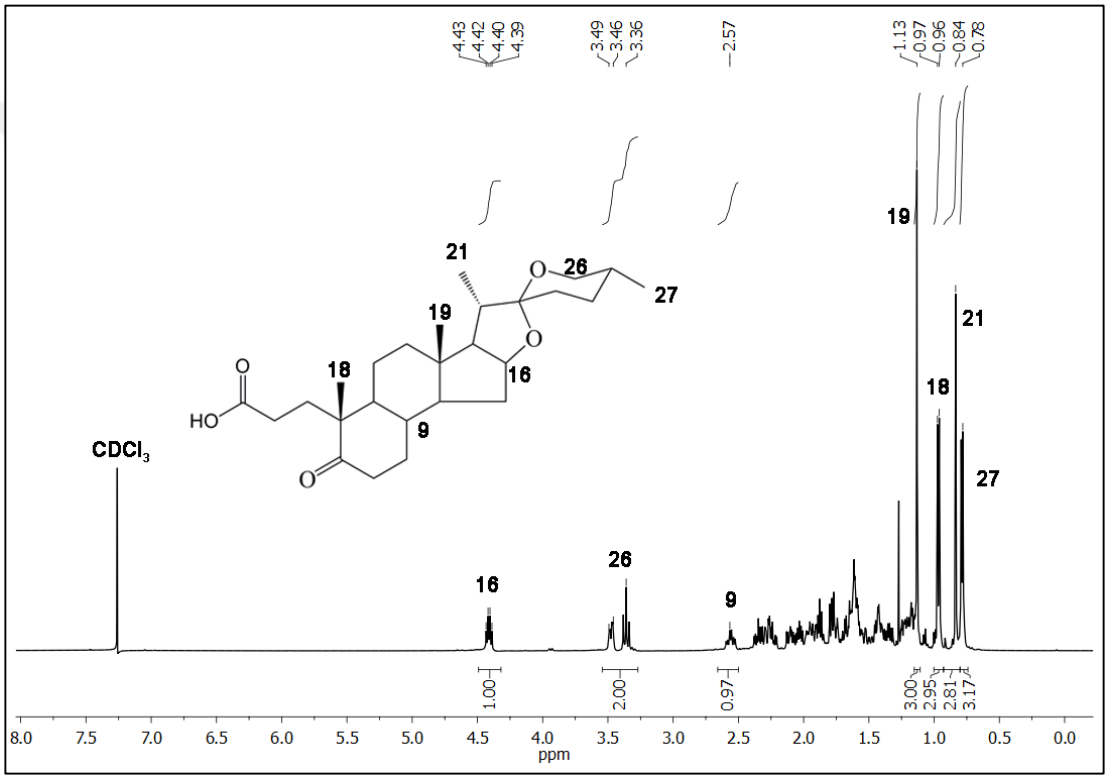
Bileşik 1'e ait oda sıcaklığında $CDCl_3$'te alınan $^1H$ NMR spektrumu (Şekil 3.1) incelendiğinde; δ=5,72 ppm'de gözlenen sinyal bileşik 1'in yapısında bulunan çift bağ protonuna (C-4) aittir. E halkasında bulunan 16. karbona bağlı proton piki ise δ= 4,41-4,37 ppm arasında gözlenmektedir. F halkasında bulunan 26. karbona bağlı α ve β protonunlarına ait sinyaller spektrumda sırasıyla δ=3,35 ve 3,44 ppm'lerde görülmektedir. Bileşik 1'de bulunan $CH_3$ gruplarına ait sinyaller ise sırasıyla δ=1,18; 0,96; 0,81 ve 0,78 ppm'e karşılık gelmektedir. Bu bölümde bahsedilen spirostan bileşiğine ait karakteristik FTIR ve $^1H$-NMR pikleri karakterizasyonu sonuçları verilen diğer spirostan bileşikleri için benzer bölgelerde olduğundan tekrar verilmemiştir. Yapılarda değişikliği gösteren pikler aydınlatılmıştır. Bileşiklere ait FTIR ve $^{13}C$-NMR spektrumları ekler kısmında verilmiştir.




Şekil 3.1. Bileşik 1'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1H$-NMR spektrumu

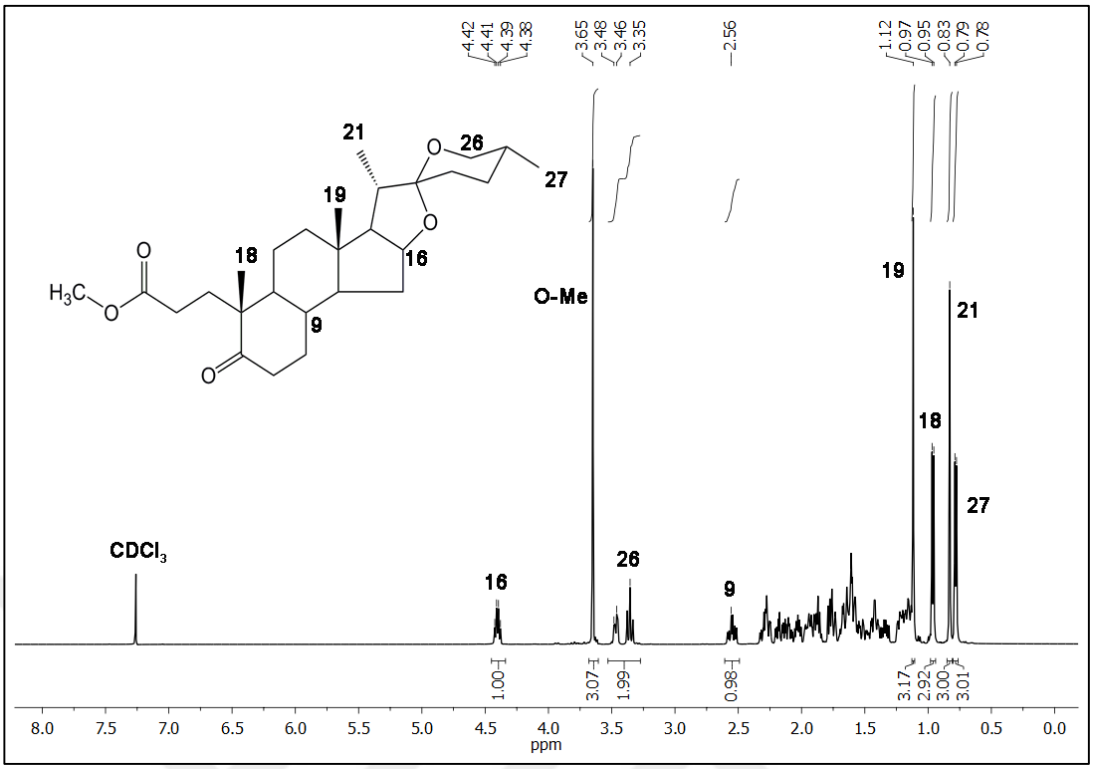
İkinci basamakta, bileşik 1'in güçlü yükseltgeyiciler varlığında halka açılma reaksiyonu yapıldı. Halka açılma reaksiyonu, sulu t-BuOH içerisinde $NaIO_4$ aşırısı ve $KMnO_4$ ise sitokiyometrik oranlarda kullanılması ile gerçekleştirildi. Reaksiyon diol oluşum mekanizması üzerinden yürümektedir. Reaksiyonun karışımı başlangıçta mor renk iken daha sonra renk yoğunluğunu kaybettiği görüldü. Bu aşamada katalitik miktarda $KMnO_4$'ın sulu çözeltisi reaksiyona ilave edildi [62].

Bu durum kahverengi mangan dioksit($MnO_2$) oluşumunu gösterdi. Bileşik 2 bir keto asit olarak elde edildi. Bileşik 2'ye ait oda sıcaklığında alınan FTIR spektrumu incelendiğinde; 1712 ve 1710 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pikler sırasıyla keton ve karboksilik asit karbonil (C=O) gerilme frekanslarına karşılık gelmektedir. Bileşik 2'e ait $^{1}$H-NMR spektrumu (Şekil 3.2) incelendiğinde; çift bağa ait protonun sinyali spektrumda görülmemektedir. $^{13}$C NMR spektrumunda δ= 214,8 ve 179,36 ppm'lerde görülen sinyaller sırasıyla keton (C-3) ve karboksilik asit (C-5) karbonil karbonlarına aittir.



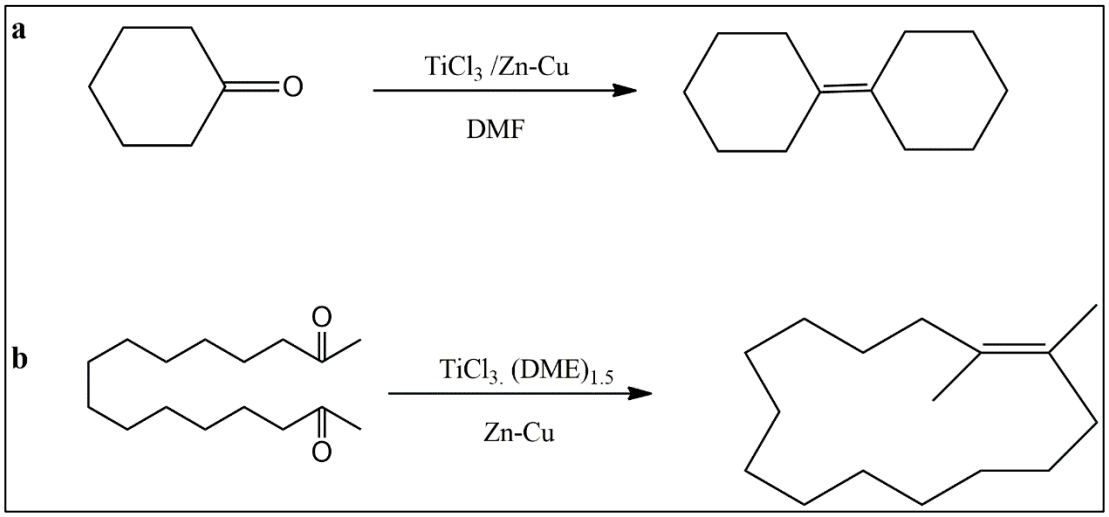

Şekil 3.2. Bileşik 2'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

Üçüncü basamakta bileşik 2'de bulunan karboksilik asit grubu, polar aprotik çözücü, DMF içerisinde CsF ve MeI kullanılarak esterleştirildi. Bileşik 3'e FTIR spektrumunda sırasıyla 1738 ve 1712 $cm^{-1}$'de gözlenen ester karbonili ve keton karbonil (C=O) ait keskin pikler ile karakterize edildi. Bileşik 3'e $^{1}$H-NMR spektrumu (Şekil 3.3) incelendiğinde; metil estere ait $CH_3$ sinyali O-Me olarak δ= 3,65 ppm'de gözlenmektedir. $^{13}$C NMR spektrumunda δ= 214,4; 174,3 ve 51,58 ppm'lerde görülen sinyaller sırasıyla keton karbonil (C-5), esterin karbonili (C-3) ve ester grubu metil (O-Me) karbonlarına aittir.




Şekil 3.3. Bileşik 3'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

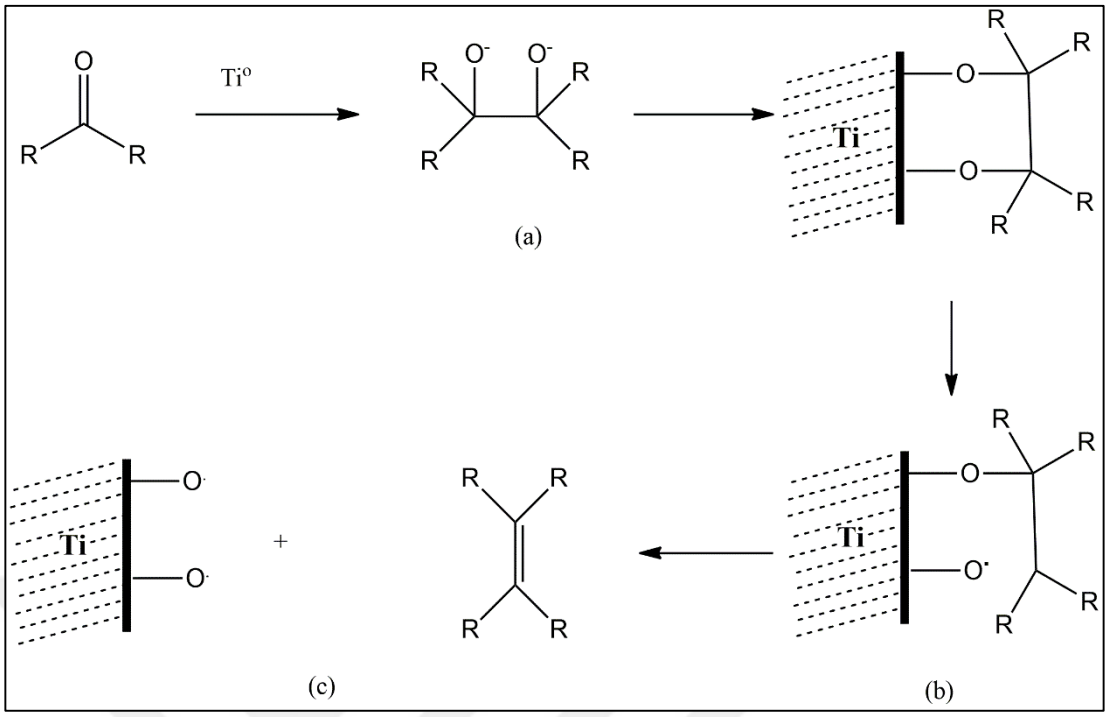
Son basamakta Ti katalizörlüğünde halka kapanama reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon McMurry reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. McMurry reaksiyonu, yapısında iki tane karbonil grubuna sahip bir bileşiğin düşük değerlikteki titanyum komplekslerinin varlığında birleşerek halkalı keton yapısına dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir. Bu yöntem organik sentezde bağ oluşumu için verimli bir reaksiyon olmasının yanı sıra çoğu durumda da oldukça kompleks ve gergin halkalı sistemlerin hazırlanmasında en iyi yoldur. Bu reaksiyon iki aşamada gerçekleştirilir: ilk basamakta $TiCl_3$'ün indirgenmesi, ardından karbonil gruplarına sahip bileşiğin reaksiyona girmesidir. Ürün oluşumunda Ti reaktifi, çözücü, sıcaklık ve reaksiyon süresinin önemi büyüktür. Literatürde verilen pek çok sentez arasında en uygun kompleks $TiCl_3(DME)_{1.5}$ kombinasyonunun kullanıldığı yöntemlerdir [63]. Bunun dışında, bu reaksiyon tek karbonil grubu taşıyan moleküllerde molekül-içi olarak gerçekleşip asiklik alkenleri verirken (Şekil 3.4a) diğer yandan iki karbonil grubu taşıyan moleküllerde moleküller-arası düzenleme ile sikloalkenleri oluşturur (Şekil 3.4b).



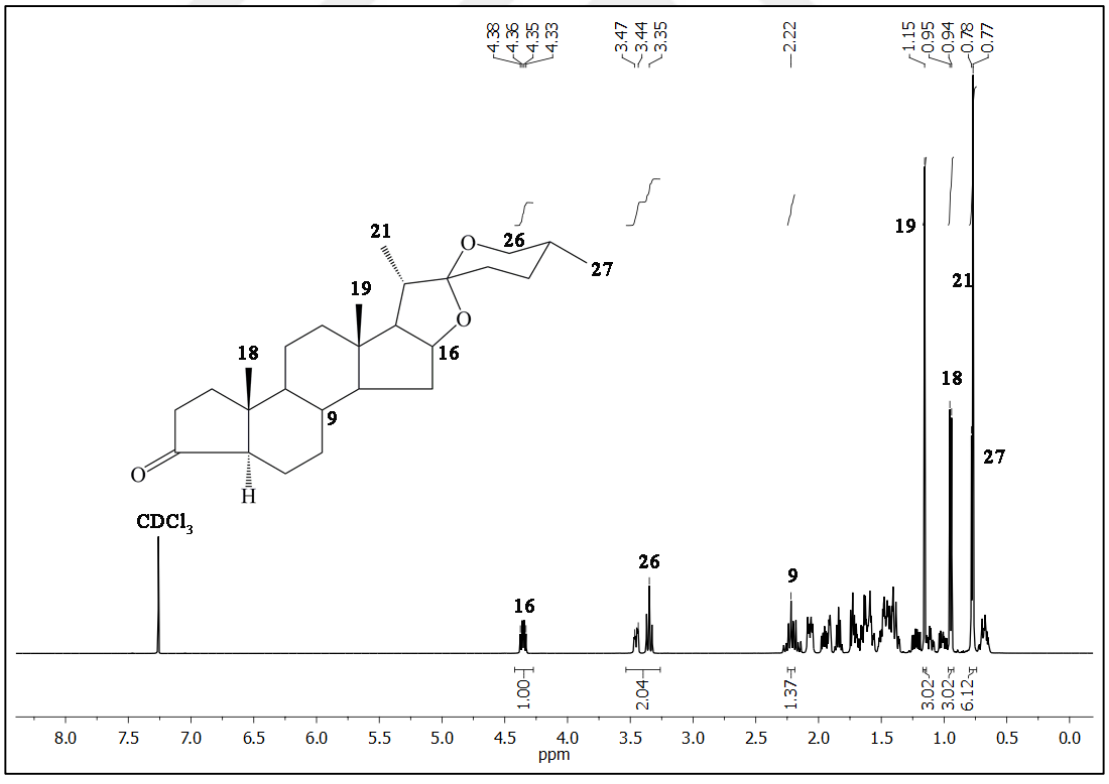

Şekil 3.4. Mc Murry reaksiyonunun gösterimi

Karbonil bileşiklerinin birleştirilmesinde $TiCl_3/LiAlH_4$, $TiCl_3/K$, $TiCl_3/Li$ ve $TiCl_3$/Zn-Cu gibi çeşitli reaktifler kullanılmaktadır. Ancak daha sonraları yapılan çalışmalarda $TiCl_3$. $(DME)_{1.5}$/Zn-Cu kompleksi, karbonil bileşikleri çiftleri için en etkili kompleks olduğu rapor edilmiştir. Bu reaktif ayrıca 1,2-diollerin alkene eliminasyonunda kullanılmaktadır. Bu kompleksin çalışma mekanizmasını aktif titanyum moleküllerinin yüzeyindeki "heterojenik işlem" gerçekleştirmektedir (Şekil 3.5). Yan ürün olarak titanyum dioksit ($TiO_2$) meydana gelir. Karbonil grubuna elektron transferi titanyum molekülüne bağlanan dianyon oluşturur (Şekil 3.5a) ve sonra homolitik parçalanmayı (Şekil 3.5b) izleyen alken ve titanyum dioksit serbest bırakılır (Şekil 3.5c). Bu reaksiyonun sonucunda majör oranda keton minör oranda alken elde edilir.

Bileşik 4'ün sentezi, bileşik 3, $TiCl_3$ $(DME)_{1,5}$ ve Zn-Cu varlığında 35 saat azot gazı altında 80 °C'de karıştırılarak gerçekleştirildi. Bileşik 4'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde; 1720 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pik ise keton karbonil (C=O) gerilme frekansına karşılık gelmektedirler. Bu keton karbonu aynı zamanda $^{13}C$ NMR'da 220 ppm'de gözlenmektedir. Bileşik 4'e ait $^{1}H$-NMR (Şekil 3.6) ve $^{13}C$ NMR spektrumları bileşik 4'ün başarı ile sentezlendiğini göstermektedir.



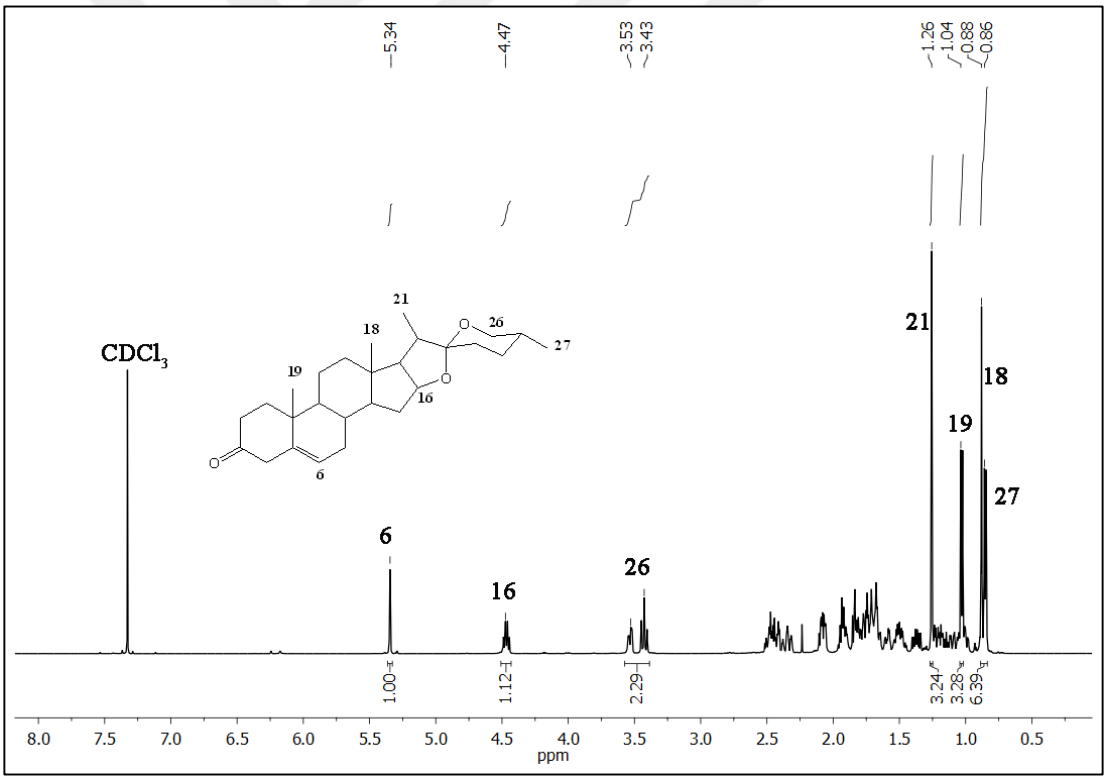

Şekil 3.5. Mc Murry reaksiyonu mekanizması




Şekil 3.6. Bileşik 4'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

2-Keto A-norspirostanların sentezi için izlenen ikinci yöntemde, hedeflenen bileşik için üç basamaklı reaksiyon takip edildi (Şekil 2.2). Bu yöntemin birinci basamağında, diosgenin bileşiği başlangıç bileşiği olarak kullanıldı ve diosgenin molekülüne ait

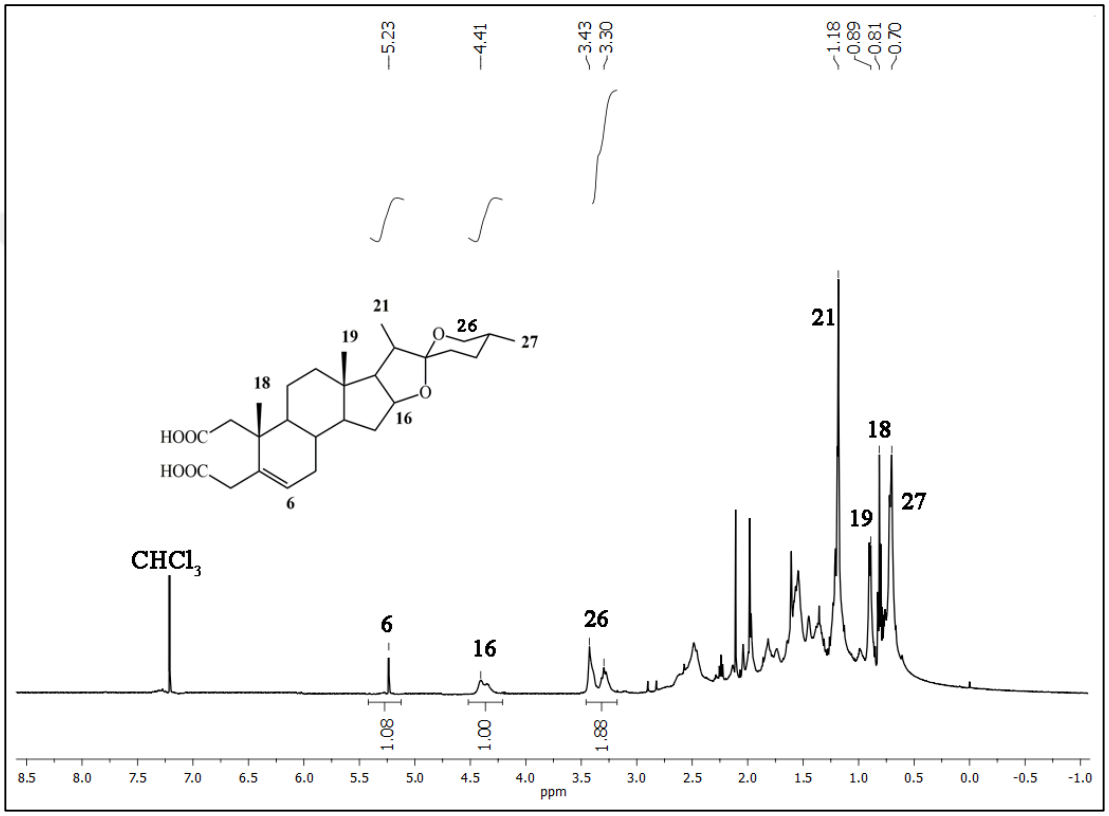
hidroksil grubu PCC ile keton grubuna yükseltgendi ve bileşik 5, %84 verimle elde edildi. Bu aşamada reaksiyon süresine dikkat edildi [64]. Bileşik 5'in FTIR spektrumunda 3500 $cm^{-1}$'de herhangi bir pikin olmaması ve aynı zamanda 1675 $cm^{-1}$ de keskin ve şiddetli keton grubuna ait karbonil pikinin varlığı diosgeninin PCC oksidasyonu ile ketona dönüştüğünü göstermektedir. $^{1}$H-NMR spektrumu incelendiğinde çift bağ protonu 5.34 ppm'de olduğu görülmektedir (Şekil 3.7). Başlangıç bileşiği olan diosgenine ait spektrumla karşılaştırıldığında kimyasal kayma açısından farklılık yoktur. Ancak bileşik 5'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu incelendiğinde, hidroksil grubunun bağlı olduğu karbona ait 71,78 ppm'de gözlenen C-3 ait pik gözlenmemektedir. C-3 keton karbonuna dönüştüğü için 220,18 ppm'de yeni sinyal olarak spektrumda görülmektedir (Diosgenin bileşiğine ait FTIR, $^{1}$H-NMR ve $^{13}$C-NMR spektrumları ekler kısmında verildi).




Şekil 3.7. Bileşik 5'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

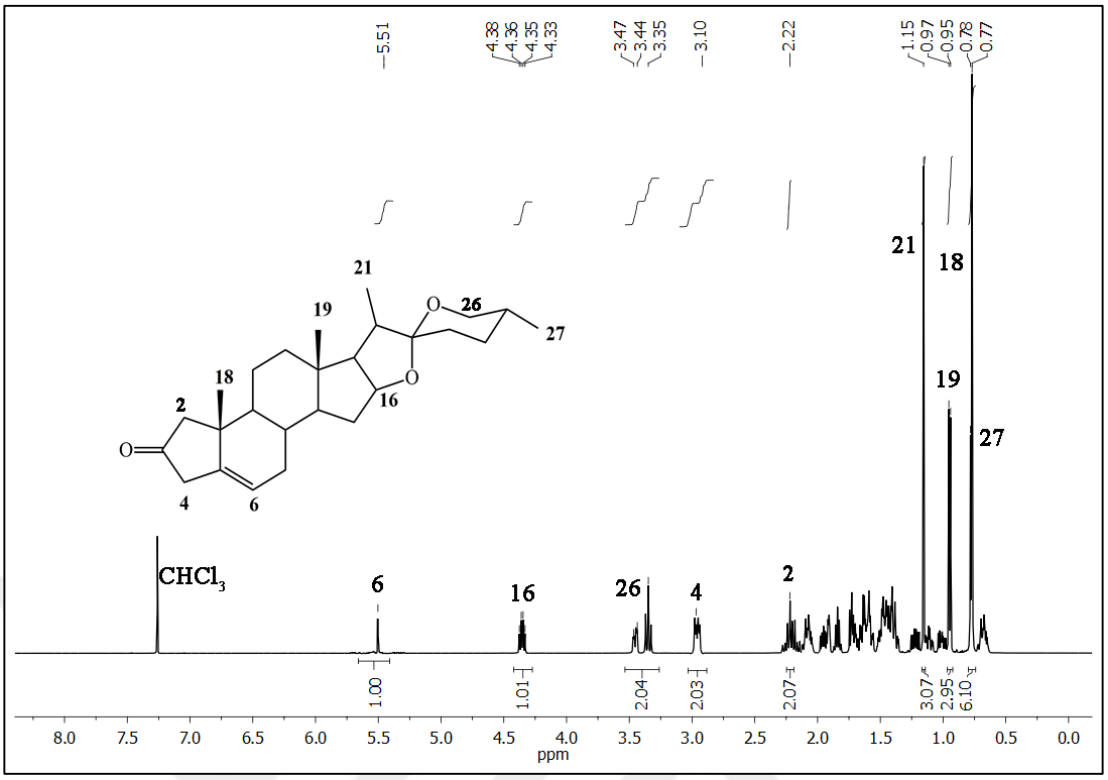
İkinci basamakta ise bileşik 5 asetik asit içerisinde $CrO_3$ ile muamele edildi ve iki ucunda karboksilik asit grupları bulunan A halkası açılmış olan bileşik 6 elde edildi. Bu aşamada reaksiyon sıcaklığı 60-70 °C arasında tutuldu. Saflaştırma işlemine gerek kalmadan bileşik 6, %71 verimle sentezlendi. Bileşik 6, FTIR spektrumunda karboksilik grubuna karşılık gelen 3100 $cm^{-1}$'deki geniş bandın varlığı ile karakterize

edildi. Aynı zamanda spektrumunda keton ve karboksilik asit gruplarının C=O titreşimleri sırasıyla 1718 ve 1709 $cm^{-1}$'lerde görülmektedir. Bileşik 6'ya ait $^{1}$H-NMR spektrumu incelendiğinde; B halkasında bulunan çift bağ protonu 5,23 ppm'de gözlenmektedir (Şekil 3.8). Çoklu pikler bölgesinde karboksil gruplarına komşu C-1 ve C-4 bağlı protonlara ait sinyaller sırasıyla 1,92 ve 2,2 ppm'lerde singlet olarak görülmektedir.



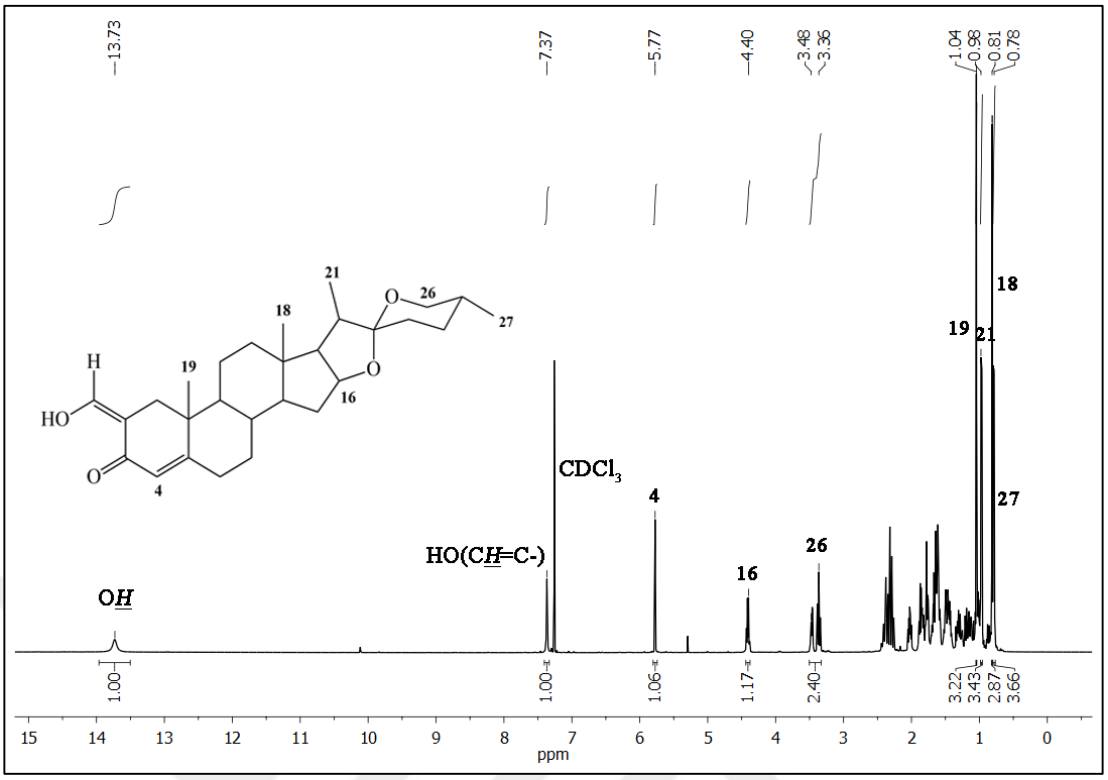

Şekil 3.8. Bileşik 6'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

Bileşik 6 üçüncü basamakta asetik anhidrit ile reaksiyona sokularak fonksiyonel karboksilik uç grupları esterleştirildi ardından dekarboksilasyon sonucunda % 70 verimle bileşik 7 elde edildi. Bileşik 7'ye ait FTIR spektrumda 1740 $cm^{-1}$'de gözlenen karbonil gerilme frekansı sentezin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bileşik 7'ye ait $^{1}$H-NMR spektrumunda çift bağa ait 5,23 ppm'de görülen proton reaksiyon sonrasında 5,51 ppm'e kaydığı görülmektedir (Şekil 3.9). Aynı zamanda spektrumda C-2 ve C-4 ait sinyaller sırasıyla 3,10 ve 3,22 ppm'lerde quartet ve multiplet olarak gözlenmektedir. $^{13}$C-NMR spektrumda karbonil ve çift bağ karbonları sırasıyla 217,0; 141,7 ve 122,1 ppm'lerde görülmektedir.




Şekil 3.9. Bileşik 7'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Bileşik 8'in sentezi diosgeninin etil format ve NaH varlığında bir 2-hidroksimetilen türevi vermesi ile gerçekleştirildi. Bileşik 8'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde; sırasıyla 1630 ve 1580 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pikler ise keton karbonili (C=O) ve çifte bağın (C=C) gerilme frekansına karşılık gelmektedirler. Aynı zamanda spektrumda 3200 $cm^{-1}$'de hidroksil grubuna ait absorpsiyon görülmektedir. Bileşik 8'e ait DMSO-$d_6$ içinde alınan $^1$H-NMR spektrumu (Şekil 3.10) incelendiğinde; 13,73 ppm'de hidroksil grubuna bağlı proton sinyali gözlenmektedir. Vinil protonlarına ait pikler ise 7,37 ve 5,77 ppm'lerdedir. Bileşik 8'e ait $^{13}$C-NMR spektrumunda; 189,2 ppm'de C-3 karbonuna ait sinyal gözlenmektedir. Hidroksil grubunun bağlı olduğu vinil (C-2) ve çift bağ (C-4) karbonlarının pikleri ise sırasıyla 170,1 ve 165,3 ppm'lere karşılık gelmektedir. Spektrumlardan elde edilen sonuçlar bileşik 8'in sentezinin başarılı olduğunu göstermektedir.

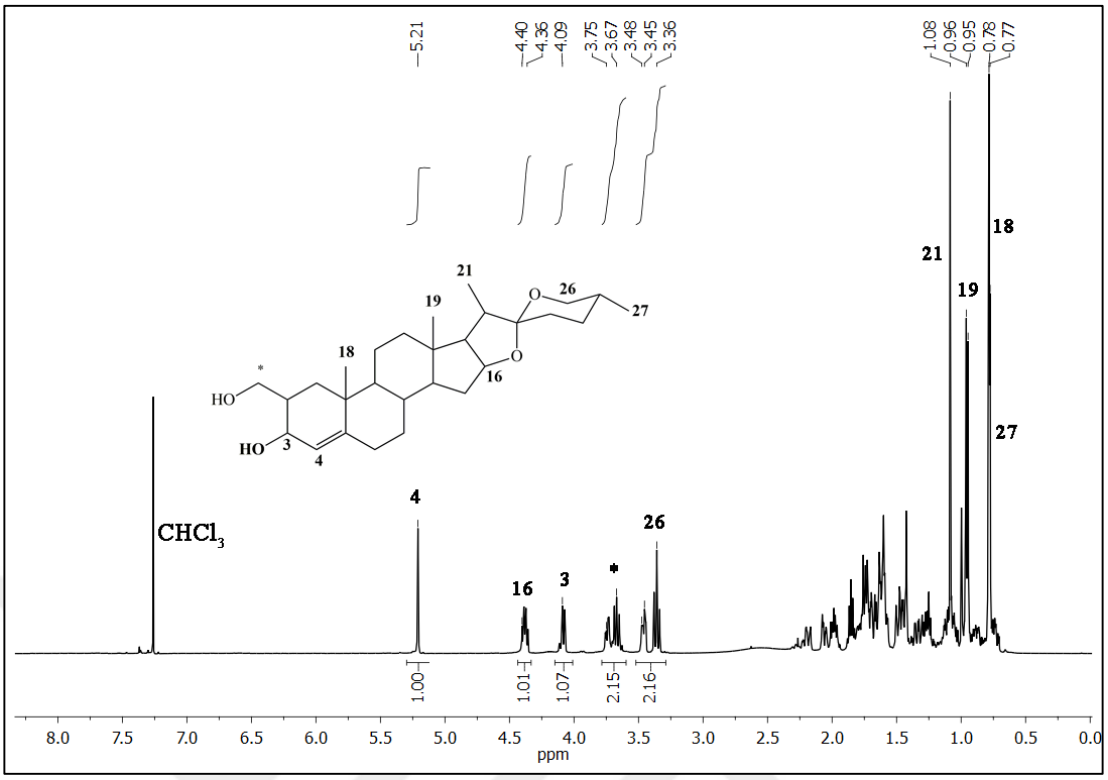



Şekil 3.10. Bileşik 8'in DMSO-$d_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

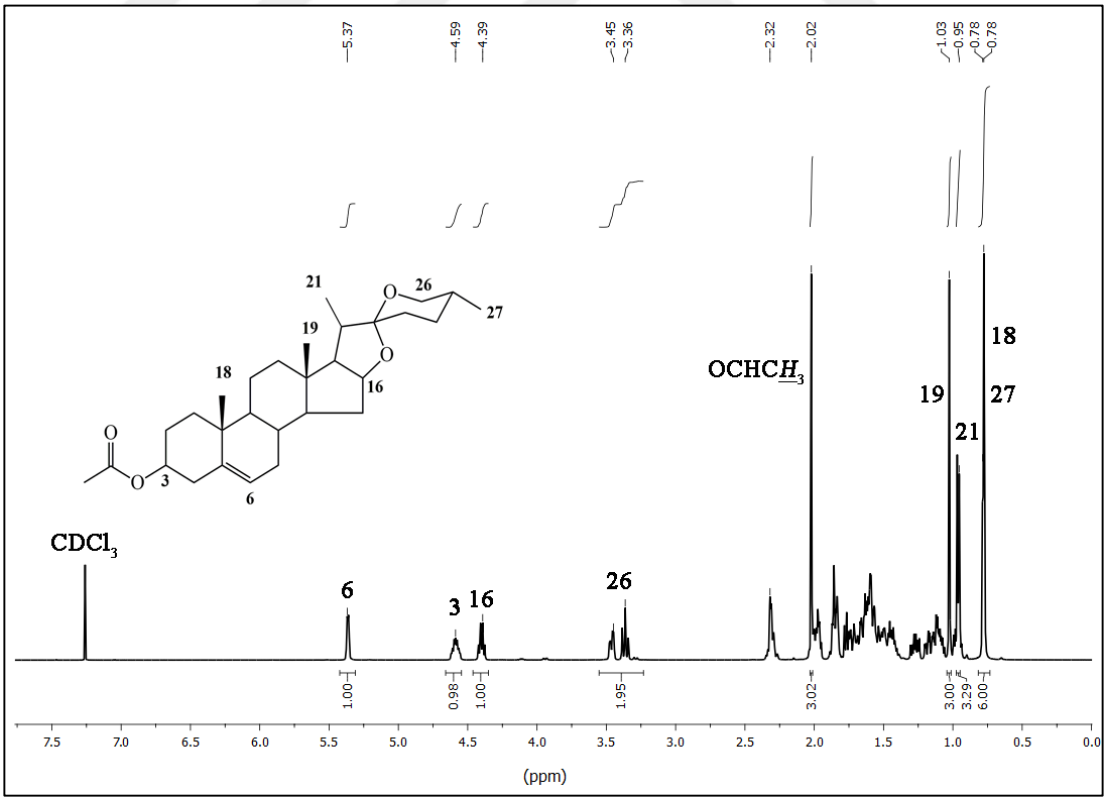
A halkasında hidroksi türevi sentezlemek için Bileşik 8, metanol içerisinde $NaBH_4$ ile reaksiyona sokularak seçimli indirgenme reaksiyonu gerçekleştirildi. Bileşik 9, %70 verimle sentezlendi. Bileşik 9'un yapısındaki hidroksil gruplarının ve çift bağa ait (C=C) gerilme frekansları FTIR spektrumunda 3100-3400 $cm^{-1}$ arasında geniş bant ve 1640 $cm^{-1}$ de keskin bant olarak gözlenmektedir. Bileşik 9'a ait $^1$H-NMR spektrumu incelendiğinde, hidroksi metil grubuna ait protonlar 3,67-3,75 ppm arasında, C-3 bağlı proton 4,09 ppm'de görülmektedir (Şekil 3.11).

### 3.2. B-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türev Bileşiklerin Sentezi

B-Norspirostan sentezi beş basamakta gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Birinci basamakta diosgenine ait C-3'e bağlı hidroksil grubu, piridinli ortamda asetik anhidrit kullanılarak asetillendirildi. Daha ileride yapılacak sentezlerde hidroksil grubunun reaksiyona girmemesi için koruma altına alındı. Bileşik 10, yüksek verimle elde edildi (%99). Bileşik 10'a ait FTIR spektrumunda 1720 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pik karbonil (C=O) gerilme frekansına karşılık gelmektedir. Bileşik 10'a ait $^1$H NMR spektrumu (Şekil 3.12) incelendiğinde; C-3' e bağlı protona ait pik diosgenin spektrumunda 3,47 ppm'de gözlemlenirken asetilasyon sonrası 4,59 ppm'e kaydığı görülmektedir.

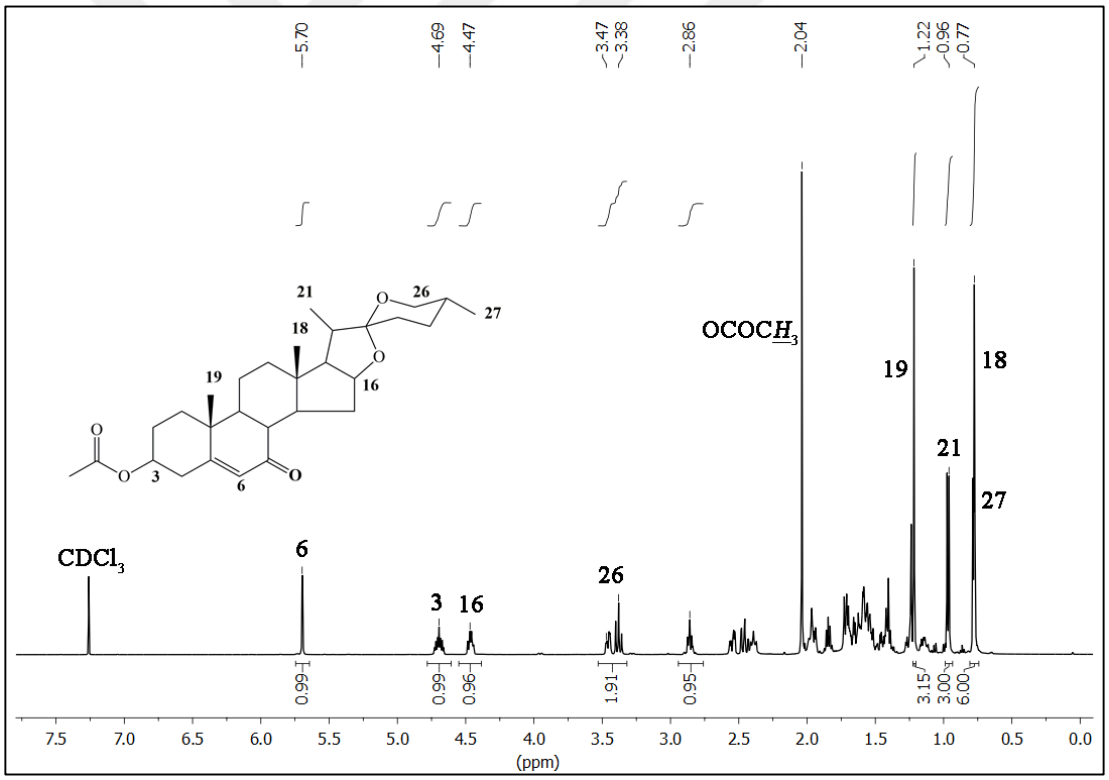



Şekil 3.11. Bileşik 9'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu




Şekil 3.12. Bileşik 10'nun $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

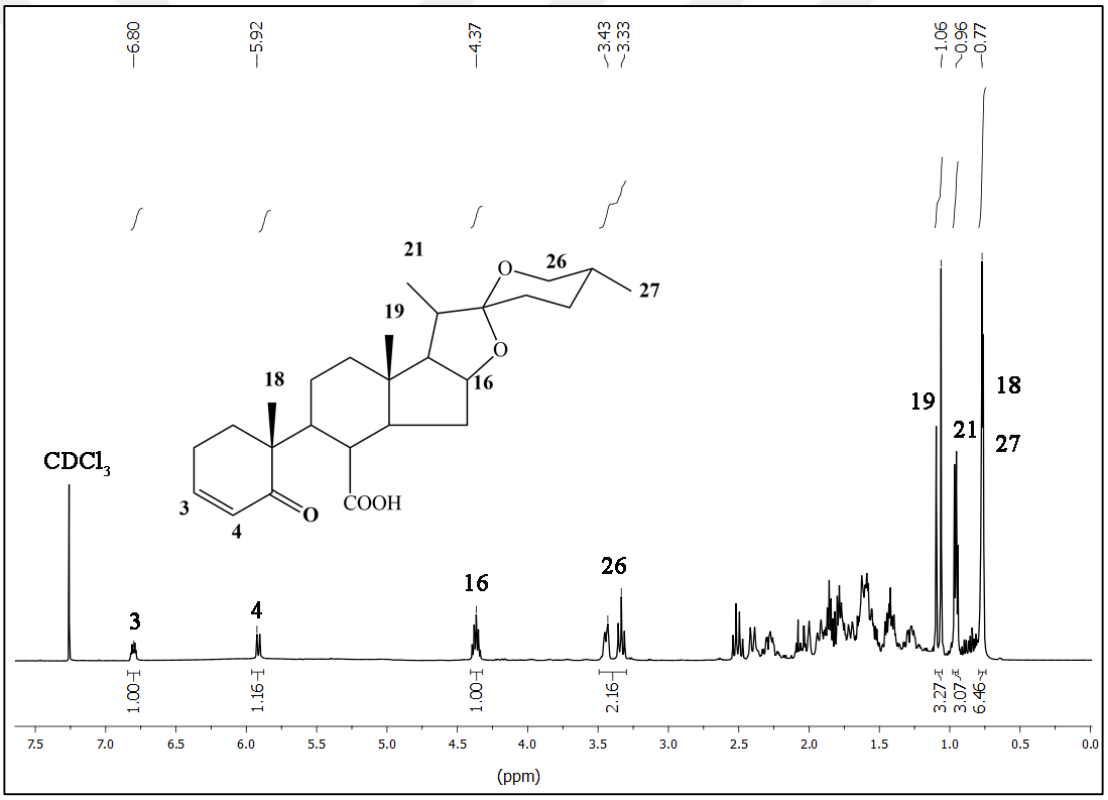
Bu durum karbonil grubunun kuvvetli elektron çekici grup olmasından kaynaklanır. Aynı zamanda asetoksi grubuna ait metil protonları 2,02 ppm'de singlet olarak görülmektedir. İkinci basamakta, bileşik 10'un TBHP ve NHPI varlığında allilik oksidasyonu sonucu bileşik 11 elde edildi. Bileşik 11'e ait FTIR spektrumda 1750, 1730 ve 1670 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pikler sırasıyla ester, keton ve alken gruplarının karbonil (C=O) ve C=C gerilme frekanslarına karşılık gelmektedir. $^{1}$H-NMR spektrumu incelendiğinde; B halkasında bulunan C-6 bağlı çift bağ protonunun bileşik 10'a ait spektrumda 5,37 ppm'de kimyasal kayma verirken oksidasyon sonrasında 5,70 ppm'e, aynı şekilde A halkasındaki C-3 bağlı protonun ise 4,59 ppm'den 4,69 ppm'e kaydıkları görülmektedir (Şekil 3.13). Düşük alana kaymanın nedeni B halkasında allilik oksidasyon sonrası oluşan karbonil grubunun elektronik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.




Şekil 3.13. Bileşik 11'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

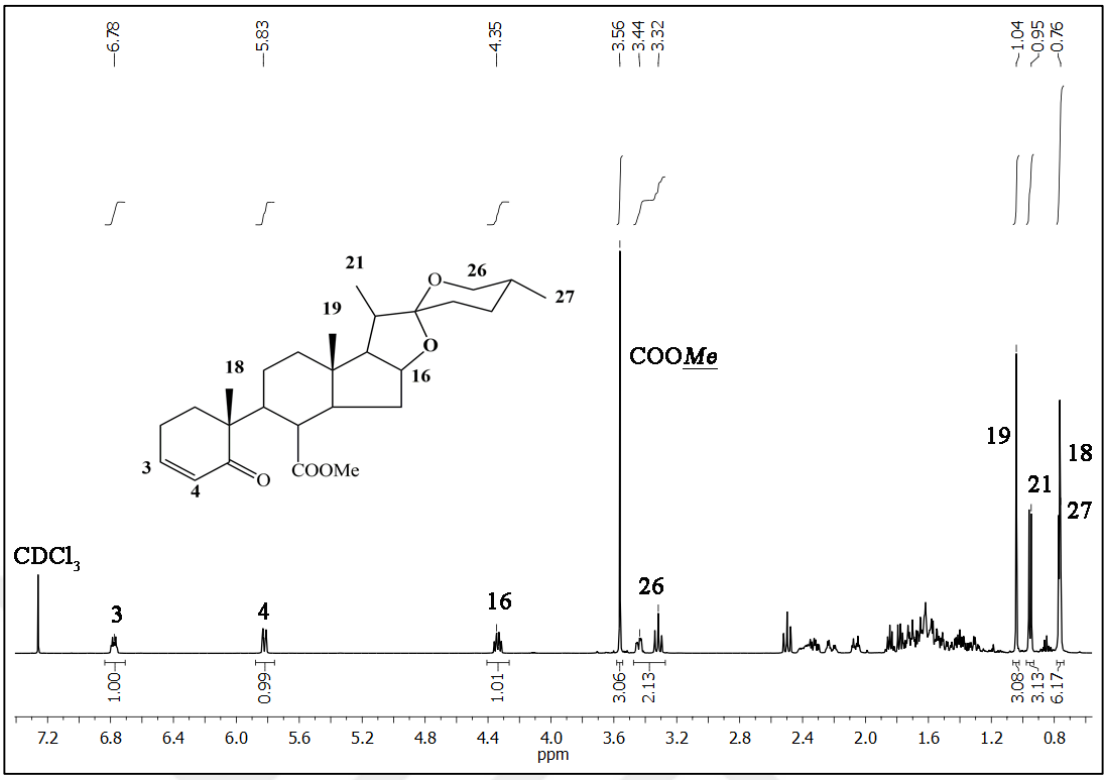
Bileşik 11'in oksidatif halka açılma reaksiyonu $KMnO_4$ ve $NaIO_4$ kullanılarak yüksek verimle gerçekleştirildi. Üçüncü basamakta ara ürün olarak oluşan 3β-asetoksi-5-okso-5,7-seko-6-norspirostan-7-karboksilik asit, hızlı bir şekilde asetoksi grubunu kaybederek bileşik 12'ye dönüştüğü tahmin edilmektedir.

Konjuge karbonil grubu taşıyan bileşik 12'nin yapısı spektroskopik olarak FTIR ve $^{1}$H-NMR ile karakterize edildi. FTIR spektrumunda 1730, 1670 $cm^{-1}$'de gözlenen keskin pikler sırasıyla karbonil (C=O) ve alken (C=C) gerilme frekanslarına karşılık gelmektedir. $^{1}$H-NMR spektrumunda ise 6,80 ppm ve 5,92 ppm'de görülen sinyaller sırasıyla C-3 ve C-4 bağlı çift bağ protonlarına aittir (Şekil 3.14). Bileşik 12'ye ait $^{13}$C NMR spektrumunda δ= 202,3 ve 180,0 ppm'lerde görülen sinyaller sırasıyla keton karbonil (C-5) ve karboksilik asit karbonil (C-6) karbonlarını göstermektedir. Çift bağ karbonları olan C-3 ve C-4 ise 146,8 ve 129,1 ppm'lerde görülmektedir. Bileşik 12'de E halkasında bulunan furanostik C-16 ve F halkasındaki spirostanik C- 22 spekrtumda sırasıyla 80,0 ve 109,3 ppm'lerde görülmektedir.




Şekil 3.14. Bileşik 12'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

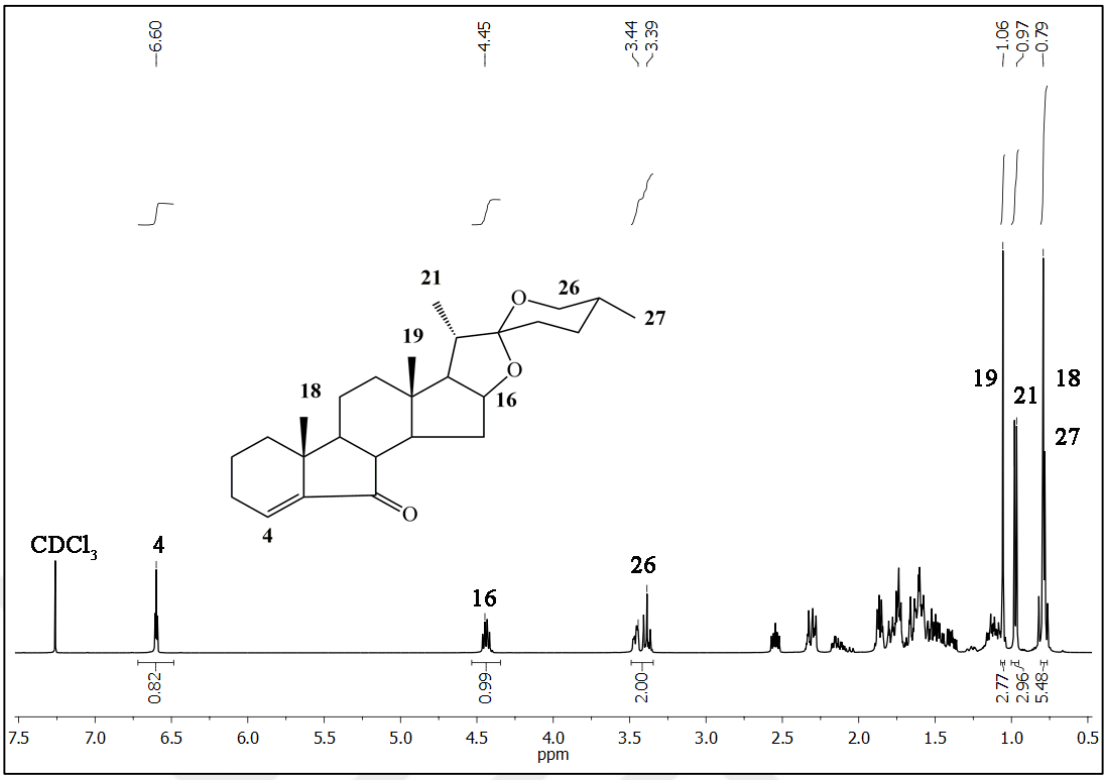
Dördüncü basamakta asit MeI ve CsF varlığında metil esterine dönüştürüldü. Bileşik 13'e ait $^{1}$H-NMR spektrumunda çift bağ protonları sırasıyla 6,80 ve 5,92 ppm'den 6,78 ve 5,83 ppm'e kayarak daha yüksek alanda görülmektedir. Bunun nedeni karboksilik asit grubunun metil esterine dönüştüğünde elektronik ve anizotropik etkinin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.




Şekil 3.15. Bileşik 13'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Spektrumda metil esterinde bulunan metil protonları 3,56 ppm'de singlet olarak görülmektedir (Şekil 3.15). Bileşik 13'e ait $^{13}$C NMR spektrumunda ester grubuna ait metil karbonunun 52,9 ppm'deki varlığı esterleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir. B-Norspiron eldesinin son basamağında, McMurry reaksiyonundan yararlanılarak halka kapanması sağlandı. Bileşik 13'ün düşük değerlikli Ti türleri ile halka kapanması ile bileşik 14 elde edildi. $^1$H-NMR ve $^{13}$C-NMR spektrumları incelendiğinde; A halkasında bulunan C-4 bağlı proton sinyali halka kapanmasının ardından 0,77 ppm'lik kimyasal kayma ile 6,60 ppm'de görülmektedir (Şekil 3.16). Aynı zamanda spektrumda başlangıç bileşiği bileşik 13'e ait metil protonlarının sinyalleri gözlenmemektedir.

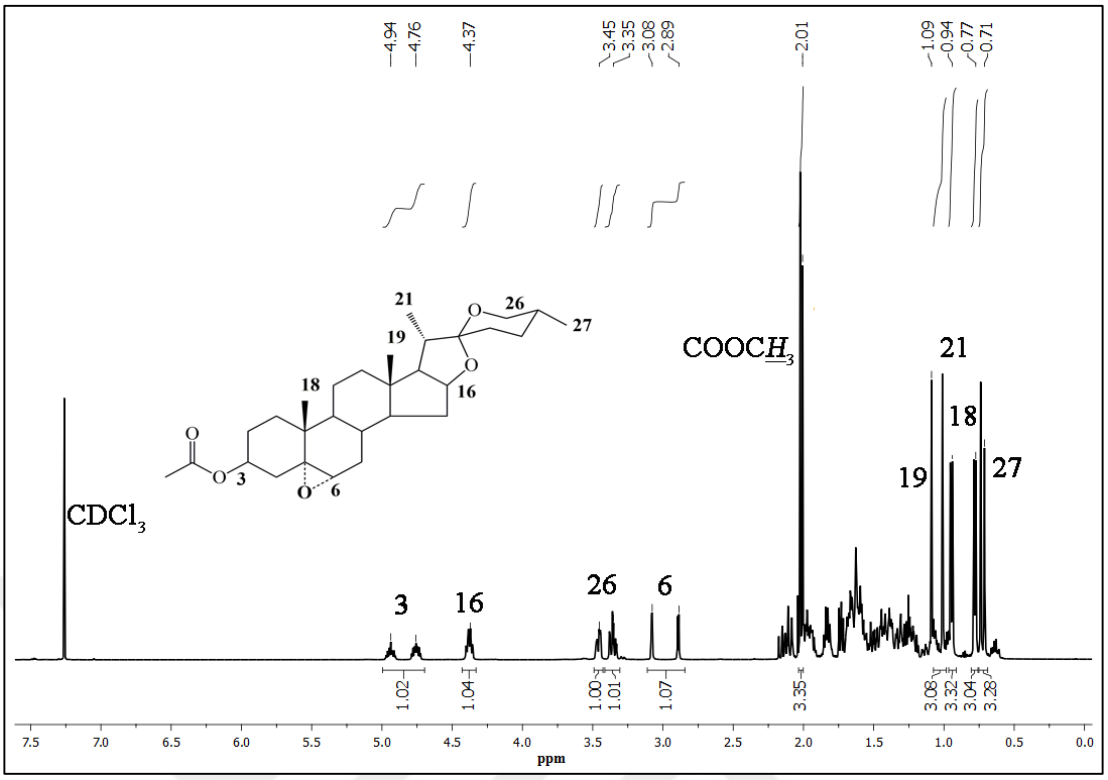
B-Norspirostanın lakton halkası üzerinden bileşik 15 olarak eldesinde, önce bileşik 10 mCPBA ile epoksitlendirildi ve 5α, 6α ve 5β, 6β-epoksit karışımı elde edildi. Epoksit halkasına ait C-O-C gerilmesi FTIR spektrumunda 912 $cm^{-1}$'de görülmektedir. Karışımın $^1$H-NMR spektrumuna bakıldığında; A halkasında bulunan asetoksi grubunun bağlı olduğu C-3 protonu 4,94 ve 4,76 ppm arasında çoklu sinyal olarak gözlenmektedir.



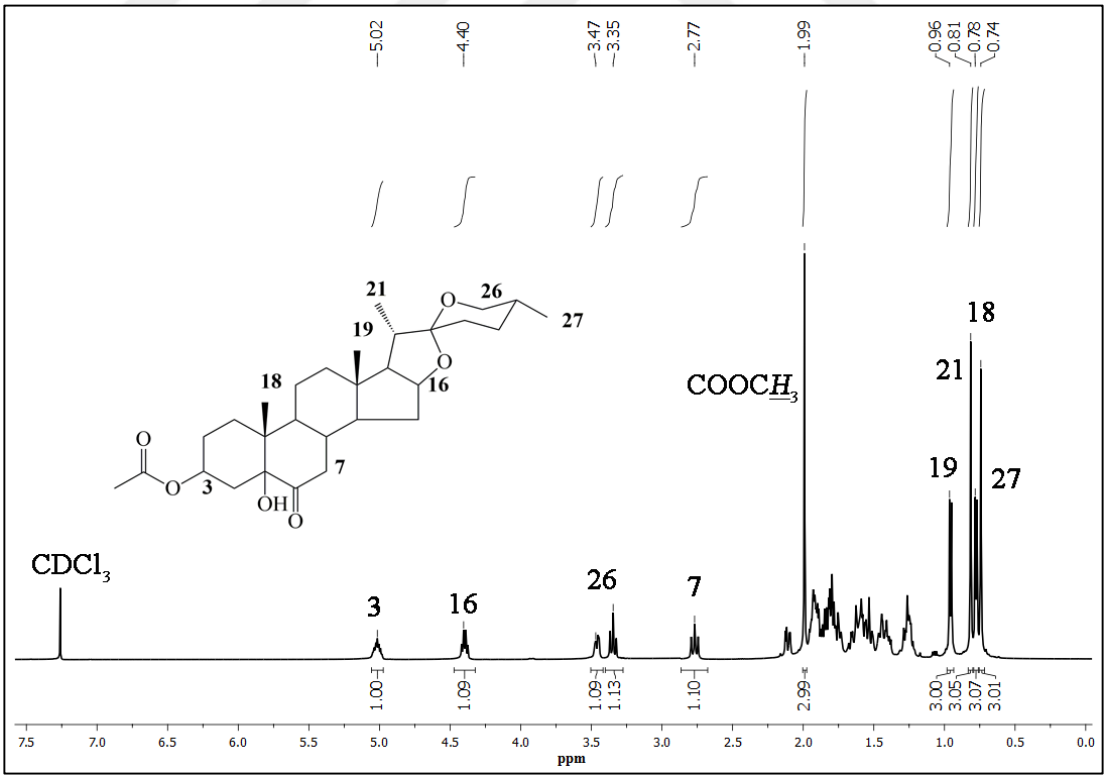

Şekil 3.16. Bileşik 14'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

B halkasında C-5 ve C-6 arasında bulunan epoksit halkasına ait tek proton 3,08 ve 2,89 ppm'de ikili sinyal vermektedir. Asetoksi grubunda bulunan metil protonları ise 2,01 ppm'de tekli olarak görülmektedir (Şekil 3.17). Epoksitleme reaksiyonunda mCPBA'in diosgeninin çift bağına karşı ekvatoral saldırısı, reaktif ile aksiyal $CH_3$ grubu (C-18) arasındaki sterik etkileşim nedeniyle kararsızdır, bu nedenle, geçiş durumunda reaktif yaklaşımı için ters aksiyal saldırı tercih edilir [15].

Epoksit halkası daha sonra Jones reaktifi ile okside edildi ve 5α-hidroksi-6-keton olan bileşik 16 elde edildi. Bileşik 16'ya ait FTIR spektrumunda hidroksil grubuna ait absorpsiyon 3540 $cm^{-1}$'de görülmektedir. Aynı zamanda keton ve ester karbonil grupları sırasıyla 1750 ve 1730 $cm^{-1}$'de gözlenmektedir. Bileşik 16'nın $^1$H-NMR spektrumunda ise C-3 proton $\delta_H$ 4,94-4,76 aralığındaki sinyalinin epoksit halkasının açılmasının ardından $\delta_H$ 5,02 ppm'e, C-7 proton sinyalinin ise $\delta_H$ 2,77 ppm'e kaydığı gözlenmektedir (Şekil 3.18). Ayrıca epoksit halkasına bağlı 2,98 ve 3,08 arasındaki tekli proton sinyali halka açıldıktan sonra spektrumda görülmemektedir.

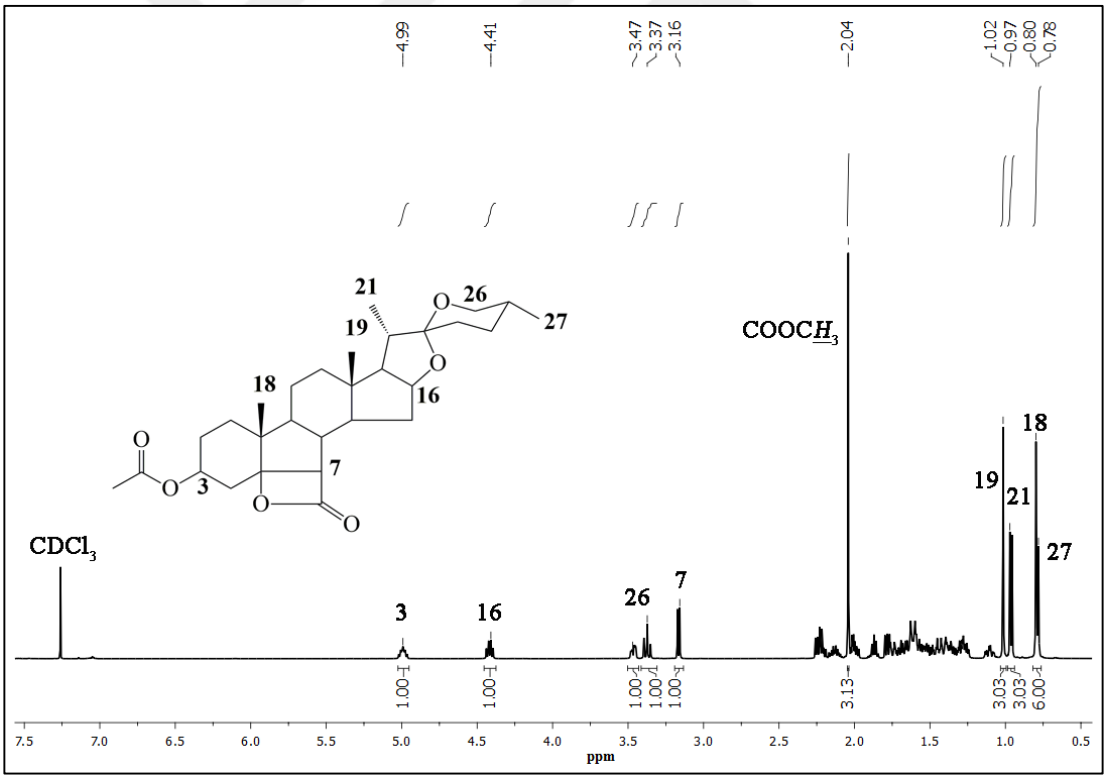



Şekil 3.17. Bileşik 15'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu




Şekil 3.18. Bileşik 16'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

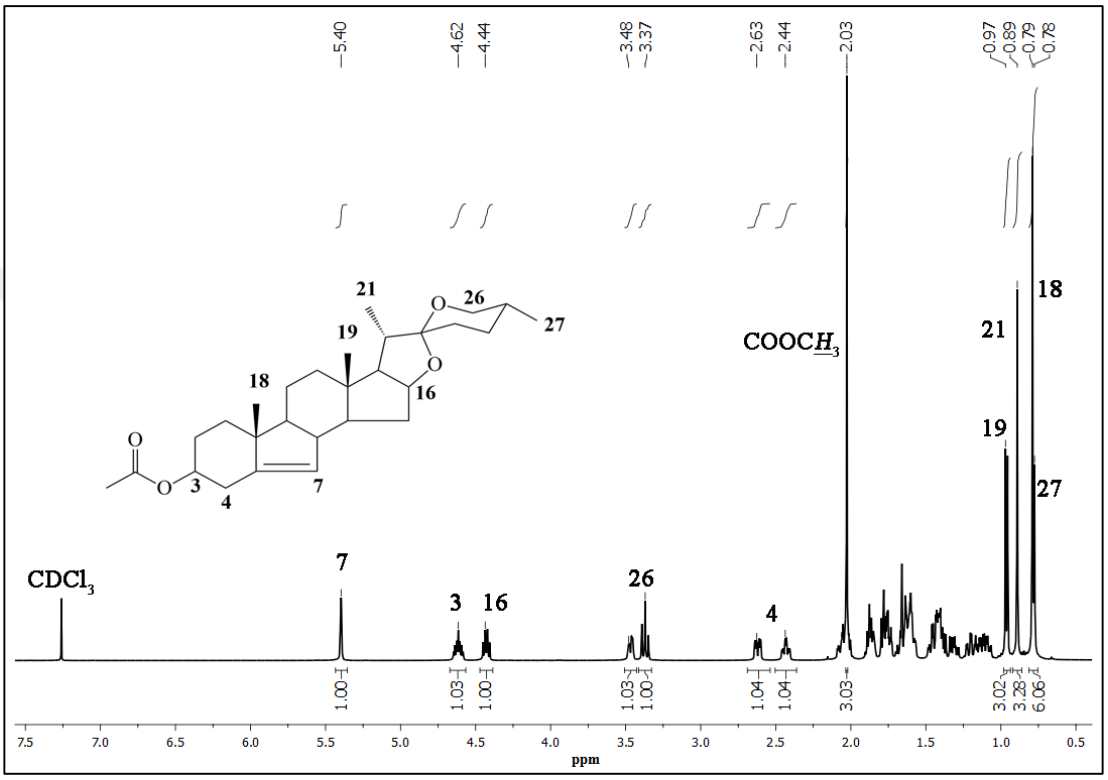
Bir hidroksi keton olan bileşik 16'nın Baeyer-Villiger oksidasyonu sonrasında bir keto asit olan bileşik 17 elde edildi. Ancak Baeyer-Villiger oksidasyonunda kullanılan mCPBA oksidasyon sonrasında m-klorobenzoik asite (mCBA) indirgendiği için Bileşik 13 ve mCBA karışımı elde edilmiştir. Bu aşamada herhangi bir saflaştırma yapılmadan diğer adıma devam edilmiştir. Bu ham keto asit piridinli ortamda benzoil klorür varlığında β-laktona (bileşik 18) dönüştürüldü. Bileşik 18'in FTIR spektrumunda 1817 $cm^{-1}$'de lakton halkasına bağlı karbonil grubu ve 1730 $cm^{-1}$'de asetoksi grubunda bulunan karbonil grubu gerilmesi görülmektedir. $^{1}$H-NMR spektrumunda ise β-laktona bağlı C-7 protonu 2.77 ppm'den 3,16 ppm'e kayarak ikili sinyal vermektedir. Asetoksi grubunda bulunan metil protonları ise 2,04 ppm'de tekli olarak görülmektedir (Şekil 3.19). Aynı zamanda $^{13}$C-NMR spektrumda keton karbonlarına ait 170,9 ve 170,5 ppm'lerdeki pikler sentezin gerçekleştiğini göstermektedir.




Şekil 3.19. Bileşik 18'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

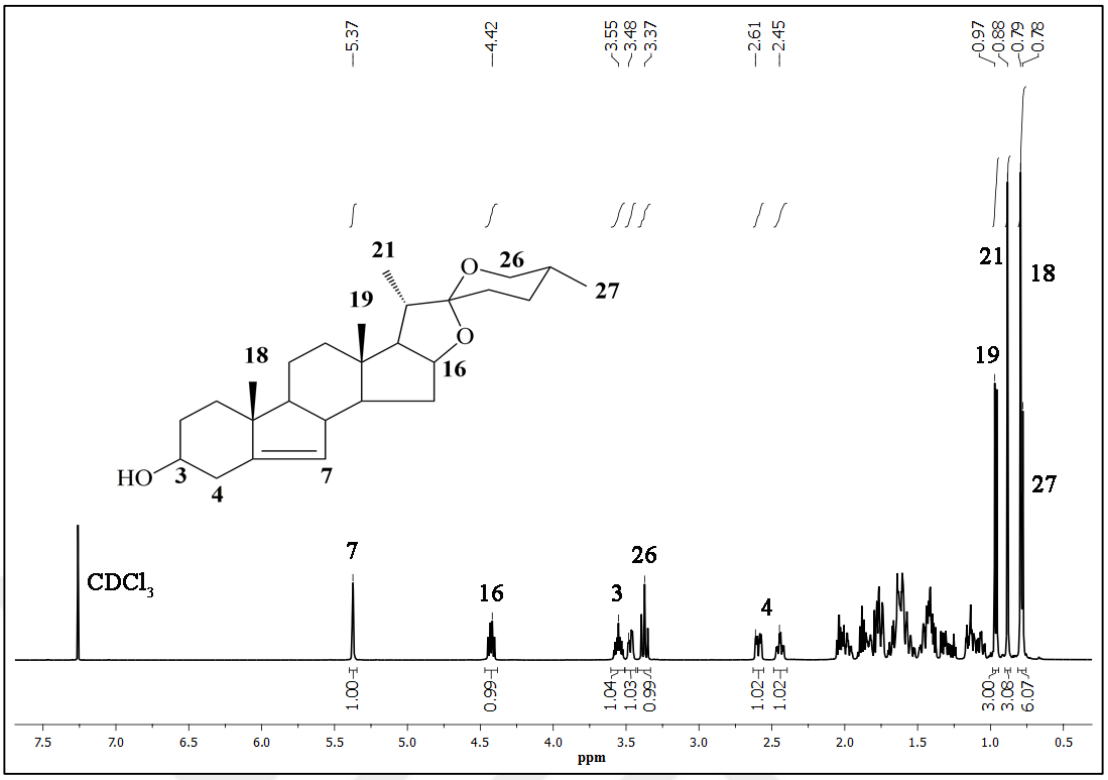
Lakton halkası (bileşik 18) daha sonra bileşik 19'u vermek üzere 190 °C sıcaklıkta piroliz edildi. Bu aşamada $CO_2$ molekülü yapıdan ayrılarak B-nor-alken elde edildi. Bileşik 19'a ait FTIR spektrumunda keton ve ester karbonilleri sırasıyla 1817 ve 1730 $cm^{-1}$'de gerilme pikleri vermektedir.

$^{1}$H-NMR ve $^{13}$C-NMR spektrumunda olefinik proton sinyalleri sırasıyla $\delta_H$ 5,40; $\delta_C$ 148,0 ve 126,1 ppm'lerde görülmektedir. A halkasında bulunan C-4 α ve β protonlarına ait sinyaller $^{1}$H-NMR spektrumunda sırasıyla $\delta_H$ 2,63 ve 2,44 ppm'de gözlenmektedir (Şekil 3.20). Aynı zamanda asetoksi grubunda bulunan ester karbon atomu $^{13}$C-NMR spektrumunda 170,6 ppm'de sinyal vermektedir.




Şekil 3.20. Bileşik 19'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

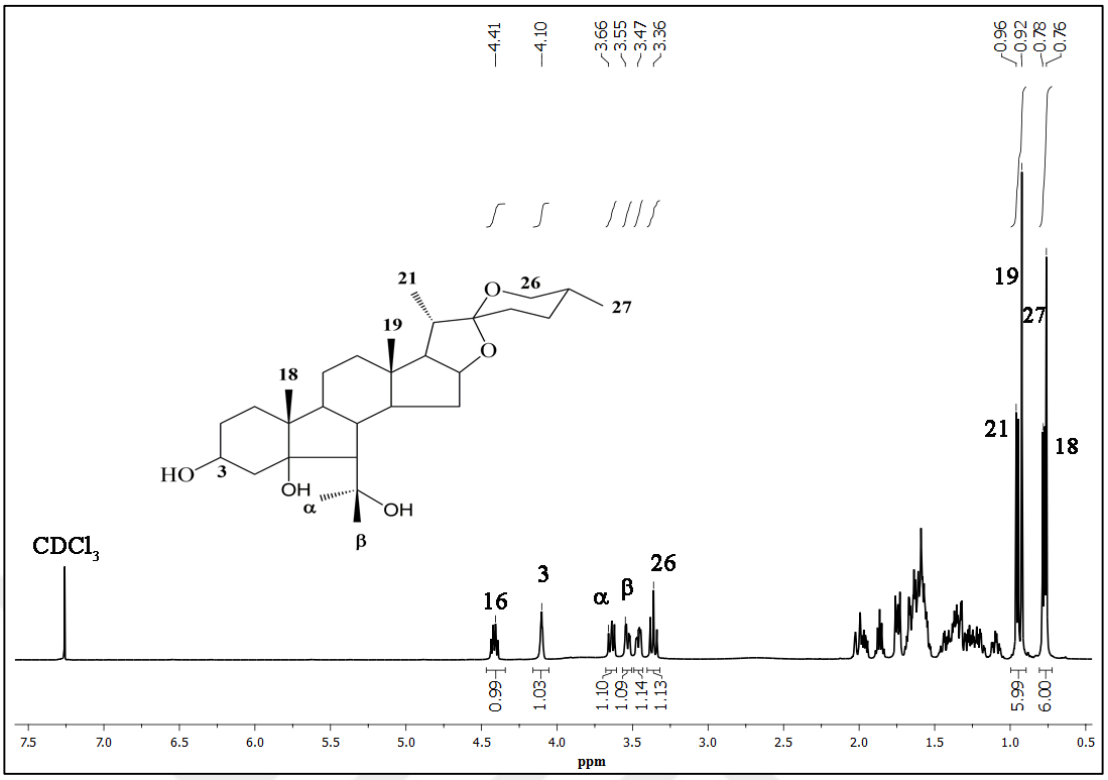
Hidroksi B-Norspirostan elde etmek amacıyla bileşik 19 metanolik KOH varlığında hidroliz edilerek bileşik 20 elde edildi. Bu reaksiyon Zemplen deasetilasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bileşik 20'ye ait FTIR spektrumda 3450 cm$^{-1}$'deki hidroksil grubu ve 1670 cm$^{-1}$'de C=C bağına ait absorpsiyon bantlarının varlığı sentezin gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı zamanda $^{1}$H-NMR spektrumunda C-3 proton sinyalinin bileşik 19'a ait spektrumda 4,62'de görülürken hidroliz sonrası 3,55 ppm'de kimyasal kayma vermektedir. Bu yüksek alana kaymanın nedeni karbonil grubunun elektron çekici etkisinin zayıflamasından ve hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu artırması ile perdelenmenin artmasından kaynaklanmaktadır. $^{13}$C-NMR spektrumunda hidroksi grubunun bağlı olduğu C-3'e ait 71,7 ppm'deki sinyaller sentezin başarı ile gerçekleştirildiğini desteklemektedir (Şekil 3.21).



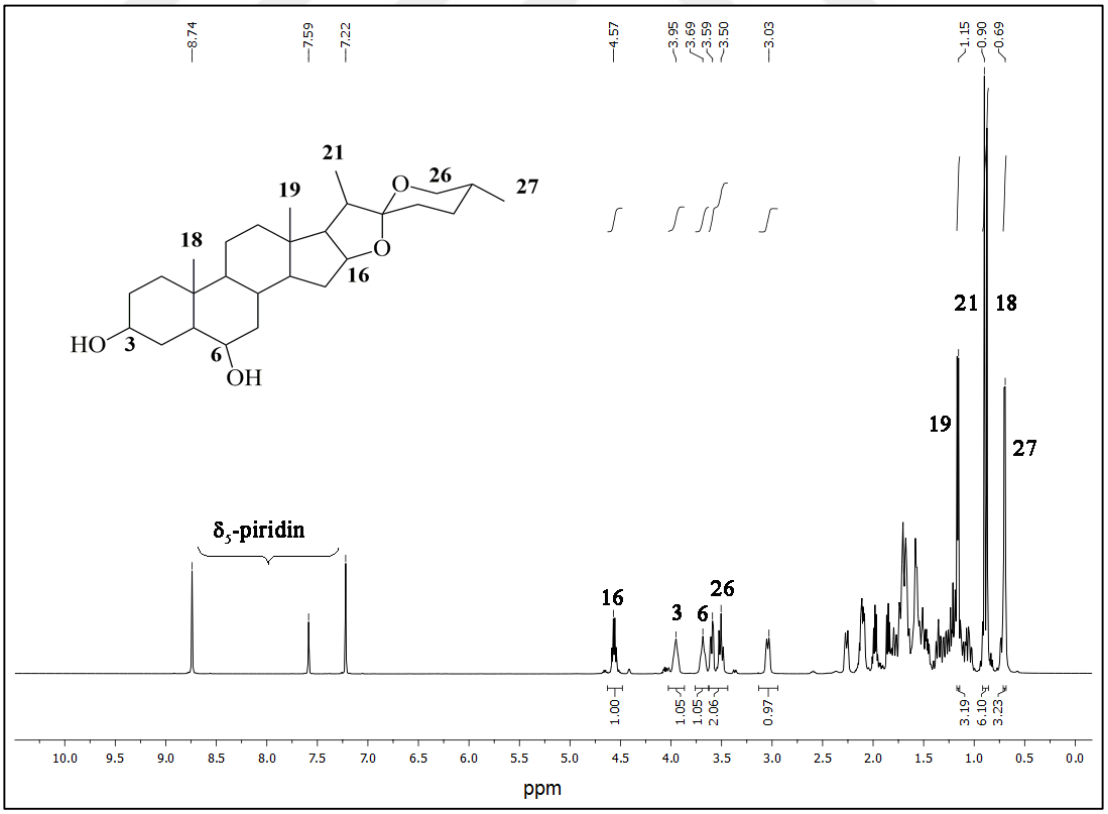

Şekil 3.21. Bileşik 20'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Bileşik 18, aynı zamanda üç tane hidroksil grubu taşıyan B-Nor-alkol (bileşik 21) elde etmek için $LiAlH_4$ ile indirgendi. Bileşik 21'e ait FTIR spektrumunda 3345 $cm^{-1}$'de hidroksil gruplarının varlığı görülmektedir. Ayrıca $^1$H-NMR spektrumunda lakton halkasının açılmasının ardından C-3 protonuna ait kimyasal kayma 4,41 ppm'de, C-7 hidroksi metilen α ve β protonlarına ait sinyaller spektrumda sırasıyla 3,66 ve 3,55 ppm'de görülmektedirler (Şekil 3.22). Aynı zamanda $^{13}$C-NMR spektrumunda hidroksil gruplarının bağlı olduğu C-3, C-5 ve C-7 ait $\delta_C$ 67,7; 81,3 ve 56,3 ppm'deki sinyaller bileşik 21'in sentezinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Daha ileri reaksiyonlarda kullanmak için, A ve B halkalarında iki tane hidroksil grubu taşıyan türev bileşiği sentezlendi. Bu aşamada diosgenin hidroborasyon ($BH_3$.THF) reaksiyonu ardından hidrojen peroksit ile oksidasyona uğratıldı ve Bileşik 22 elde edildi. FTIR spektrumunda 3430 $cm^{-1}$ yayvan absorpsiyon bandı hidroksil grubunun varlığını göstermektedir. Bileşik 22'ye ait piridin-$\delta_5$'te alınan $^1$H-NMR spektrumu (Şekil 3.23) incelendiğinde; diosgenin çift bağına ait 5,3 ppm'deki pikin spektrumda gözlemlenmediği görülmektedir. Çift bağa hidroksil gruplarının bağlanmasının ardından C-6'ya bağlı protonlar 3,55 ve 3,66 arasında multiplet olarak görülmektedir. E halkasındaki C-16 proton sinyali 4,57 ppm'e kaymıştır.

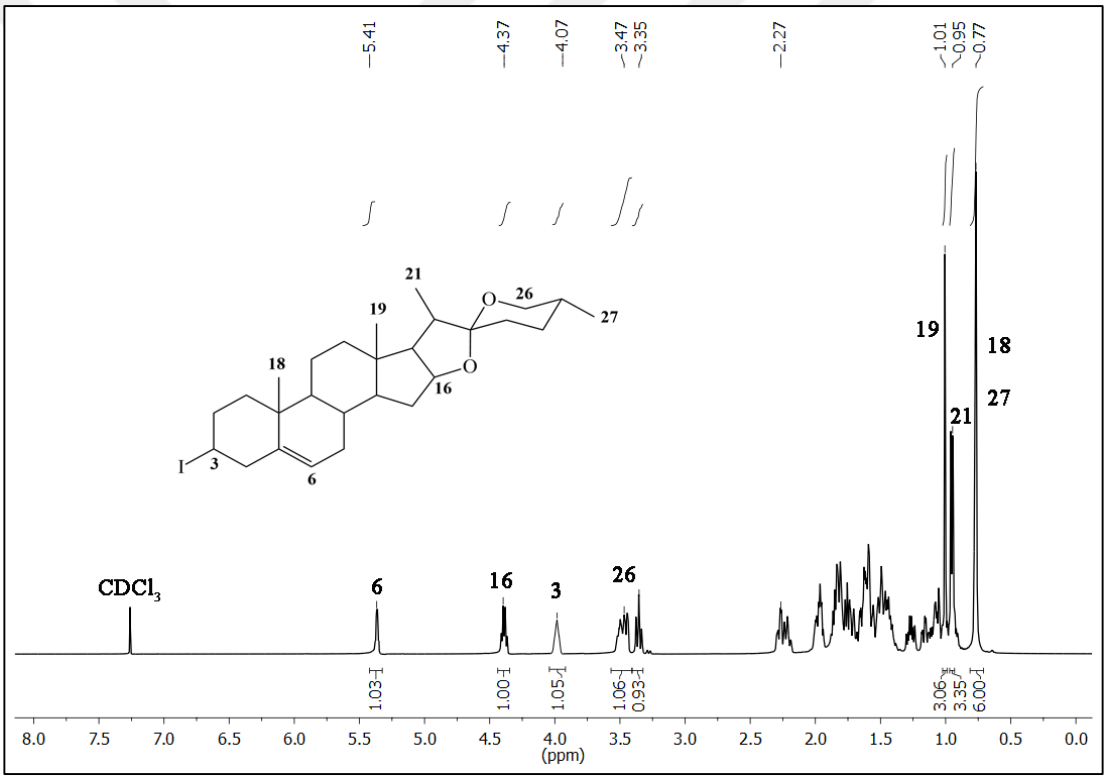



Şekil 3.22. Bileşik 21'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu



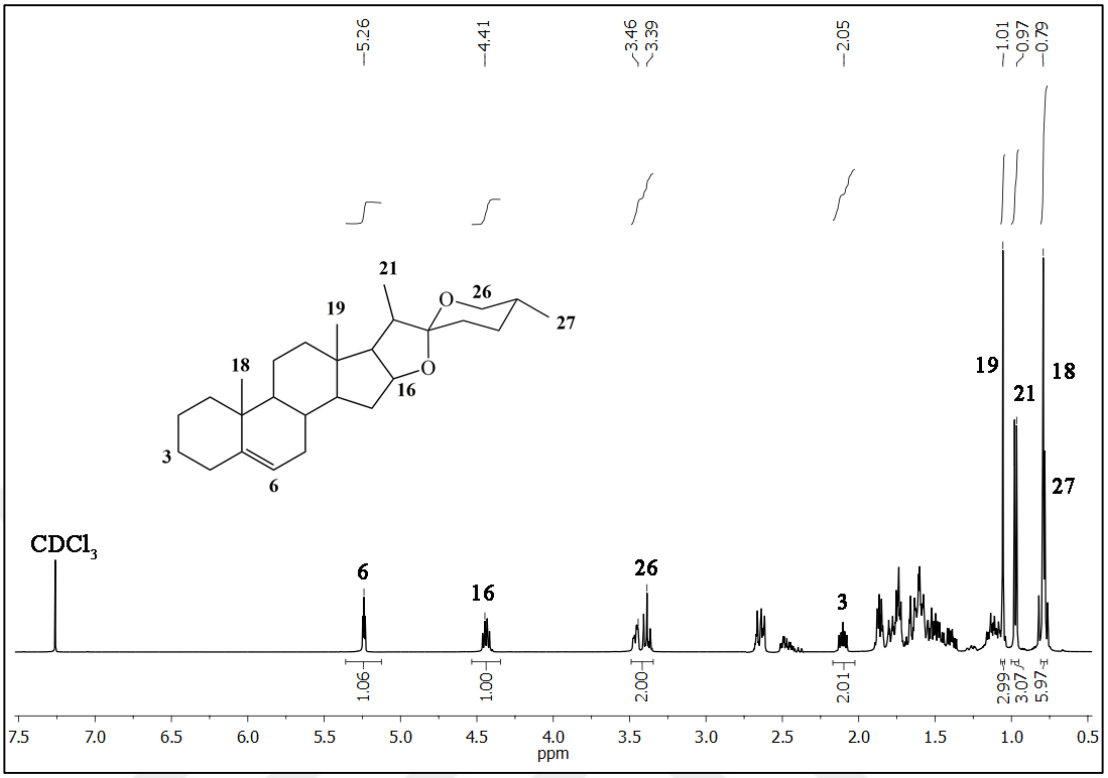

Şekil 3.23. Bileşik 22'nin $\delta_5$-piridinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Hidroksil gruplarının bağlı olduğu C-3 ve C-6 protonlar ise spektrumda sırasıyla 3,95 ve 3,69 ppm'lerde gözlenmektedirler. B-halkası doymuş türev bileşikleri elde etmek amacıyla ticari olarak alınan diosgenin'den başlayarak piridinli ortamda TsCl ile muamele edildikten sonra tosillenmiş türev elde edildi. Bileşik 23 çok çabuk bozulmaya başladığından kromatografik saflaştırma yapılmadan hızlı bir şekilde ekstraksiyon yapıldı ve bir sonraki reaksiyona hazır hale getirildi. Bu reaksiyonda tosilat grubunun NaI varlığında iyodo grubuna nükleofilik yerdeğiştirmesi, C-3 pozisyonunda β-konfigürasyonda iyodo grubu bağlı Bileşik 24'ü verdi. Bileşik 24'ün $^{1}$H-NMR spektrumunda C-3 proton sinyali 3,47 ppm'den 4,08 ppm'e, C-6 proton sinyali ise 5,33 ppm'den 5,41 ppm'e kaydığı gözlenmektedir (Şekil 3.24).




Şekil 3.24. Bileşik 24'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

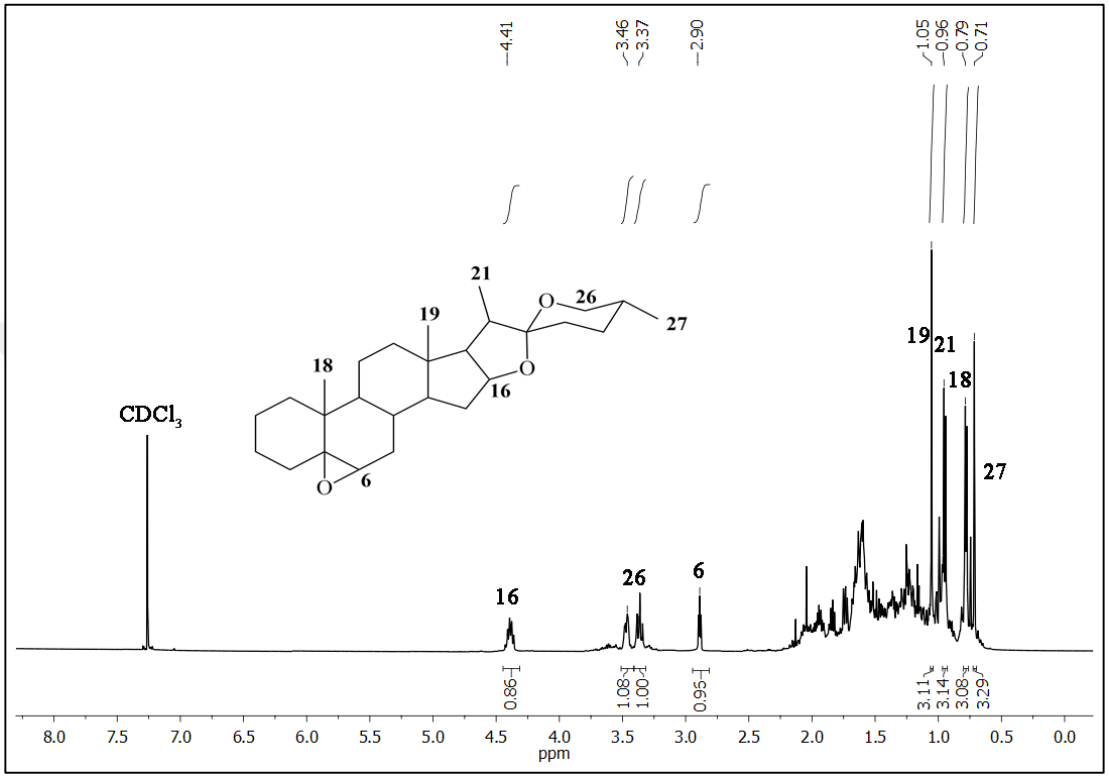
Daha sonra bileşik 24, Zn ve asetik asit varlığında bileşik 25'e indirgendi. $^{1}$H-NMR spektrumunda C-3 proton sinyalinin 4,07 ppm'den 2,05 ppm'e kaydığı ve iki hidrojenlik integral alanına sahip olduğu görülmektedir. Aynı zamanda 5,41 ppm'de olan çift bağ protonunun indirgenme sonrasında 5,26 ppm'de gözlendiği reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.25). Aynı zamanda bileşik 25'e ait $^{13}$C-NMR spektrumunda çift bağ karbonları sırasıyla 143,9 ve 118,9 ppm'lerde gözlenmektedir.




Şekil 3.25. Bileşik 25'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Bileşik 25'in mCPBA ile °C'de gerçekleştirilen epoksitlendirme reaksiyonu ile %90 verimle bileşik 26'nın α/β epoksit karışımı elde edildi. Bileşik 26'nın $^1$H-NMR spektrumuna bakıldığında epoksitleme reaksiyonu öncesinde 5,26 ppm'de gözlemlenen çift bağ protonlarının kimyasal kayma değeri 2,90 ppm'de görülmektedir. Buradan başlangıç bileşiğinin tükendiğini, reaksiyonun başarı ile gerçekleştiği ve epoksit halkasının oluştuğunu göstermektedir. Aynı zamanda FTIR spektrumunda 1630 $cm^{-1}$'de C=C çift bağına ait absorpsiyon bandının görülmemesi reaksiyonun gerçekleşmiş olduğunu desteklemektedir. Saflaştırma yapmadan bileşik 26'nın epoksit halkası MeOH kullanılarak TCNE katalizörlüğünde açıldı ve bileşik 27 elde edildi. TCNE elektron alıcı bir π asittir ve epoksit halkasının alkoliz ile açılması için ılımlı bir katalizördür. TCNE katalizli alkoliz mekanizmasının şu şekilde olduğu tahmin edilmektedir.

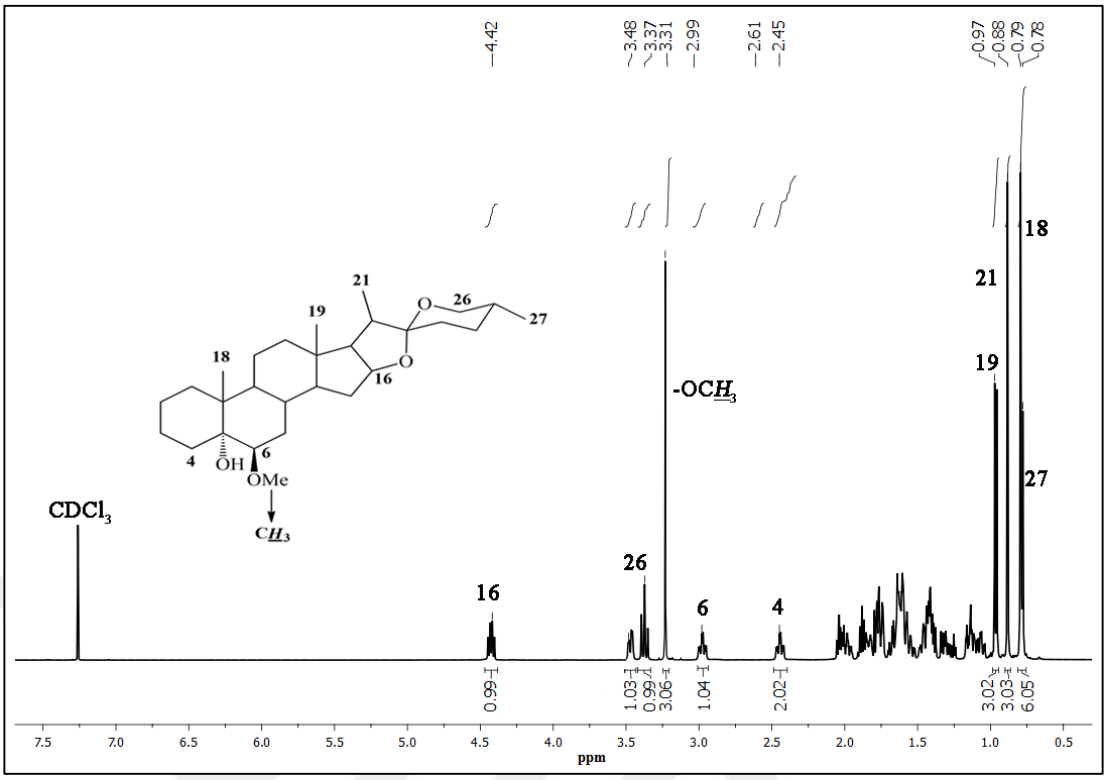
Epoksit halkasına alkolün saldırısının, epoksit halkasındaki oksijen atomu ile TCNE arasındaki koordinasyondan veya tek elektron transferinden başladığı varsayılmaktadır. Bileşik 27'nin $^{1}$H-NMR spektrumunda metoksi grubuna ait metil protonları 3,31 ppm'de ve C-6 protonu 2,99 ppm'de gözlenmektedir.



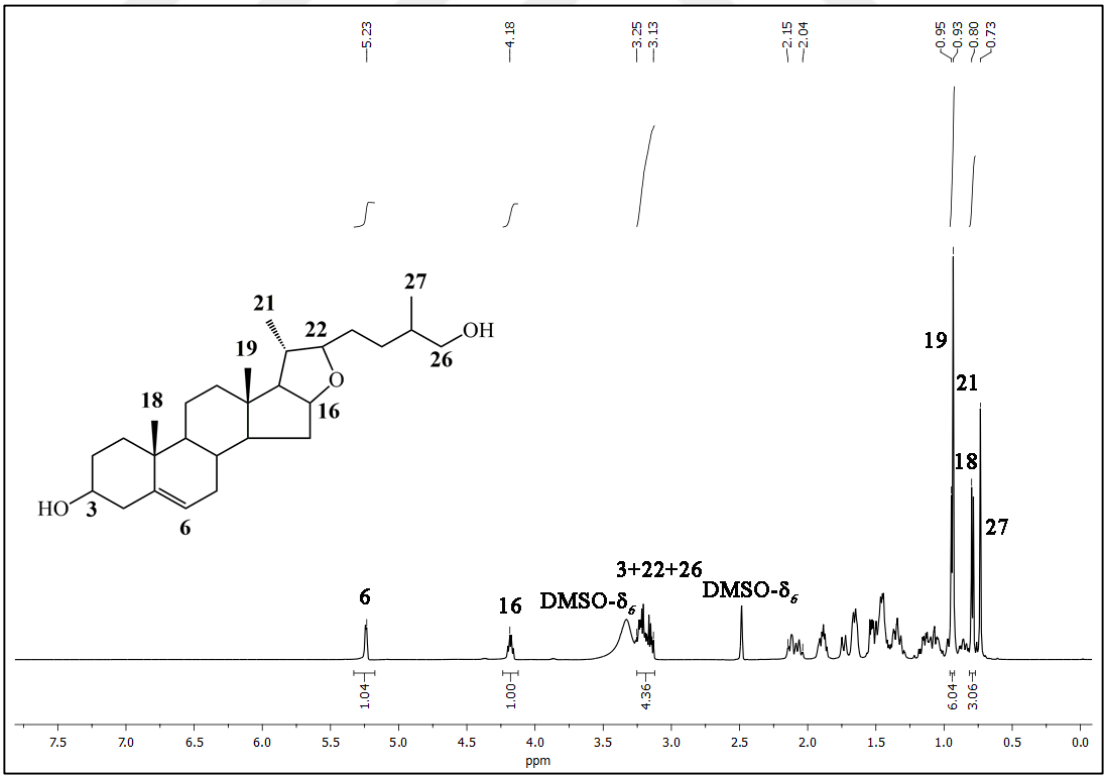

Şekil 3.26. Bileşik 26'nın $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

### 3.3. F-Halkasındaki Reaksiyonlar İle Türevlerin Sentezi

Bu bölümde diosgenin bileşiğinin F halkasında reaksiyonlar ile türev bileşikleri sentezlendi. Bu bileşikler daha sonra polimerlerin sentezinde kullanıldı. Bu amaçla, diosgeninin bir spiroketal olan F halkası, $LiAlH_4$ ve $AlCl_3$ varlığında redüktif olarak açılması ile %65 verimle dihidro diosgenin olan bileşik 28 elde edildi. Bileşik 28'e ait FTIR spektrumunda 3300 ve 1630 $cm^{-1}$ görülen absorpsiyon bantları sırasıyla hidroksil ve C=C bağının absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. $^{1}$H-NMR spektrumu diosgenine ait spektrum ile karşılaştırıldığında E ve F spiro halkasının açılmasıyla C-16'ya bağlı proton 0,22 ppm'lik kayma ile 4,18 ppm'de gözlenmektedir.

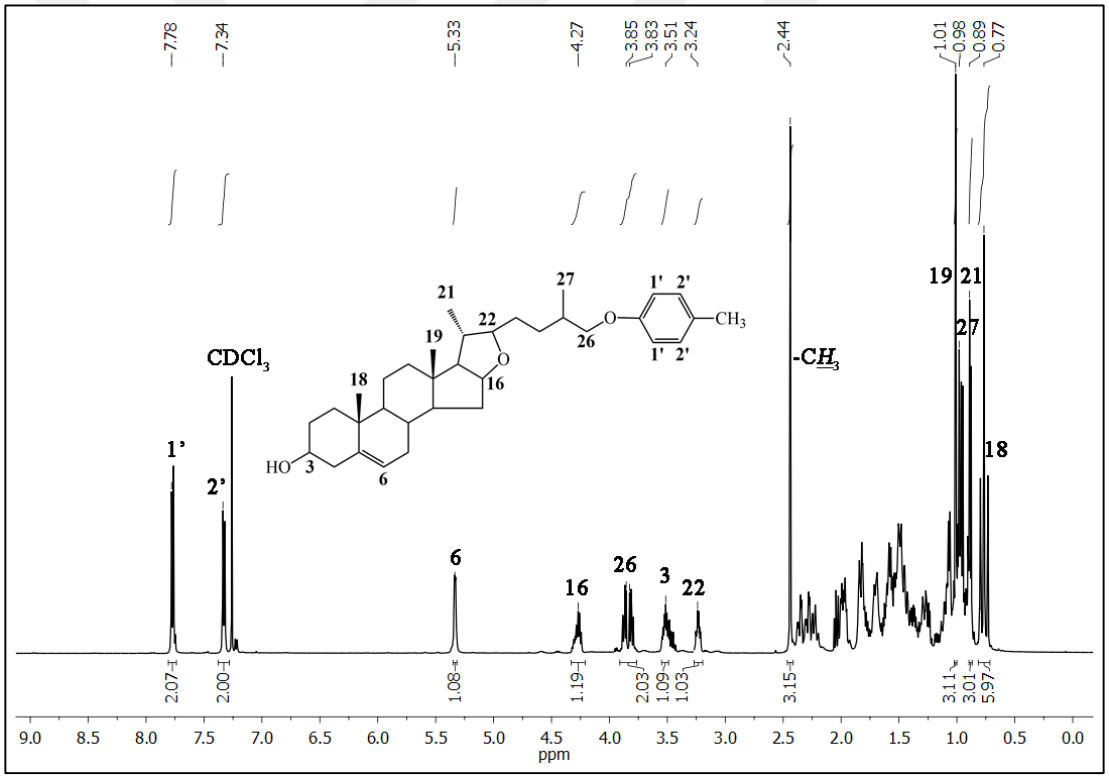



Şekil 3.27. Bileşik 27'nin $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu




Şekil 3.28. Bileşik 28'in DMSO-$\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

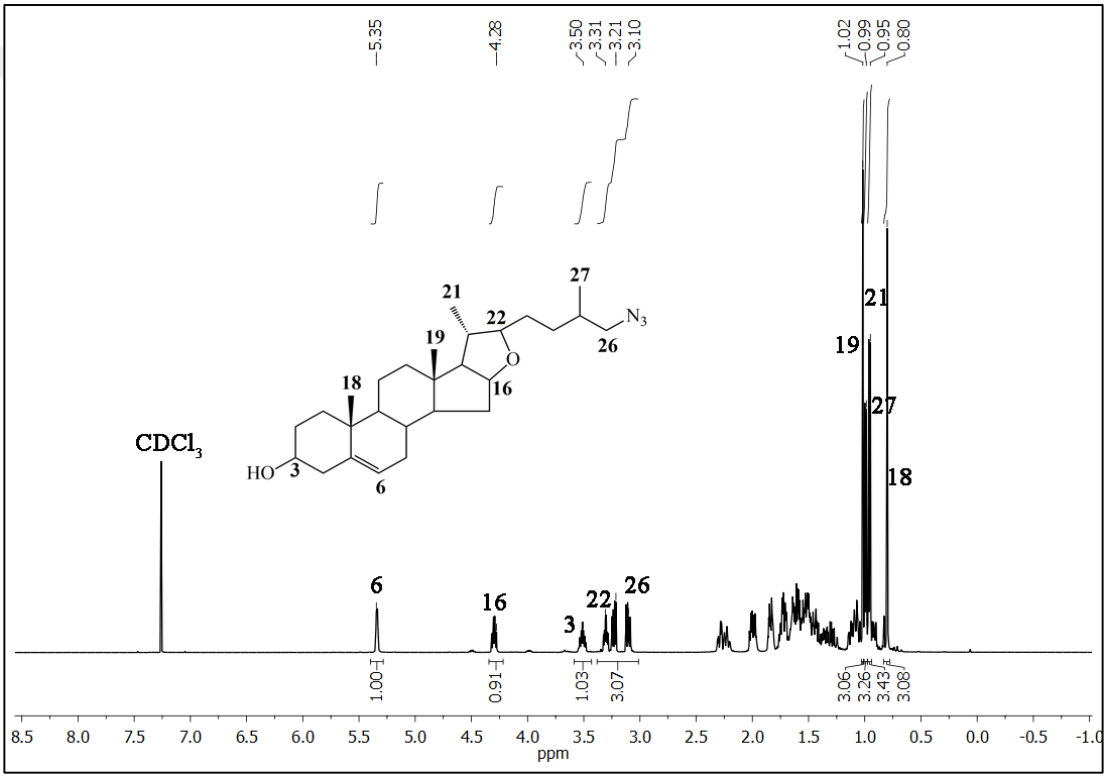
Aynı zamanda F halkası açıldıktan sonra C-3, C-26 ve C-22 ait protonların 3,35-3,13 ppm arasında dört hidrojen integral alanına sahip olduğu görülmektedir. Bileşik 28 daha sonra C-26'a bağlı primer hidroksil grubunu seçici olarak korumak için TsCl varlığında °C'de %50 verimle tosiloksi türevi olan bileşik 29'a çevrildi. TsCl miktarı bileşik 28'e oranla 2 kat ekivalent olarak kullanıldı ancak daha fazla veya daha az kullanılması ve sıcaklığın yükselmesi verimi düşürdü. Bileşik 29'a ait $^{1}$H-NMR spektrumında 7,78 ve 7,34 ppm'deki pikler p-toluensülfonil grubunun aromatik halkasına ait 1've 2'ile gösterilen protonlara aittir. Spektrumda 3,85 ve 3,83 ppm'lerde görülen sinyaller C-26 protonlarının anizotropik etkiden dolayı düşük alana kaydığını göstermektedir. Aynı nedenden dolayı C-3 ve C-22 bağlı protonlarda 3,51 ve 3,24 ppm'e kaymıştır.




Şekil 3.29. Bileşik 29'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

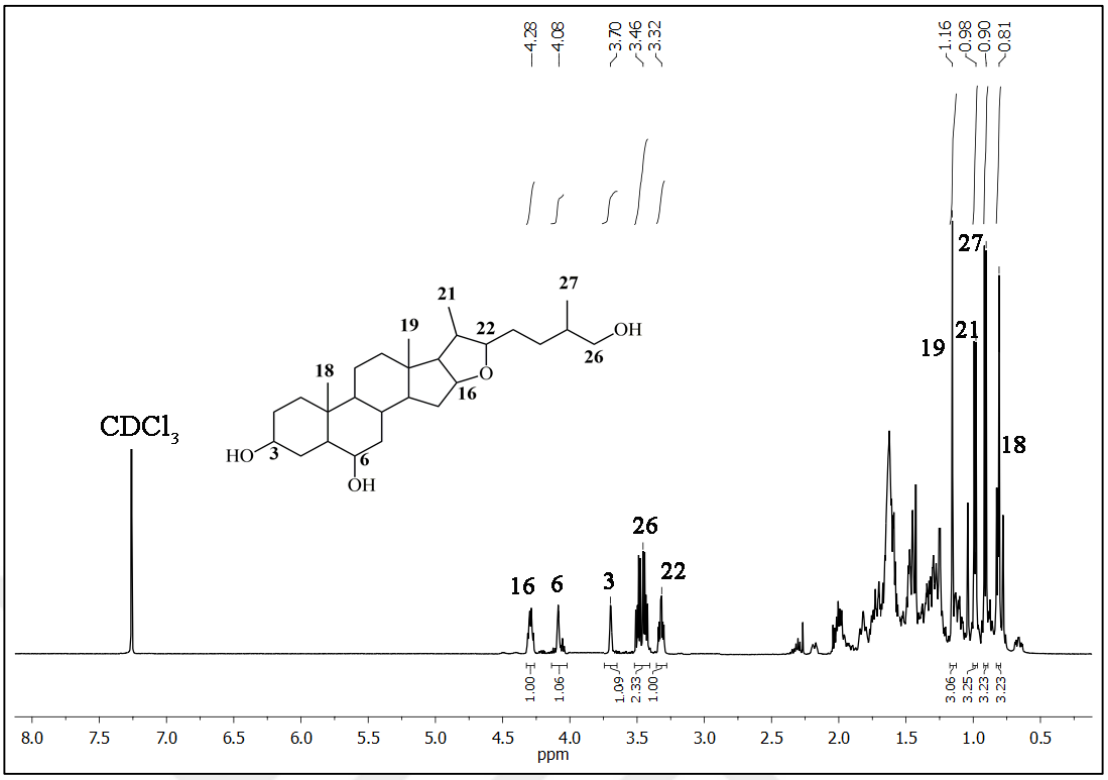
F halkasında azid grubu elde etmek için bileşik 29'un DMF içerisinde $NaN_3$ ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha önce yapılan çalışmada, reaksiyonun 100 °C'de ve 50 saat devam ettiğinde F halkasında triazol halkasının oluştuğu rapor edilmiştir. Ancak takip edilen son çalışmada 1,3-dipolar siklokatılmanın (triazole halkası) olmaması için reaksiyon sıcaklığının 50-70 °C arasında ve kullanılan $NaN_3$ miktarının bileşik 29'a oranla dört ekivalent katı olması gerektiği bildirilmiştir.

Bu nedenle bu çalışmada sıcaklık 65 °C'de tutularak ve iki saat karıştırılarak bileşik 30 %90 verimle elde edildi. Reaksiyon mekanizmasının tosil grubunun azid ile yer değiştirmesi üzerinden yürümesi sağlandı. Bileşik 30'un FTIR spektrumunda 2100 $cm^{-1}$'deki keskin absorpsiyon piki karakteristik azid grubuna aittir. $^{1}$H-NMR spektrumu incelendiğinde; C-26'ya bağlı iki protonu sinyalinin sırasıyla 3,85 ve 3,83 ppm'den 3,21 ve 3,10 ppm yüksek alana kaydığı görülmektedir. Bunun nedeni azot grubunun tosil grubuna göre elektronegatifliğinin daha zayıf olmasından kaynaklanır. Ayrıca spektrumunda tosil grubuna ait aromatik ve metil protonlarının gözlenmemesi dönüşümün tam verimle gerçekleştiğini göstermektedir.




Şekil 3.30. Bileşik 30'un $CDCl_3$ içinde alınmış $^{1}$H-NMR spektrumu

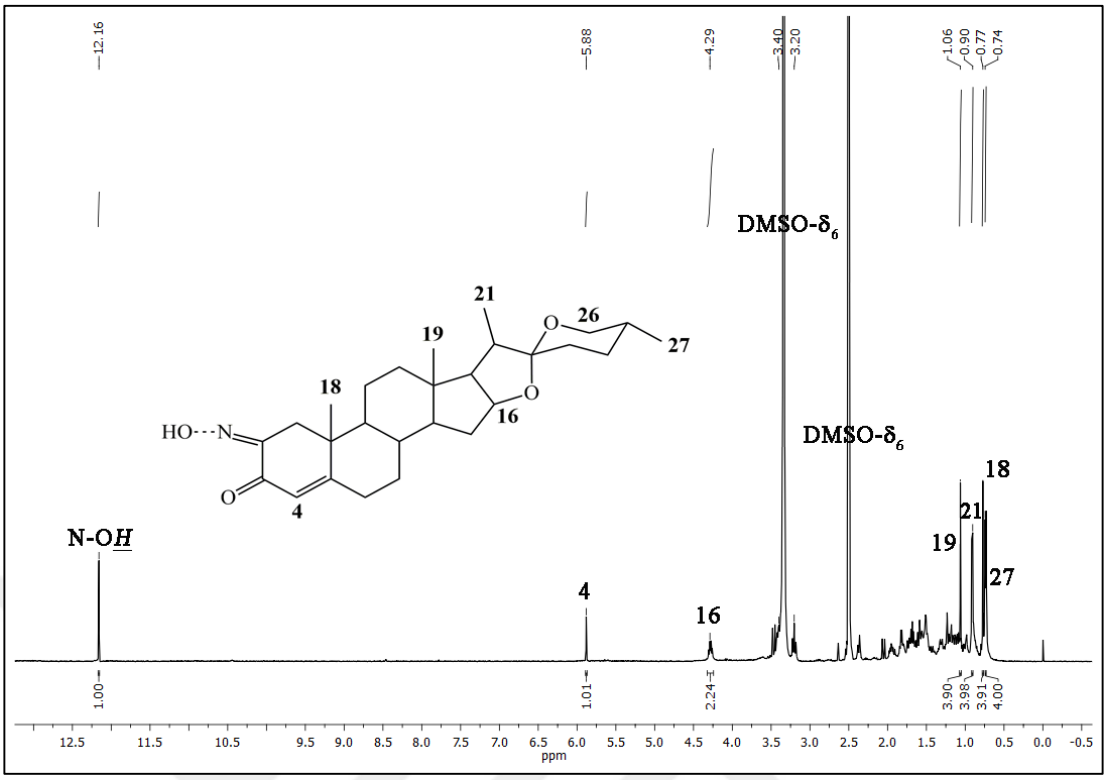
Üç hidroksil grubuna sahip bileşik 31'i elde etmek için bileşik 22, $LiAlH_4$ ve $AlCl_3$ varlığında F halkası açılma reaksiyonu gerçekleştirildi. FTIR spektrumda 3500 $cm^{-1}$ yayvan hidroksil absorpsiyon bandı sentezin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bileşik 31'in $^{1}$H-NMR spektrumunda C-26 bağlı iki proton sinyali 3,46 ppm'de AB(X çatı) olarak görülmektedir.




Şekil 3.31. Bileşik 31'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

### 3.4. Heterohalkalı Türev Bileşiklerin Sentezi

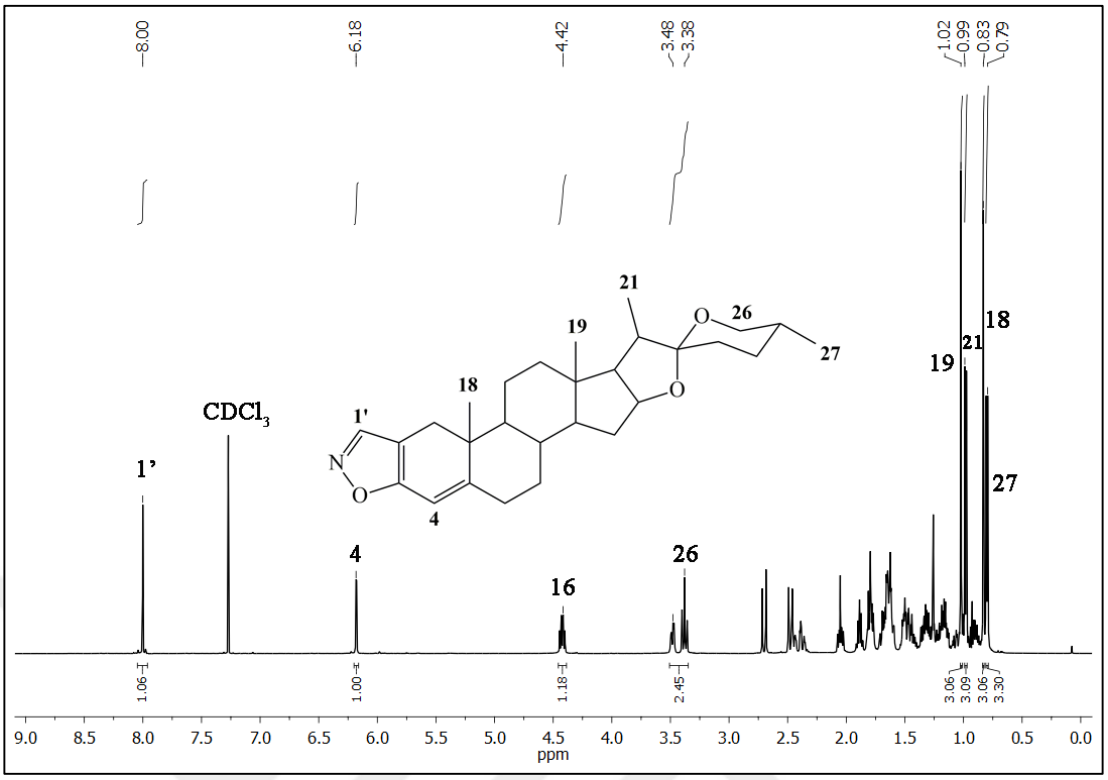
Heterohalkalı türev bileşiklerin sentezi için, A halkasında değişiklikler yapılan türev bileşikler kullanılarak bazı oksiimino spirostan türevleri sentezlendi. Bileşik 32, 33 ve 34'ün sentezi için başlangıç bileşiği olarak bileşik 8 kullanıldı. Benzen içerisinde NaH ve etilformat varlığında elde edilen bileşik 8, 2-hidroksiimino türevi olan bileşik 32'yi vermek için $NaNO_2$ ile muamele edildi. Bileşik 32'ye ait FT-IR spektrumunda 3450 $cm^{-1}$'deki yayvan band oksim (=N-OH) grubundaki hidroksil grubunun varlığını göstermektedir. Spektrumda sırasıyla 1640, 1550, 1190 ve 1050 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler ise sırasıyla C=C, C=N, C-N ve CO-C gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. $^1$H-NMR spektrumu (Şekil 3.32) incelendiğinde; 12,16 ppm'deki tekli pik 2-hidroksimino grubu varlığını göstermektedir. Spektrumda 5,88 ppm'deki pik oksim yapısında bulunan çift bağa (C-4) ait protonun sinyalidir.



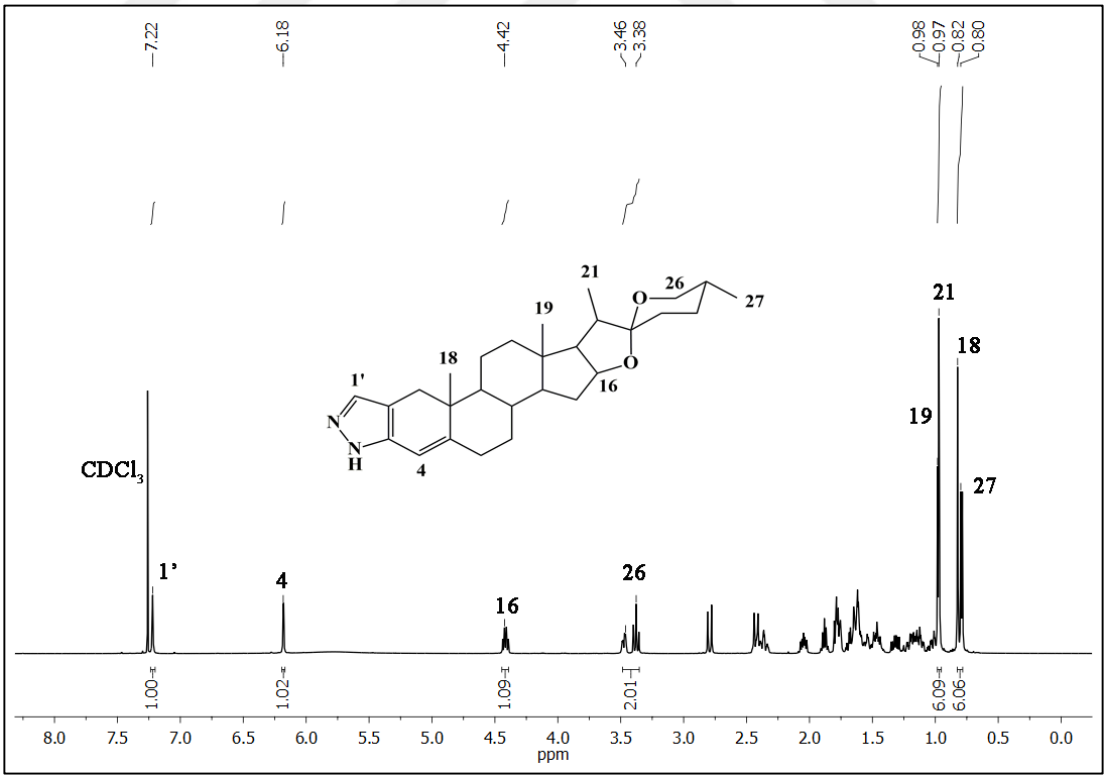

Şekil 3.32. Bileşik 32'nin DMSO-$\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Bileşik 8'in izoksazol türevi olan bileşik 33'ü vermek üzere sulu EtOH içinde $NH_2OH.HCl$ ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Bileşik 33'ün FTIR spektrumunda 1670 $cm^{-1}$'de C=C, 1500 $cm^{-1}$'de C=N ve 1150 $cm^{-1}$'de C-N absorpsiyon bantları görülmektedir. $^1$H-NMR spektrumunda (Şekil 3.33), 8,00 ppm'de görülen sinyal izoksazol halkasındaki protona aittir [65]. Aynı zamanda C-4 ve C-6'ya bağlı olan diğer protonlar sırasıyla 6,18 ve 4,42 ppm'lerde görülmektedir. $^{13}$C-NMR spektrumunda, izoksazol halkası C-N spin-spin eşleşmesindeki karbon atomu 148,7 ppm'de görülmektedir.

Bileşik 8'in hidrazin hidrat ile siklo kondenzasyon reaksiyonu sonucunda bir pirazol olan bileşik 34 elde edildi. Bileşik 34'e ait FTIR spektrumunda 1560-1585 ve 3390-3410 $cm^{-1}$ arasında sırasıyla C=N ve NH bantları gözlenmektedir. $^1$H-NMR spektrumunda pirazol halkasındaki karbona bağlı proton sinyali 7,22 ppm'de görülmektedir (Şekil 3.34).

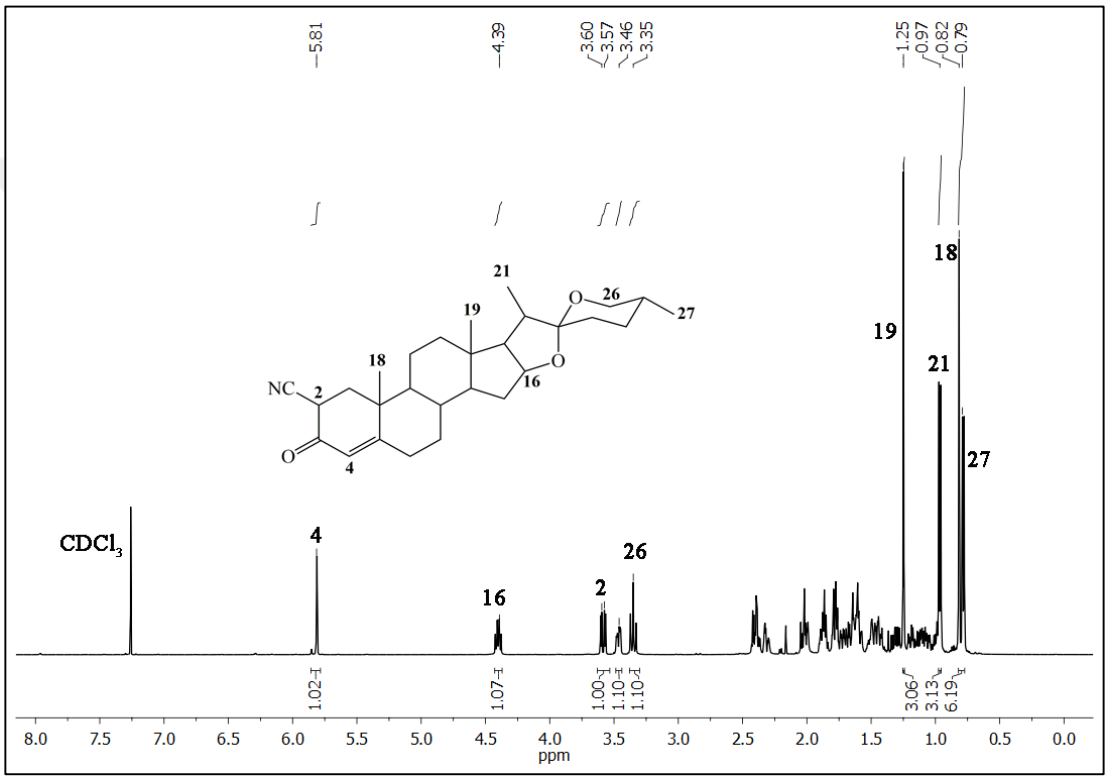



Şekil 3.33. Bileşik 33'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu




Şekil 3.34. Bileşik 34'ün $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

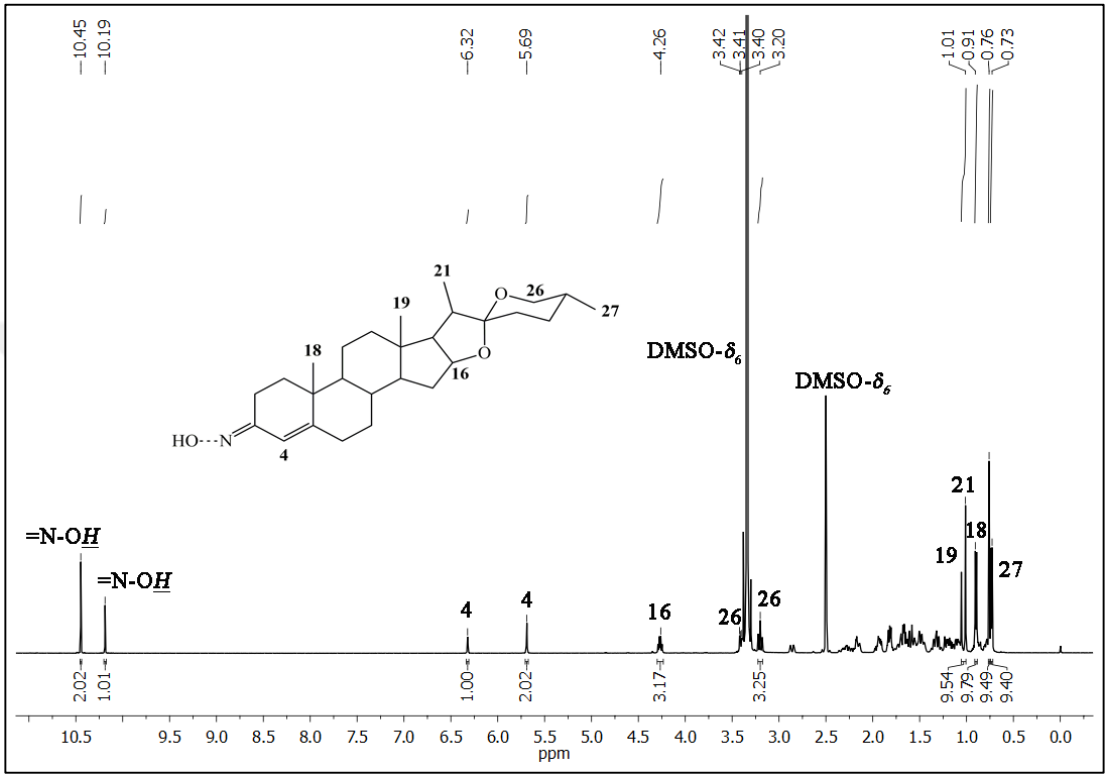
Bileşik 33'ün $EtO_2$/MeOH karışımında NaOMe varlığında izoksazol kısmı açılarak bir nitril bileşiği olan bileşik 35 elde edildi. Bileşik 35'in FTIR spektrumunda 2300 $cm^{-1}$'deki pik C-N üçlü bağına aittir. Spektrumda görülen diğer C=C, C=N ve C-N etkileşimleri sırasıyla 1670, 1550 ve 1150 $cm^{-1}$'lerde absorpsiyon bantları vermektedir. $^1$H-NMR spektrumunda 3,57-3,60 ppm arasında nitril grubunun bağlı olduğu ikinci karbon atomuna ait proton sinyali görülmektedir. Ayrıca spektrumda 5,81 ppm'de görülen kimyasal kayma değeri C-4'e bağlı protonuna aittir.




Şekil 3.35. Bileşik 35'in $CDCl_3$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

Heterohalkalı türev bileşiklerin sonuncusu olarak 3-hidroksiimino türevi olan bileşik 36, bileşik 1'in $NaNO_2$ ile reaksiyonu sonucunda, E-oksim ve Z-oksim steroizomer karışımı (1:2 oranda) olarak elde edildi. $^1$H-NMR spektrumu incelendiğinde; 10,45 ve 10,19 ppm'lerdeki pikler oksimino gruplarındaki 3E ve 3Z protonlarına aittir. Spektrumda 6,32 ve 5,69 ppm'lerdeki pikler E ve Z oksim yapılarında bulunan çift bağın olduğu C-4'e ait protonların sinyalledir. E halkasında bulunan 16 karbona bağlı proton sinyalinin ise 4,40 ppm'den 4,26 ppm'e ve çoklu olarak yüksek alana kaydığı görülmektedir. Yüksek alana kayma oksijen atomu yerine azot atomunun bağlanması ile elektronik etkinin azalmasından kaynaklanmaktadır.

DMSO-$\delta_6$'da alınan $^{13}$C-NMR spektrumu incelendiğinde; 156,3 ve 154,1 ppm'lerde bulunan pikler E ve Z oksim bileşiklerinin C-5 atomlarına ait sinyallerdir. Oksim grubunun bağlı olduğu C-3'ler ise sırasıyla 152,4 ve 151,0 ppm'de gözlenmektedir. Çift bağa ait C-4 sinyalleri ise sırasıyla 118,0 ve 110,8 ppm'lerde görülmektedir [66].



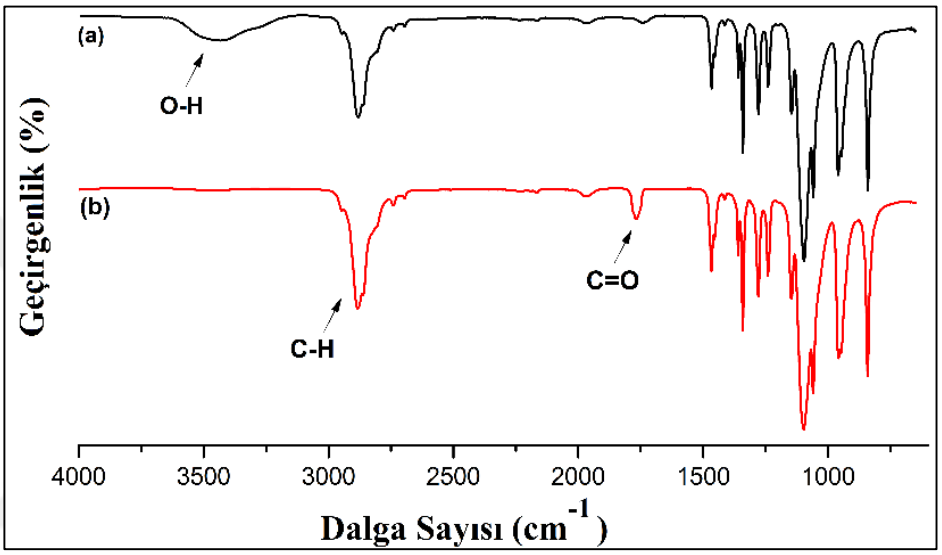

Şekil 3.36. Bileşik 36'nın DMSO-$\delta_6$ içinde alınmış $^1$H-NMR spektrumu

### 3.5. Polimerik Miselin Hazırlanması

#### 3.5.1. mPEG-Diosgenin-Kurkumin sentezi ve yapısal karakterizasyonu

Diosgenin konjuge ve kurkumin bağlı mPEG (mPEG-DGN-CUR), üç aşamalı bir reaksiyon dizisi ile hazırlandı (Şekil 2.8a). İlk adımda, kurkumin mono alkin (CMA) daha önce rapor edilen çalışmada bazı küçük değişiklikler yapılarak sentezlendi [67]. Özetle alkin uç gruplu kurkumin elde etmek için kurkumin $K_2CO_3$ ve propargil bromür varlığında reaksiyona sokularak %42 verimle CMA elde edildi. Öte yandan azid uç grubuna sahip mPEG-DGN sentezlendi. Daha sonra mPEG-DGN-CUR, "klik" reaksiyonu koşulları atında (bakır (II) sülfat ve sodyum askorbat) CMA ile mPEG-DGN reaksiyonundan elde edildi.

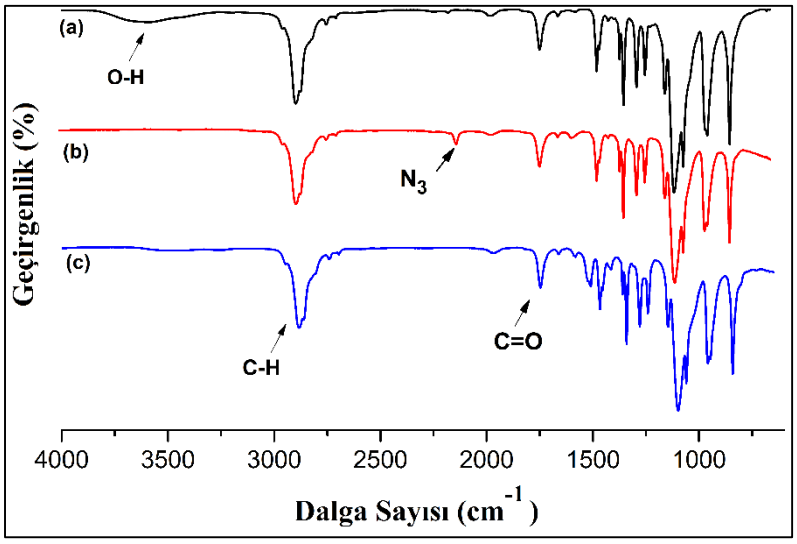
Hidrofilik mPEG polimeri ve hidrofobik diosgenin ve kurkumin bileşiklerinden oluşan amfifilik polimerik konjugatın sulu çözelti içinde, polimerik misel oluşturmak için kendi kendine birleşebilme özelliği incelendi. mPEG-DGN-CUR eldesi için sentezlenen ürünlerin kimyasal yapıları FTIR ve $^{1}$H NMR spektroskopik teknikleri ve GPC çalışmaları ile karakterize edildi. FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, mPEG-COOH için 1734 cm$^{-1}$'de karbonil gerilmesinin gözlenmesi mPEG-OH'ın Jones reaktifi ile başarılı bir şekilde mPEG-COOH'a dönüştüğünü göstermektedir.




Şekil 3.37. (a) mPEG-OH ve (b) mPEG-COOH'a ait FTIR spektrumları

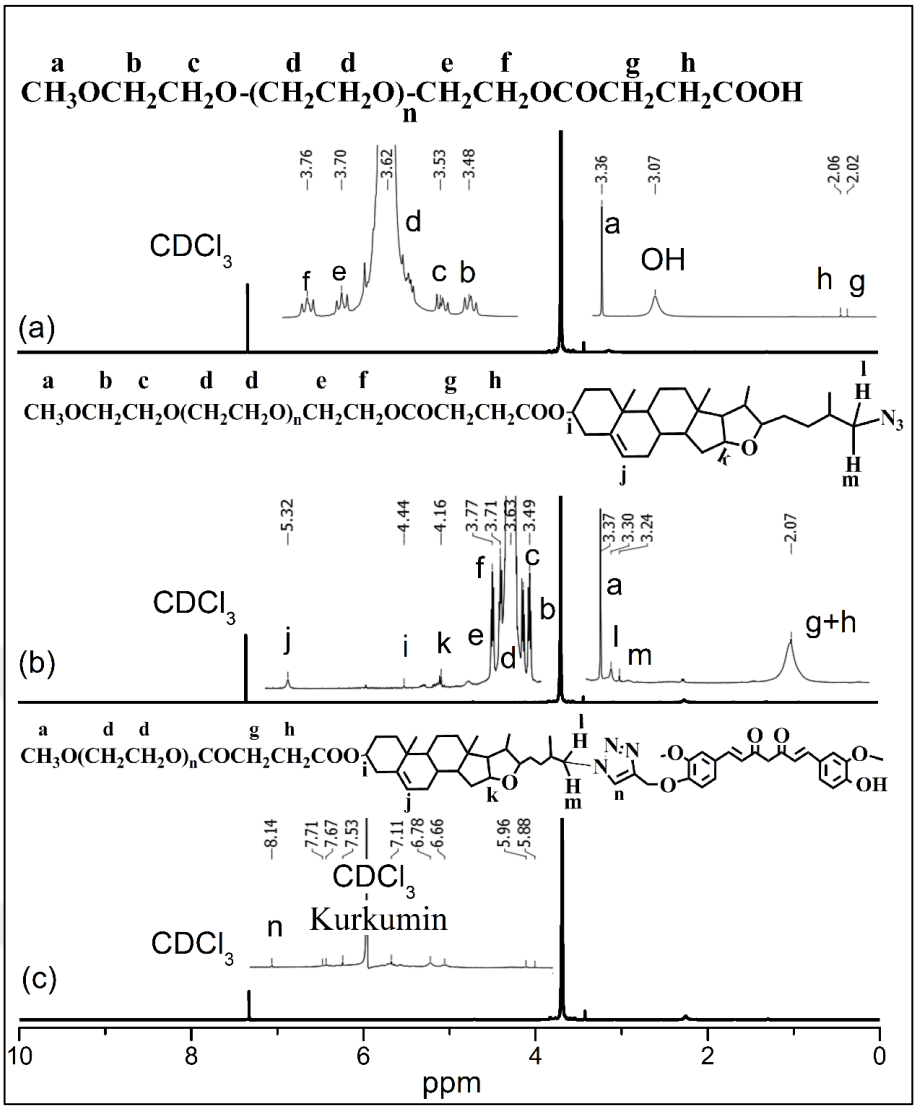
mPEG-COOH'in FTIR spektrumunda, hidroksil grubu titreşimleri yaklaşık 3050 cm$^{-1}$'de geniş bir bant vermektedir (Şekil 3.38a). mPEG-COOH'in azid uç grubuna sahip bileşik 30 ile reaksiyonundan sonra, mPEG-DGN bileşiğine ait FTIR spektrumunda görülen 2100 cm$^{-1}$'deki pik, azid fonksiyonel grubunun varlığını göstermektedir (Şekil 3.38b). "Klik" reaksiyonundan sonra azid sinyalinin kaybolması, reaksiyonunun başarısını açıkça göstermektedir (Şekil 3.38c).

mPEG-COOH, mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR'in $^{1}$H-NMR analizinde kimyasal yapılara karşılık gelen kayma değerleri Şekil 3,39'da gösterilmektedir. Spektrumlarda, mPEG polimerine ait tekrarlanan birim -OCH$_2$-CH$_2$-protonları $\delta_H$ 3,62 ppm'de karakteristik olarak görülmektedir. $\delta_H$ 3,36; 3,76 ve 2,06 ppm'lerdeki sinyaller, sırasıyla CH$_3$-O, -CH$_2$-O-C=O ve -CH$_2$-CH$_2$-COO protonlarına karşılık gelmektedir.




Şekil 3.38. FTIR spektrumları a) mPEG-COOH, b) mPEG-DGN, c) mPEG-DGN-CUR

Bütün bu sonuçlar mPEG-COOH'in başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir (Şekil 3.39a). 5,32 ppm'deki tekli ve 4,44 ppm'deki çoklu sinyaller, sırasıyla diosgenin C-5 ve C-3 bağlı protonlara karşılık gelmektedir (Şekil 3.39b). Diosgenin halkasındaki ($H_j$) ve mPEG uç metilen grubuna ait protonlar ($H_h$) arasındaki deneysel ve teorik integral oranları birbirine yakındır. ($H_h/H_i$, deneysel= 2,03, teorik= 2,00). Bu sonuçlar, mPEG polimerlerin esterifikasyon reaksiyonu yoluyla diosgenine bağlandığını göstermektedir. Azido grubuna ($H_l$ ve $H_m$) bağlı metilen protonları ile ilgili iki yeni pikin 3,30 ve 3,24 ppm'de ortaya çıktığı gözlenmektedir. Terminal grubunun metil protonları ($H_l$ ve $H_m$), Cu (I)-katalizörlü 1,3-siklik katılma reaksiyonundan sonra 0,20-0,17 ppm arasında yüksek alana kaymaktadır (Şekil 3.39c). Ayrıca mPEG-DGN-CUR'un $^1$H NMR spektrumunda triazol halkasındaki ($H_n$, 8,14 ppm) metilen protonu ve aromatik kurkumin protonlarına ait ($H_{kurkumin}$; 6,66-7,71 ppm) sinyallerde gözlenmektedir (Şekil 3.39c). Polimerin FTIR ve $^1$H-NMR analizleri, istenen grupların başarılı ve niceliksel birleşimini açıkça kanıtlamaktadır. CMA'e ait FTIR ve $^1$H-NMR spektrumları ise tezin ek kısmında verilmiştir. Polimerlerin ortalama moleküler ağırlıkları ve moleküler ağırlık dağılımları GPC ile belirlendi ve ilgili veriler Tablo 3.1 ve Şekil 3.40'da verildi. mPEG-COOH, mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR'ün sayısal ortalama molekül ağırlığı $M_n$ 5100 Da (PDI= 1,05), 5550 Da (PDI= 1,20) ve 5920 Da (PDI= 1,15) olarak belirlendi. Polimerler, simetrik ve ünimodal elüsyon pikleri ve oldukça dar polidispersite indeksi (PDI) göstermektedir.



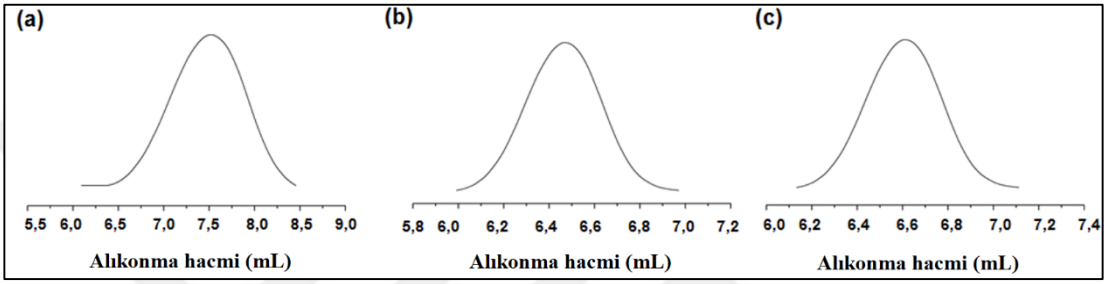

Şekil 3.39. mPEG-COOH (a) mPEG-DGN (b) ve mPEG-DGN-CUR (c) $^{1}$H-NMR spektrumları

Polimerlerin $^{1}$H-NMR spektrumu bileşimi, $M_{n,\ NMR}$ değerlerinin hesaplanmasını sağlamaktadır. Polimerizasyon derecesi ($DP_n$), 3,62 ppm'de mPEG ana zincirinin ($CH_2CH_2O$) ($H_d$) metilen protonları ve 3,76 ppm'de birincil hidroksil metilen protonları (-$CH_2OCO$-) ($H_f$) arasındaki integral oranları kullanılarak belirlendi (Şekil 3.39a). Beklendiği gibi, $M_{n,\ NMR}$ ve $M_{n,\ GPC}$'deki farklılıklar mPEG'in hidrodinamik hacimleri ile kalibrasyon için kullanılan doğrusal polistiren standartları arasındaki farka atfedilmektedir. Bu nedenle, $^{1}$H-NMR ile belirlenen polimerlerin moleküler ağırlığı, GPC analizinden elde edilenlerden daha güvenilirdir [68, 69].

Tablo 3.1. Polimerlere ait GPC sonuçları

| Polimerler | $M_{n,teorik}$[a] | $M_{n,NMR}$[b] | $M_{n,GPC}$[c] | $M_w/M_n$[c] | Dönüşüm (%)[d] |
|---|---|---|---|---|---|
| mPEG-COOH | 5044 | 5100 | 5200 | 1,05 | 98 |
| mPEG-DGN | 5443 | 5550 | 6050 | 1,20 | 95 |
| mPEG-DGN-CUR | 5840 | 5920 | 6800 | 1,15 | 95 |

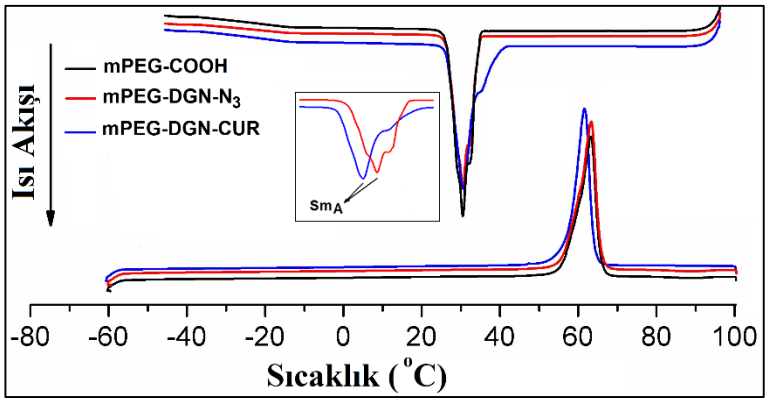
[a] $M_{n,teorik} = M_{mPEG} + M_{diosgenin}$
[b] $M_{n,NMR}$ $^1$H NMR ile belirlendi ve $M_{n,\ NMR}$ = [112 (tekrar eden birim $DP_n$) x $M_{monomer}$] + $M_{diosgenin}$ + $M_{kurkumin}$ olarak hesaplandı
[c] $M_{n,GPC}$ and $M_w/M_n$ GPC analizi ile polistiren standardı kullanılarak belirlendi. THF elüent olarak kullanıldı (RI detektör).
[d] Gravimetrik olarak belirlendi.




Şekil 3.40. a) mPEG-COOH b) mPEG-DGN c) mPEG-DGN-CUR GPC kromatogramları

### 3.5.2. Termal özellikleri

DSC, mPEG polimerlerinin erime ve kristallizasyon davranışlarını belirlemek için kullanıldı. İlk soğutma çalışması ve ikinci ısıtma çalışmasında polimerlerin DSC eğrileri (mPEG-COOH, mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR) Şekil 3.41'de gösterilmektedir. mPEG polimerleri için ısıtma işlemi sırasında, erime ve izotropik faz Smektik A ($Sm_A$) geçişlerini temsil eden mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR için iki endotermik pik saptandı. Soğutma eğrileri üzerinde süper soğutma durumundan dolayı, $Sm_A$ faz geçişine ve izotropik kristallenme geçişine rastlanmadı [23]. mPEG-DGN ve CMA arasındaki esterifikasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen mPEG-DGN-CUR için $T_m$ değeri, kurkumin'in bağlanmadan önceki hali ile karşılaştırıldığında daha düşük kristalliği nedeniyle azid fonksiyonel polimere göre daha düşük sıcaklıkta gözlendi. Tablo 3.2'deki veriler, polimerlerin erime ($T_m$), kristallenme ($T_c$) sıcaklıklarını ve füzyon entalpilerini ($\Delta H_m$) göstermektedir.




Şekil 3.41. Polimerlere ait ikinci ısıtmadaki DSC termogramları

Polimerlerin ısısal bozunma özelliklerinin belirlenmesi termogravimetrik analiz (TGA) ile gerçekleştirildi. İlgili termogramlar Şekil 3.42'de ve ilgili veriler Tablo 3.2'de verildi. Bu termogramlarda, karboksilik asit fonksiyonel grubuna sahip polimer (mPEG-COOH) öncüsü ile karşılaştırıldığında, diosgenin ve kurkumin'in varlığına bağlı olarak $T_{max}$ değerinin azaldığı gözlenmektedir. mPEG polimerlerinin yapısında kömürleşme verimi açısından önemli bir farklılık gözlenmemektedir.

Tablo 3.2. mPEG-DGN-CUR polimerlerinin termal özellikleri

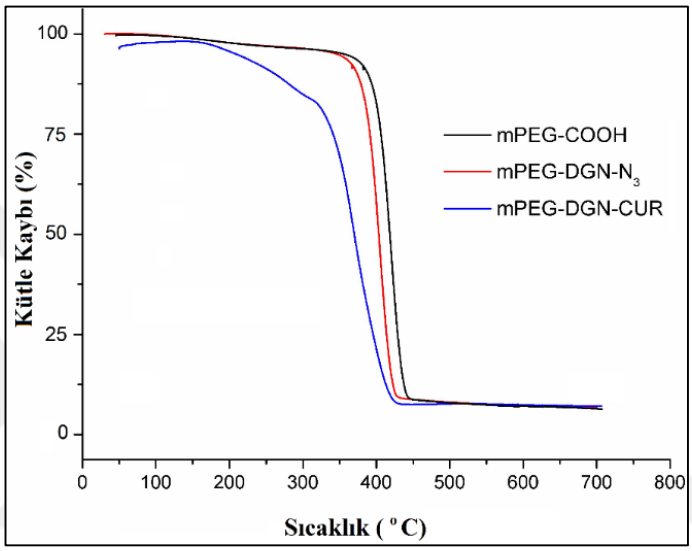
| Polimerler | $X_C$[a] (°C) | $T_m$[b] (°C) | $\Delta H_c$[c] (J/g) | $T_{onset}$[d] (°C) | $T_{max}$[e] (°C) | Verim[f] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| mPEG-COOH | 31,6 | 65,05 | 113,80 | 356 | 399 | 3,62 |
| mPEG-DGN-$N_3$ | 33,6 | 66,50 | 117,04 | 339 | 386 | 3,77 |
| mPEG-DGN-CUR | 36,7 | 64,01 | 111,61 | 304 | 360 | 3,46 |

[a] $X_C$, polimerlerin ikinci ısıtmada kristalizasyon değerleri.
[b] $T_m$, polimerlerin ikinci ısıtmada erime noktası değerleri.
[c] $\Delta H_c$, DSC ile ölçülen polimerlerin füzyon entalpi değerleri.
[d] $T_{onset}$, TGA ile hesaplanan polimerlerin bozunmaya başlama sıcaklık değerleri.
[e] $T_{max}$ kütle kaybının maksimum oranda olduğu sıcaklık değerleri.
[f] 700 °C'deki kalan kısım yüzdeleri, kömürleşme verimi.

### 3.5.3. UV–Vis ve Floresans Deneyleri

Polimerlerde kurkumin grubunun varlığı absorbsiyon ve floresans spektroskopileri ile desteklendi. Kurkumin içeren polimerlerin absorpsiyon ve emisyon özellikleri, DMSO, DMF, Etanol, DCM ve THF çözücüleri içerisinde incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.3'te verildi. CMA ile karşılaştırıldığında kurkumin konjuge mPEG-DGN konjugatını değerlendirmek için bir UV-vis deneyi gerçekleştirildi.

CMA, incelenen tüm çözücülerde iki absorpsiyon maksimum değerine sahip olduğu görüldü; birincisi en düşük π-π* (423-433 nm arasında) ve ikincisi uzatılmış konjuge kromoforun feruloil ünitesinin π-π* geçişlerinden (448-458 nm arasında) kaynaklanmaktadır [70]. mPEG-DGN-CUR polimeri için, aynı dalga boylarında absorpsiyon geçişleri gözlemlenmektedir. Daha kısa absorpsiyon dalga boyundaki sönümlenme katsayıları, CMA ve polimer için daha uzun absorpsiyon dalga boyundaki sönümleme katsayılarından daha yüksektir.




Şekil 3.42. Polimerlere ait TGA spektrumu

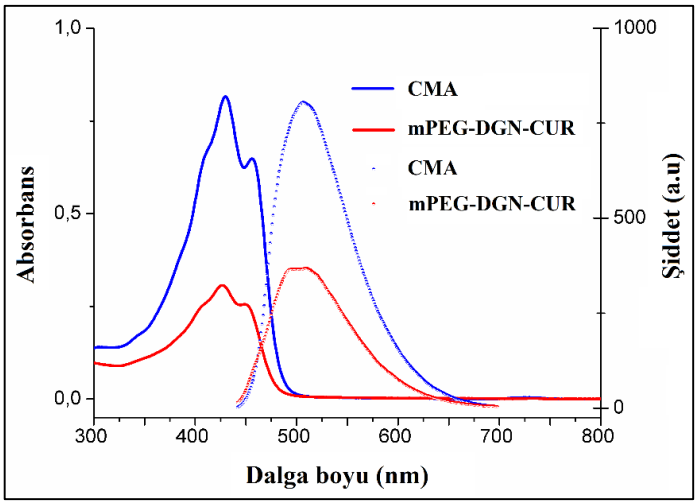
Floresans emisyonu için CMA, DMF içinde 499-517 nm arasında güçlü geniş floresans emisyon spektrumlarına sahiptir (Tablo 3.3 ve Şekil 3.43 ). Bununla birlikte, CMA ve mPEG-DGN konjuge edildiğinde, mPEG-DGN-CUR'in DMF içerisinde floresan yoğunluğunun azaldığı (Şekil 3.41) ve maksimum floresansta dar bir kırmızıya-kayma (bato-kromik) (500-520 nm) mevcut olduğu gözlenmektedir. CMA ile karşılaştırıldığında polimerik konjugatının kırmızı kayması (daha uzun dalga boyuna), polimer ve kurkumin arasındaki konjügasyonunu göstermektedir [52]. Kurkumin ve mPEG-DGN-CUR'in emisyon ve absorpsiyon spektrumları, çeşitli çözücülerde emisyon spektrumlarına ayna görüntüsü vermektedir [71]. Stokes kayması, dalga boyu skalasında düzeltilmiş spektrumlardan elde edilen absorpsiyon ve emisyon maksimumları arasındaki fark olarak hesaplandı. CMA ve mPEG-DGN-CUR polimeri için DMSO ve etanol arasındaki 20 ve 33 nm'lik kaymalarında kayda değer artışlar olduğu saptanmaktadır.

Şekil 3.44, farklı çözücüler içerisinde kaydedilen CMA ve mPEG-DGN-CUR'nin absorpsiyon ve emisyon spektrumlarını tasvir etmektedir. Absorpsiyon, çalışılan tüm çözücülerdeki görünür bölgeye iyi yayılmıştır. Tablo 3.3 farklı çözücülerde singlet geçiş enerjilerindeki değişimin temel hal türlerinin çözücü kararlılığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Kurkumin'in biri fenolik diğeri β-diketon arasındaki metilen hidrojeni olmak üzere iki asidik hidrojen türü vardır. Uyarıldığında, muhtemelen temel halde birden fazla izomerik formda bulunur ve buda absorpsiyon spektrumunun geniş olmasına ve birden fazla omuz vermesine neden olur.

Tablo 3.3. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait absorpsiyon ve emisyon değerleri

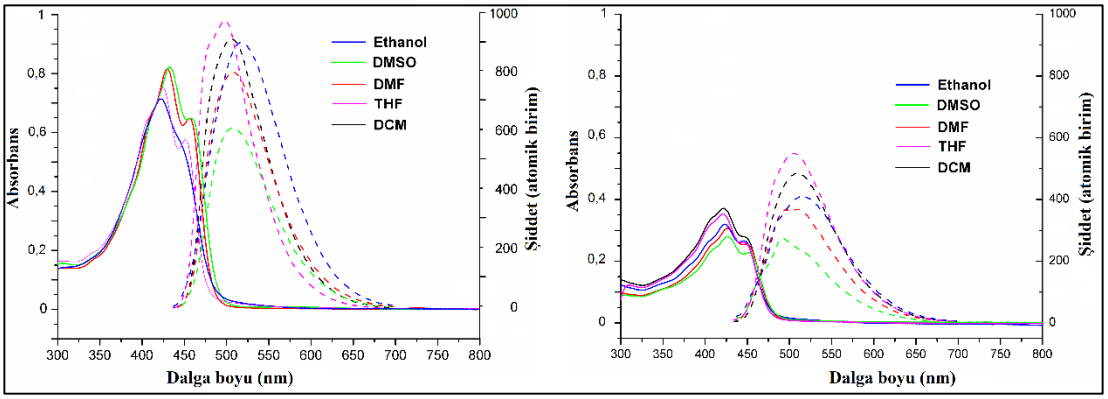
| Bileşik | Çözücü | $\lambda^{abs}{}_{max}{}^{1}$ | $\lambda^{abs}{}_{max}{}^{2}$ | $\varepsilon_{max}{}^{1}$ | $\varepsilon_{max}{}^{2}$ | $\lambda^{ems.}{}_{max}{}^{1}$ | $E_s{}^{1}$ | $\Delta\lambda$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CMA | Etanol | 423 | 448 | 70900 | 54700 | 517 | 55,2 | 94 |
| | DMSO | 433 | 458 | 82200 | 64500 | 507 | 56,3 | 74 |
| | DMF | 430 | 456 | 81300 | 63900 | 506 | 56,4 | 76 |
| | THF | 425 | 452 | 74900 | 57100 | 499 | 57,2 | 74 |
| | DCM | 427 | 453 | 76100 | 59300 | 506 | 56,4 | 79 |
| mPEG-DGN-CUR | Etanol | 423 | 446 | 33300 | 28100 | 520 | 54,9 | 97 |
| | DMSO | 427 | 451 | 27800 | 22600 | 491 | 55,1 | 64 |
| | DMF | 428 | 450 | 30500 | 25300 | 510 | 55,9 | 82 |
| | THF | 421 | 446 | 35100 | 25900 | 506 | 56,4 | 85 |
| | DCM | 422 | 446 | 37000 | 27800 | 509 | 56,1 | 87 |

Çözücü ortamına dayanarak, kurkumin'in absorbsiyon maksimimu dört farklı dalga boyu bölgesi içinde bulunmuştur: (1) Etanol, (2) THF, (3) DCM ve DMF, (4) DMSO. DMF'deki (456 nm) absorpsiyon maksimumuyla karşılaştırıldığında, DMSO'da (458 nm) CMA için zayıf bir batokromik kayma ve etanolde (448 nm) zayıf bir hipsokromik kayma gözlendi ve daha polar çözücüler için absorpsiyon maksimumunda kırmızıya kayma olduğunu düşündürdü [43,44]. Yapılan araştırmalarda, değişen çözücü sisteminin kurkuminin floresans spektrumunu hafif etkilediği saptanmaktadır [72]. Şekil 3.44'de verilen emisyon ve absorpsiyon spektrumları, çözücülere bağlı olarak emisyon maksimumlarındaki kaymayı göstermektedir. Kurkuminin maksimum floresansı, THF'de 449 nm, DMSO'da 507 nm ve etanolde 517 nm gibi polar-aprotikten polar-protik çözücülere gidildiğinde daha kısa dalga boyuna geniş bir şekilde kaydığı görülmektedir. mPEG-DGN ile birleştirildiğinde, floresan yoğunluğu azaldı ve floresan maksimumda büyük bir kırmızı veya batokromik kayma oldu.

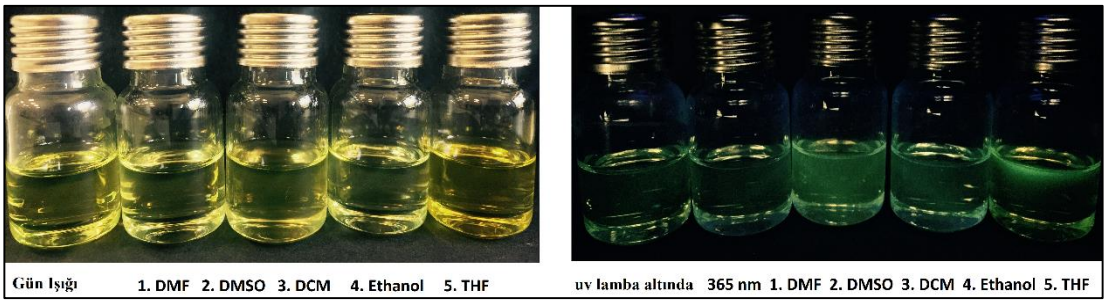



Şekil 3.43. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait absorpsiyon ve floresans spektrumu

Batokromik kayma, çözücünün artan polaritesine karşılık gelir, daha sonra çözücü ve adsorplayıcı arasındaki çekici polarizasyon kuvvetlerini arttırır. Çeşitli çözücülerde mPEG-DGN-CUR'in floresan özelliklerinin, güneş ışığı altında ve UV lambanın ışınlanması (365 nm) ile kaydedilen görseli Şekil 3.45'te verildi. Kurkumin parlak turuncu-sarı renkte kristalin görünüme sahiptir ve çözücü içinde ise kromoforun düşük π-π* geçişinden dolayı parlak sarı renkte sergiler. Kurkumin konjuge polimerin çözeltisi de π-π* uyarımı nedeniyle parlak bir sarı renk sergilemektedir; çözücüler içinde 365 nm'de n-π* geçiş gözlenmiştir. UV ışığıyla uyarıldığında, renk açık yeşil-yeşil renge dönüşür. Bu, mPEG-DGN ile bağlandığında π* orbitalinin enerji seviyesini düşüren konjügasyonun uzamasından kaynaklandığına atfedilmektedir [73]. Bu nedenle, polimerde ve kurkumin'deki elektronik uyarılma, UV ışığından daha düşük bir miktarda enerji emerek meydana gelmektedir.




Şekil 3.44. mPEG-DGN-CUR bileşiğine ait farklı çözücülerdeki absorpsiyon ve floresans spektrumu




Şekil 3.45. mPEG-DGN-CUR bileşiğine gün ışığı-uv lamba altında gösterimi

### 3.5.4. Sıvı Kristal Özellikleri

Azid fonksiyonlandırılmış diosgenin (DGN-$N_3$), mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR'un sıvı kristal yapıları polarize optik mikroskop ile incelendi. Bu çalışmada elde edilen DGN-$N_3$ (bileşik 30), mPEG-DGN ve mPEG-DGN-CUR yapılarının optik görüntülerini ve faz geçiş sıcaklıklarını gözlemlemek ve kaydetmek için ısıtıcılı bir POM cihazı kullanıldı (Şekil 3.46). POM görüntüleri, ısıtma ve soğutma döngüleri süresince DGN-$N_3$ için fan-şekilli yapı ile enantiotropik mezofaz sergilediğini göstermektedir.




Şekil 3.46. a) DGN-$N_3$, b) mPEG-DGN ve c) mPEG-DGN-CUR POM yapıları

mPEG-DGN-CUR 37 °C'nin altında belirgin mezomorfizm sergilemektedir. Sıcaklık arttıkça yelpaze şekilli doku 48-49 °C'de ortaya çıkmış ve çift kırınım 53-57 °C'de kaybolmuştur. Kısacası, mPEG-DGN, 50 °C'de katı halden sıvı kristal haline geçişi ve yaklaşık 60 °C'de sıvı kristal halden izotropik duruma geçişi göstermektedir. DSC sonuçları POM görüntülerini desteklemektedir. Aynı zamanda sıvı kristal faz geçişlerine ait tüm sıcaklık değerleri Tablo 3.4'te özetlenmektedir.

### 3.5.5. Polimerik miselin oluşumu ve karakterizasyonu

Amfifilik polimerik konjugat hidrofilik mPEG kısmı ve hidrofobik diosgenin ve kurkumin kısımlarından oluşmaktadır. Bu amfifilik yapıdan faydalanan polimerik

konjugat, sulu çözeltide polimerik misel oluşturmak için kendiliğinden birleşebilmektedir. Hazırlanan polimerik miselin partikül büyüklüğü dağılımını (PSD), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelini tespit etmek için DLS kullanıldı. Ortalama PSD ve miselin zeta potansiyeli sırasıyla yaklaşık 147,2 ± 1,6 nm ve -6,27 ± 0,24 iken ve karşılık gelen PDI'leri 0,084 ± 0,024 olarak ölçüldü (Şekil 3.47a). Polimerik misel dar boyut dağılımı ve negatif zeta potansiyeli sergiledi.

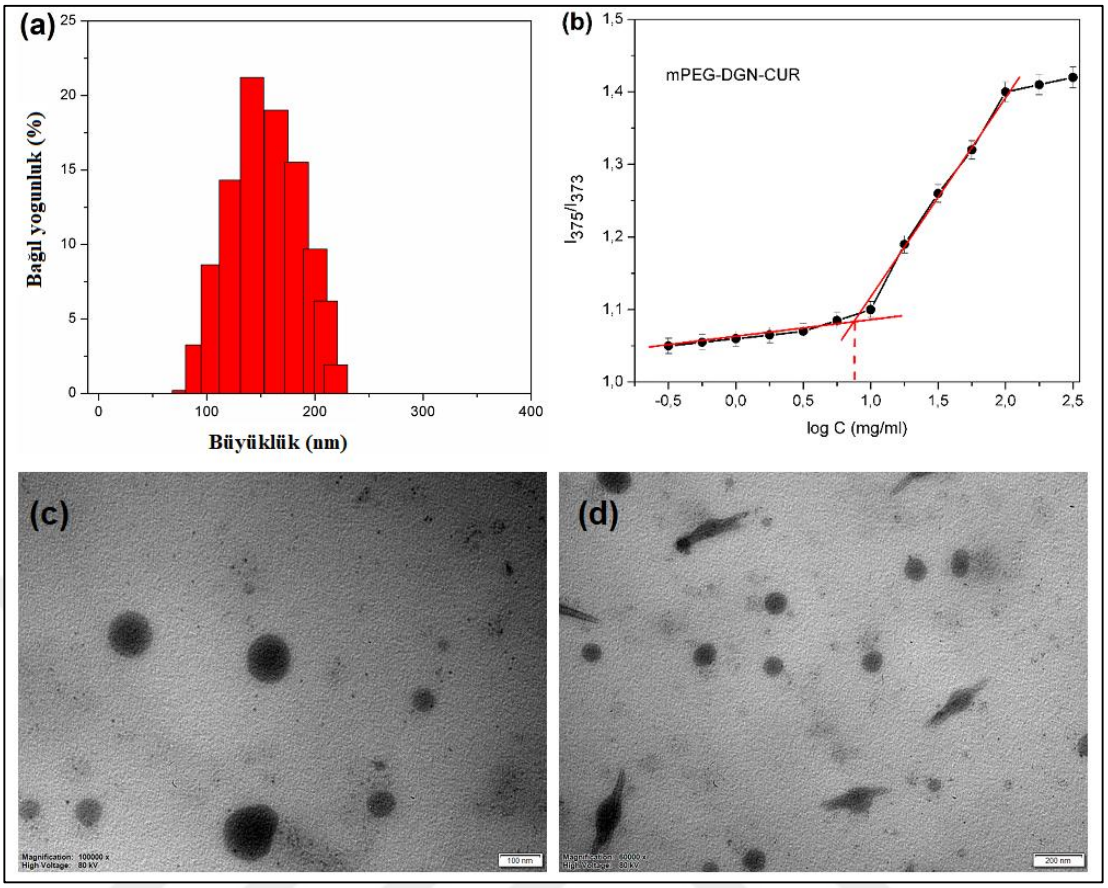
Tablo 3.4. Sıvı kristal polimerlere ait faz geçiş sıcaklıkları

| Polimerler | Faz geçiş sıcaklıkları (°C) |
|---|---|
| DGN-$N_3$ | Cr 162,5 $S_mA$ 182,0 |
| mPEG-DGN-$N_3$ | Cr 48,4 $S_mA$ 58,2 |
| mPEG-DGN-CUR | Cr 49,1 $S_mA$ 53,1 |

Cr: Kristal faz
$S_mA$: Kiral Simektik faz

Miselin morfolojisi TEM ile incelendi (Şekil 3.47c-d) ve sonuçlardan küresel olduğu ve iyi ayrılmış olduğu görüldü. Miselin partikül büyüklüğü, 100 ile 200 nm arasında DLS tarafından ölçülen hidrodinamik büyüklüğe denk gelmektedir. Misellerin dağılımının homojen olduğu, yapışma ve birleşme durumunun olmadığı görülmektedir. Ayrıca, misel, belirgin bir çekirdek/kabuk yapısını gösteren karanlık bir merkez ve aydınlık çevre sergilemektedir. Bu sonuçlar, polimerik konjugatın, kararlı ve iyi tanımlanmış bir misel halinde kendi kendine birleşebileceğini gösterdi. Ayrıca, önceki çalışmalarda benzer sonuçlar gözlemlenmiştir [8, 25]. mPEG-DGN-CUR polimerik konjugatın kendiliğinden düzenlenmesi ile misel oluşumunu doğrulamak için, CMC indeksi, piren hidrofobik prob olarak kullanılarak, floresan spektroskopisi ile belirlendi.

Emisyon şiddetleri oranının ($I_{375}/I_{373}$) polimer konsantrasyonunun logaritmik (log C) değerlerine karşı çizilen grafikte iki teğetin kesişiminin CMC değerine karşılık geldiği Şekil 3.47b'de verildi. Miselin CMC'si, 7,40 ± 0,8 mg/mL olarak belirlendi. Bu değerin standart misel oluşturucu polimer ile karşılaştırılabilir olduğu ve termodinamik olarak kararlı polimerik miselin fizyolojik koşullar altında oluştuğunu göstermektedir [74, 75]. Polimerin hidrofobik ve hidrofilik kısımlarının oranı, düşük CMC indeksine katkıda bulunan misel oluşumunun itici gücüdür. Bu çalışmada CMC değeri, diosgenin ve kurkumin'in yapısından dolayı konjugasyon sonrası miselin hidrofobikliği ile açıklanmaktadır [52].



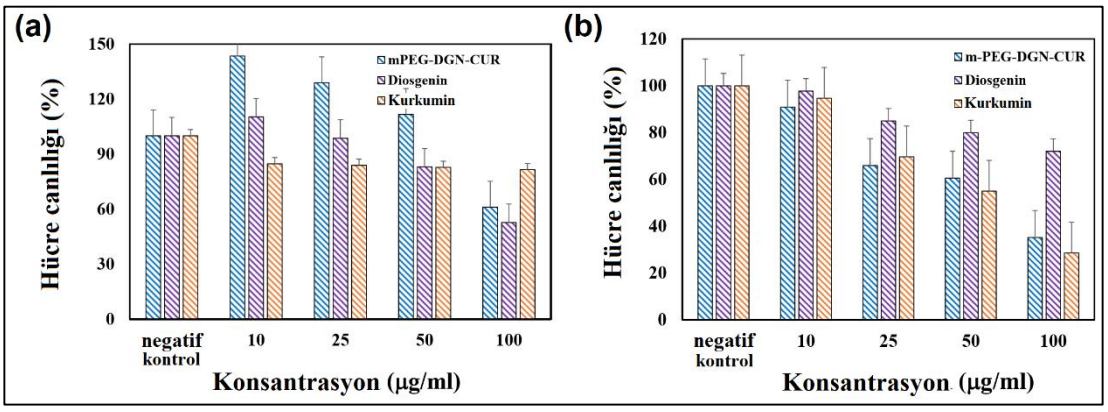

Şekil 3.47. Parçacık büyüklüğü dağılımı (a), floresan yoğunluğunun logC karşı grafiği (b) ve mPEG-DGN-CUR TEM görüntüleri (c, d)

### 3.5.6. İn vitro sitotoksisite ve anti-kanser çalışmaları

Daha önceki çalışmalarda diosgenin ve kurkumin için bazı kanser hücrelerine karşı toksik etki gösterdikleri rapor edilmiştir [76, 77]. Bu çalışmada, polimere konjuge edilmelerinin biyouyumluluk ve sitotoksisite açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. Böylece, mPEG-DGN-CUR'un insan fibroblast (L929, sağlıklı hücre) ve meme kanseri hücrelerine (MCF-7) karşı sitotoksisitesi, hücre canlılığının değerlendirilmesi ile gerçekleştirildi. Şekil 3.48, 24 saat boyunca L929 ve MCF-7 hücreleri ile inkübasyondan sonra hücre canlılığı yüzdesini göstermektedir. Hücre canlılığı, konsantrasyona bağlı olarak MTT analizi ile belirlendi. MTT analizi, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenasyon enziminin soluk sarı MTT'nin tetrazolium halkalarını parçalama ve mor renkli bir formazan kristalleri oluşturma kabiliyetine dayanmaktadır. Bu nedenle, hayatta kalan hücrelerin sayısı doğrudan oluşan formazanın seviyesi ile orantılıdır [78]. Hücreler, sırasıyla 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında mPEG-DGN-CUR ile inkübe edildi.

MTT analiz sonuçları, mPEG-DGN-CUR'un düşük konsantrasyonda L929 hücre hattında herhangi bir sitotoksisiteye sahip olmadığını açıkça göstermektedir. Bununla birlikte sitotoksisite, polimer konsantrasyonu 10 dan 100 μg/mL'ye arttığında artmaktadır (Şekil 3.48a). mPEG-DGN-CUR'un en yüksek konsantrasyonu ile inkübe edildiğinde hücre canlılığı, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücrelerin %61'inin canlı kaldığı gözlemlendi. Konsantrasyon 50 μg/mL'ye ve daha düşük seviyeye düştüğünde, mPEG-DGN-CUR için L929 canlı hücre üzerine proliferatif bir etki (hücre çoğalması) elde edildi. Canlı hücre sayısı, konsantrasyona bağlı olarak 50, 25, 10 μg/mL için sırasıyla %112, %129 ve %144 olarak ölçüldü.

Polimerik konjugatın MCF-7 hücre hatlarına karşı in vitro sitotoksisitesi, Şekil 3.48b'de gösterilmektedir. mPEG-DGN-CUR, tüm konsantrasyonlar boyunca kontrol hücresine kıyasla toksik bir etki göstermektedir. Aynı konsantrasyonda kanser hücrelerinin (MCF-7) canlılığının normal hücrelerden (L929) daha düşük olduğunu göstermektedir. Polimer konsantrasyonu arttıkça, kanser hücrelerinin canlılığı giderek azaldı. mPEG-DGN-CUR'un canlı hücre sayısı, 10 μg/mL polimer konsantrasyon içeren ortamda yaklaşık %90 iken, 100 μg/mL polimer konsantrasyonu içeren ortamda yaklaşık %35 düşmektedir. MTT analizi sonucu, polimerik konjugatın, normal L929 hücrelerine karşı iyi biyouyumluluk ve MCF-7 hücrelerine karşı toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, MCF-7'de (Şekil 3.48b) kurkumin kanser hücrelerine karşı toksik iken diosgenin kanser hücreleri için çok az toksisite gösterdi. Diosgenin ve kurkumin polimere ilave edildikten sonra bile toksik etkisini koruduğu gözlenmektedir.



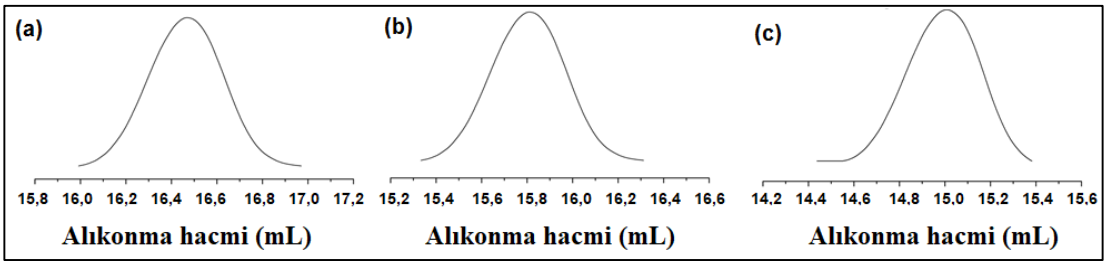

Şekil 3.48. Konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısı. (a) insan fibroblast hücreleri (L929) ve (b) meme kanseri hücreleri (MCF-7)

### 3.6. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

#### 3.6.1. Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

M-PCL-MPEG olarak belirtilen diosgenin konjuge PCL-MPEG kopolimerlerinin sentez aşaması deneysel bölümde verildi (Şekil 2.9). İlk önce, farklı kollara sahip PCL polimerleri (M-PCL), halka açılmasını başlatan hidroksil uç gruplarına sahip diosgenin ve türevlerinin varlığında ε-CL'un halka açma polimerizasyonu ile hazırlandı (Şekil 2.9a). Daha sonra hazırlanan M-PCL polimerleri esterifikasyon reaksiyonuyla MPEG-COOH ile reaksiyona sokuldu. Elde edilen kopolimerler, hidrofobik kısımlar olarak diosgenin ve PCL'dan ve hidrofilik kısım olarak MPEG'den oluşmaktadır (Şekil 2.9b). Kopolimerlerin yapısal özellikleri, Şekil 3.49'da gösterildiği gibi, $^{1}$H-NMR ve FTIR tarafından belirlendi ve değerlendirildi. Diosgenin karakteristik protonları $\delta_H$ 0,70-2,18 ppm arasındaki sinyalleri verirken $\delta_H$ 3,32; 3,44-3,49; 3,69; 4,09 ve 4,29 ppm'lerde görülen karakteristik kaymalar ise spektrumda M4 türevinin protonlarına karşılık gelmektedir (Şekil 3.49a).

PCL omurgasındaki tekrarlanan metilen ($CH_2$) gruplarının tipik sinyalleri $\delta_H$ 1,37 ppm, 1,64 ppm, 2,32 ppm ve 4,05 ppm'e karşılık gelirken; terminal metilen ($CH_2$) protonları yaklaşık $\delta_H$ 3,64 ppm'de gözlenmektedir (Şekil 3.49b). Metoksi ($OCH_3$) ve MPEG metilen ($CH_2$-$CH_2$-O) gruplarında protonların varlığı sırasıyla $\delta_H$ 3,37 ve 3,63 ppm'lerde görülmektedir (Şekil 3.49c) [79]. M4 türevinin FTIR spektrumu, 3300 (OH), 2960 (CH gerilmesi), 1459, 1382 ve 1346 (CH deformasyon) ve 1040 $cm^{-1}$ (C-O) absorpsiyon bantlarını göstermektedir. PCL ile polimerizasyondan sonra, OH absorpsiyon bandının kayboldu görülmektedir. Yeni keskin ve yoğun bantlar, sırasıyla 1720 ve 1050 $cm^{-1}$'de karboksilik ester (C=O) ve eter (C-O-C) gruplarının varlığını gösterdi. Bu absorpsiyon bantları, sırasıyla PCL ve MPEG tekrarlanan -COO- ve -$OCH_2CH_2$ birimlerinin karakteristik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. $^{1}$H-NMR ve FTIR analizi, M-PCL-MPEG kopolimerlerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir (M-PCL-MPEG kopolimerlerine ait diğer FTIR ve $^{1}$H-NMR spektrumları için ek kısmında verilmiştir). Polimerlerin $^{1}$H-NMR'dan hesaplanan ve GPC ile ölçülen moleküler ağırlıkları Tablo 3.5'te özetlendi ve teorik molekül ağrılıklarının $^{1}$H-NMR verilerindeki pik integrallerinden hesaplanan değerlerle uyum içinde olduğu görüldü.




Şekil 3.49. a) mPEG-COOH b) M4-PCL c) M4-PCL-MPEG GPC kromatogramları

GPC kromatogramlarında unimodal (tek modlu) pikler makromoleküler ağırlığın mono-dağılım olduğunu, herhangi bir homopolimer, ε-CL veya MPEG'in bulunmadığını ve polimerizasyon sırasında transesterifikasyon veya geri dönüşüm reaksiyonlarının olmadığını göstermektedir (Şekil 3.50) [80]. PCL-MPEG kopolimerlerinin moleküler ağırlıkları ve PCL/MPEG oranı, tekrarlanan MPEG birimlerindeki protonlara ($-CH_2CH_2O-$) bağlı tekrarlanan PCL birimlerindeki ($(C=O)-O-CH_2-$) karbonil gruplarına bitişik metilen protonları kullanılarak $^1$H-NMR spektrumlarından hesaplandı [81]. Tüm bu sonuçlar sentezlerin başarıyla gerçekleştiğini doğruladı.

Tablo 3.5. Sentezlenen polimerlerin moleküler ağırlık ve bozunma sıcaklıkları

| Polimer | $M_n$ (GPC)[a] (Da) | $M_n$ (NMR)[b] (Da) | PDI[a] ($M_w/M_n$) | $T_m$[c] (°C) | $T_{max}$[d] (°C) |
|---|---|---|---|---|---|
| M4-PCL | 8320 | 7420 | 1,41 | 50,46 | 305,1 |
| M1-PCL-MPEG | 15800 | 13950 | 1,53 | 52,43 | 312,6 |
| M2-PCL-MPEG | 15500 | 14580 | 1,43 | 53,68 | 319,5 |
| M3-PCL-MPEG | 15400 | 14530 | 1,35 | 53,75 | 320,5 |
| M4-PCL-MPEG | 16100 | 15300 | 1,42 | 54,86 | 328,4 |

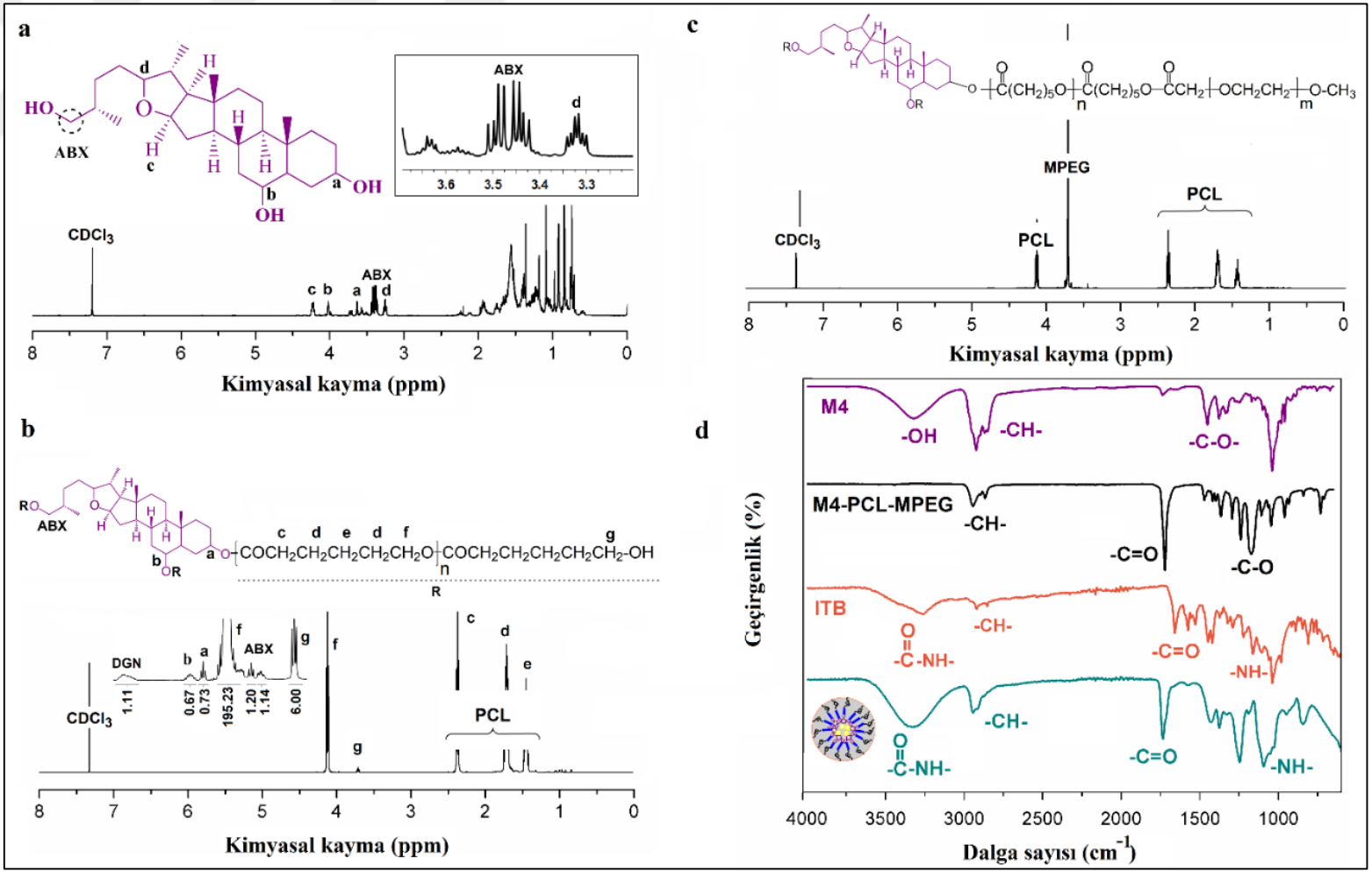
[a] Polistiren standardı kullanılarak GPC analizi ile belirlendi.
[b] $^1$H-NMR ile hesaplandı [82].
[c] Erime sıcaklığı, DSC de elde edilen teğetlerin yarısı olarak hesaplandı.
[d] Maksimum bozunma sıcaklığı, TGA ile belirlendi.

### 3.6.2. İlaç yüklü polimerik nanopartiküllerinin hazırlanması

Polimerik nanopartiküller (NP), emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. İlk olarak, NP'ler, su içinde yağ emülsiyonu ve stabilizatör olarak PVA sulu çözeltisi ile karıştırılarak elde edildi. Organik çözücünün sürekli karıştırma altında buharlaştırılmasının ardından, polimerik NP'ler elde edildi ve dondurularak kurutuldu. Hidrofilik ve hidrofobik kısımları olan amfifilik polimerler, sulu çözeltide kendiliğinden birleşebilir.

M-PCL-MPEG yapısında, M-PCL hidrofobik ve MPEG hidrofilik kısımları oluşturur bu nedenle MPEG bölümü, polimerik NP'lerin hazırlanmasını kolaylaştırır ve kandaki sistematik dolaşım süresini artırır. Model ilaç olarak kullanılan imatinib (ITB)'in NP'lere başarılı bir şekilde yüklenmesi FTIR ve DSC/TGA teknikleriyle doğrulandı. İlaca ait FTIR spektrumunda, karakteristik pikler 3270 (NH amid), 2940 (C-H), 1660 (C=O), 1550 (C-N üçlü), 1340 (C=N), 1220 (C-O) ve 1030 (N-H) $cm^{-1}$'de görülmektedir (Şekil 3.49d). İlacın NP'e yüklenmesinden sonra FTIR spektrumda ilacın karakteristik pikleri görülmeye devam etmektedir. Polimer zincirindeki (PCL) karbonil grupları ile ITB'deki amin grupları arasında hidrojen bağları oluşmaktadır. Bu spektrumlardaki değişiklikler 3200-2800 $cm^{-1}$ ve 1300-1000 $cm^{-1}$'de gözlenmektedir. ITB'de 3270 $cm^{-1}$'de ikincil amino grubunun orta şiddette gözlenen absorpsiyon bandı, NP'ye yüklendiğinde amid grubunun (-NH-CO-) karbonil gerilmesi olarak yoğun şiddette 3340 $cm^{-1}$'kaymıştır. Güçlü hidrojen bağları veya hidrofilik-hidrofobik etkileşimlerle kompleks oluşumunun olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar, ilacın polimerik NP'lerin içine alındığını göstermektedir.

M4-PCL, M4-PCL-MPEG kopolimeri, serbest ITB ve M4-ITB-NP'ye karşılık gelen DSC termogramları Şekil 3.51a'da görülmektedir. M4-PCL ve M4-PCL-MPEG, kristal PCL kısımlarının erimesinin bir göstergesi olan 54,60 ve 56,80 ° C'de endotermik bir pik vermektedir. M4-PCL-MPEG'in endotermik piki ($T_m$= 54,86 °C) MPEG ve PCL bloklarının iki birleşmiş pikini içermektedir [83]. ITB'ye ait termogramda 226,40 °C'de gözlenen endotermik pikin M4-ITB-NP için düşük sıcaklığa kaydığı gözlenmektedir. Bu kaymanın nedeni, nanopartikül içindeki ITB'nin, polimer matrisinde amorf ya da moleküler dispersiyon durumunda düzensiz kristaller halinde olduğu sonucuna bağlanmaktadır. Bu sonuç, daha önce bildirilen verilerle de örtüşmektedir [84, 85]. Kopolimer ve nanopartikülün termal kararlılıkları, TGA tekniği kullanılarak incelendi (Şekil 3.52b). M4-PCL-MPEG kopolimeri ve M4-ITB-NP için maksimum bozunma sıcaklıkları ($T_{max}$), 328 °C ve 445 °C'de iki aşamalı kayıp olarak gözlendi, ilki PCL bloğunun ve ikincisi MPEG bloğunun termal bozunma sıcaklıklarına bağlanmaktadır.




Şekil 3.50. M4 (a), M4-PCL (b), M4-PCL-MPEG $^{1}$H-NMR ve M4, M4-PCL-MPEG, ilaç ve ilaç yüklü nanopartiküllerin FTIR (d) spektrumlar

### 3.6.3. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli

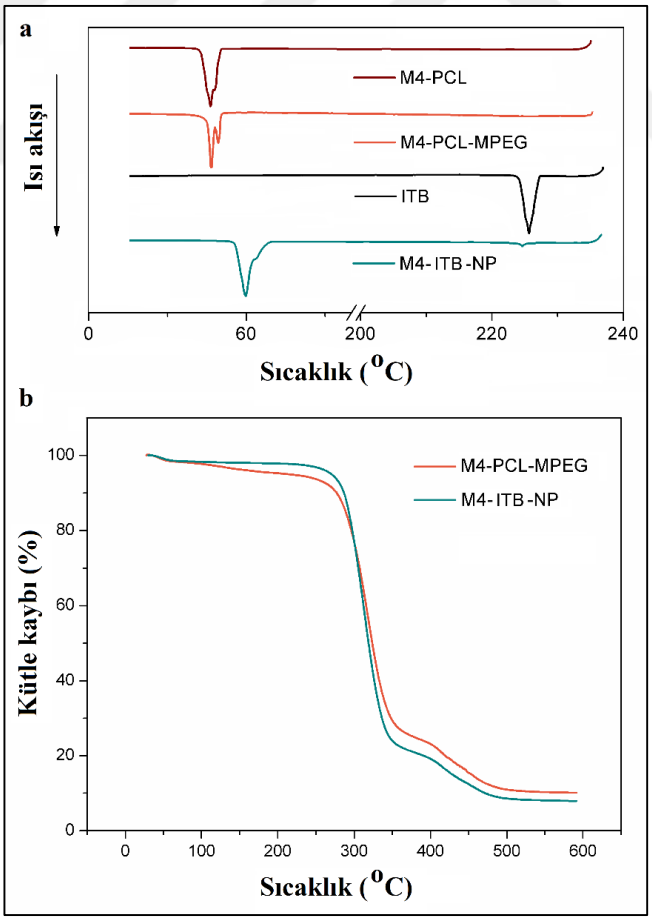
Çalışmayı optimize etmek amacıyla NP'ler üzerinde çeşitli parametrelerin etkisi partikül büyüklüğü dağılımı (PSD) ve polidispersite indeksi (PDI) açısından değerlendirildi. NP'ler, DLS tekniği kullanılarak boyut ve zeta (ζ) potansiyeli ile karakterize edildi. Partikül büyüklüğü ve PDI üzerindeki çeşitli parametrelerin etkisi Şekil 3.52'de gösterilmektedir. NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü 94-270 nm arasında, ζ potansiyel nötrlüğe yakın ve NP'lerin yüzeyinde bulunan negatif yükleri bloke eden MPEG zincirlerinin varlığını doğrulayan dar bir PDI (<0,16) sahip oldukları görülmektedir [86]. Elde edilen sonuçlar, NP'lerin su içinde mono dağılım gösterdikleri ve kararlı olduklarını gösterdi. Daha küçük PSD ve daha dar PDI için en uygun şartlar; organik fazda polimer konsantrasyonu 8 mg/mL, sulu faz/organik faz oranı 5:1 ve PVA konsantrasyonu %1 olarak belirlendi. Öte yandan, M4-PCL-MPEG, 84 nm ortalama partikül boyutuna ve 0,183 PDI değerine sahip en uygun numune olarak belirlendi.

#### 3.6.3.1. Çalışma parametrelerinin partikül büyüklüğüne etkisi

Organik fazdaki polimer konsantrasyonu: Organik fazın hacmini (2,5 mL) sabit tutarak, artan polimer konsantrasyonunun hazırlanan NP'lerin partikül boyutuna etkisi araştırıldı. Şekil 3.52a'da gösterildiği gibi, artan polimer konsantrasyonu (10-30 mg), partikül boyutunda kademeli bir artışa neden olmaktadır [87]. Polimerin daha yüksek konsantrasyonu, emülsiyon oluşumu sırasında damlacık kırılma kuvvetlerine yüksek direnç sağlayan ve böylece daha büyük parçacıklar oluşturan daha viskoz bir çözelti verir [79]. Ayrıca, artan polimer konsantrasyonu nedeniyle partikül boyutundaki artış, ilaç molekülünün organik fazdan sulu faza difüzyon direncini arttırır, böylece NP'lerde daha fazla ilaç tutulur. Polimer içindeki ilaç içeriği arttıkça, ilacın sulu faz difüzyonu azalır [88]. Sulu faz / organik faz oranı: Bir emülsiyonun iç ve dış fazları arasındaki oran kararlılık açısından büyük önem taşımaktadır ve dağılmış partiküllerin boyutunu etkilemektedir. Sulu faz/organik faz oranının 9:1'den 5:1'e ayarlandığında, partikül boyutunun azaldığı gözlendi. Sulu faz/organik faz oranında 5:1'den 2:1'e getirildiğinde ise partikül boyutunda artış meydana geldi (Şekil 3.52b). Bu artış, emülsiyonun artan viskozitesinden kaynaklanabilir ve artan viskozitenin,

damlacıkların eklenmesinde ayırma kuvvetine karşı yüksek bir direnç oluşturduğu düşünülebilir [89].

PVA konsantrasyonu: Damlacıkların emülsiyonu ve kararlılığı, emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde iki önemli faktördür. PVA miktarı önemli bir rol oynar, çünkü damlacıkların birleşmesine direnç gösterme eğilimindedir. Küçük nano damlacıklar geniş bir yüzey alanına sahiptir ve bu nedenle emülsiyonu kararlı hale getirmek için daha fazla yüzey aktif madde gerektirir. Bu çalışmada emülgatör olarak PVA kullanıldı ve sulu fazdaki PVA konsantrasyonu 0,5; 1,0 ve 1,5 (g/100 mL) olarak çalışıldı. PVA % 0,5 konsantrasyonda kullanıldığında emülsiyonun kararlı olmadığı görüldü. Daha önceki çalışmalara benzer olarak, birkaç saatlik emülsifikasyondan sonra, birleşme oluşumundan kaynaklanan bir faz ayrılması meydana geldi [88]. Düşük stabilizatör konsantrasyonu, NP'lerin stabilizasyonu için yeterli değildi ve partikül boyutu, beklendiği gibi artan PVA konsantrasyonuyla azaldı.




Şekil 3.51. M4-PCL ve M4-PCL-MPEG'nin DSC ve TGA termogramları

### 3.6.3.2. İlaç yüklü NP'lerin partikül büyüklüğü, boyut dağılımı ve zeta potansiyeli

Partikül büyüklüğü biyolojik aktiviteyi, toksisiteyi, hedefleme kabiliyetini ve hücresel alım verimliliğini düzenlediği için önemli bir parametredir. ITB yüklü NP'lerin partikül büyüklüğü, polidispersitesi ve zeta potansiyeli DLS ile belirlendi ve formülasyonlar Tablo 3.6'da özetlendi. Şekil 3.52d'de gösterilen ITB yüklü NP'lerin parçacık büyüklüğü dağılım spektrumu, mono-dağılmış NP'lerin, 94-270 nm aralığında ortalama hidrodinamik çapa ve dar PDI (0,08-0,10) değerlerine sahip olduğu göstermektedir. PCL (M-ITB-NP) içeren NP'lerin partikül büyüklüğü, muhtemelen daha yüksek esnek ve hidrofilik olan MPEG zincirlerinin bulunmaması nedeniyle PCL-MPEG NP'lerinkinden çok daha büyüktür. Zeta potansiyeli, formülasyonun yüzey yükünü yansıttığı ve genellikle parçacıkların toplanma davranışını kontrol etmek için kullanıldığı için NP'lerin kararlılığını belirleyen bir başka faktördür [90]. M-ITB-NP ve M1-ITB-NP'in zeta potansiyelleri -0,58 ve -0,20 mV iken, diğer ITB yüklü NP'lerinki +0,05 ile +0,45 mV arasında pozitif bir yük göstermiştir. Zeta potansiyeli artan MPEG zincirleri ile arttığı görülmektedir [91]. Ek olarak, NP'lere ITB yüklemesinin zeta potansiyeli üzerinde etkisi yoktur, çünkü ITB temel olarak nanopartikül çekirdeğinde ($\zeta_{ITB}$=−9,4 mV) dağılmaktadır [92].

Tablo 3.6. Formüller ve ITB yüklü NP'lerin DLS sonuçları

| Polimer | NP | İlaç yüklü NP | Partikül boyutu | PDI | ζ (mV) |
|---|---|---|---|---|---|
| M4-PCL | M-NP | M-ITB-NP | 266,9±3,4 | 0,084 | −0,58 |
| M1-PCL-MPEG | M1-NP | M1-ITB-NP | 153,9±2,6 | 0,100 | −0,20 |
| M2-PCL-MPEG | M2-NP | M2-ITB-NP | 150,4±3,1 | 0,101 | +0,05 |
| M3-PCL-MPEG | M3-NP | M3-ITB-NP | 94,5±2,7 | 0,160 | +0,21 |
| M4-PCL-MPEG | M4-NP | M4-ITB-NP | 137,4±2,1 | 0,095 | +0,45 |

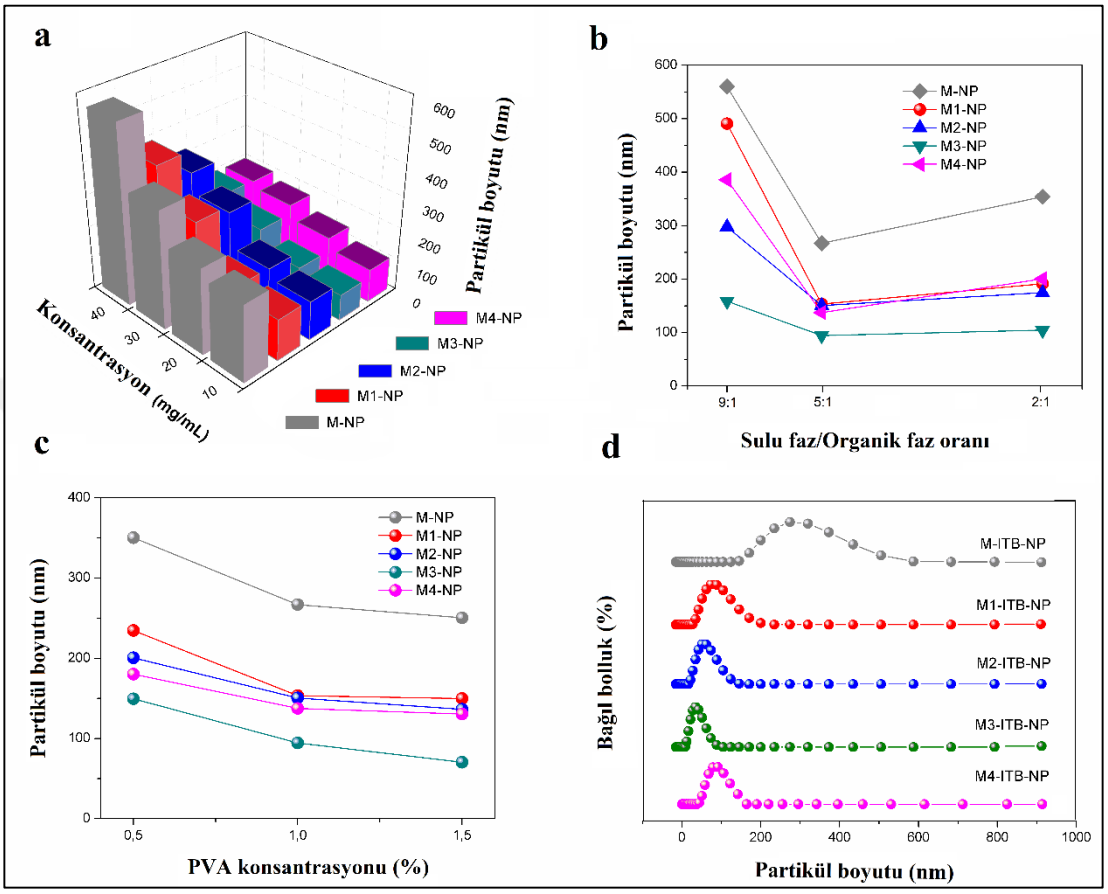
Sonuçlar ortalama ± standart sapma, n = 3 olarak verilmiştir.

### 3.6.4. Nanopartiküllerin yüzey karakterizasyonu ve stabilitesi

### 3.6.4.1. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi

TEM görüntüleri ve ilaç yüklü NP'lerin süspansiyonunun görünümü Şekil 3.53'te gösterilmektedir. Şekil 3.53a-c'de görüldüğü gibi, NP'ler küresel şekil ve homojen partikül boyutunda pürüzsüz bir yapı sergilemektedirler. TEM ile ölçülen partikül büyüklüğü (yaklaşık 130 nm) DLS tarafından belirlenen (137,4 ± 2,1 nm) ile uyum içinde olduğu görülmektedir. DLS tarafından ölçülen partikül boyutu hidrodinamik

çapı temsil ederken, TEM ile elde edilen ise su buharlaşmasından sonra kuru NP'lerin büyüklüğüyle ilgilidir. Düzgün ve pürüzsüz yüzey, çözücünün NP'lerden tamamen uzaklaştırılmasını yansıtmaktadır [93].

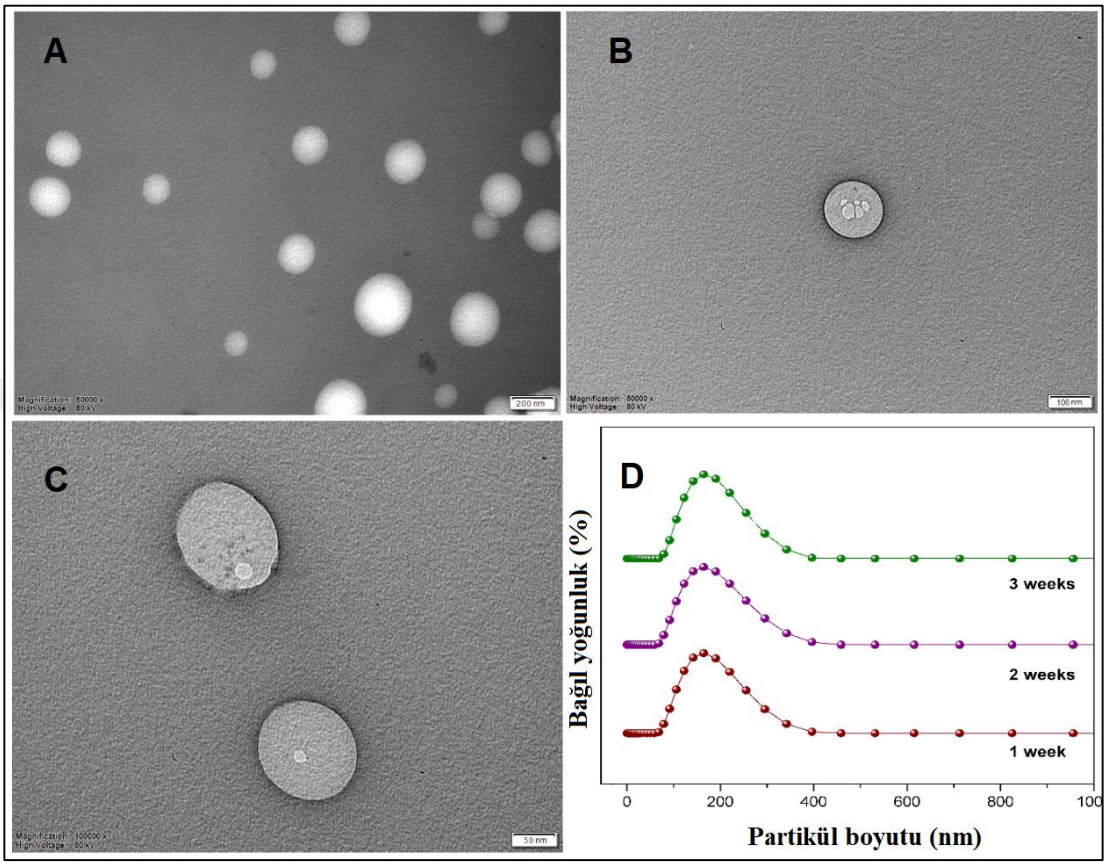



Şekil 3.52. a) DCM fazındaki polimer konsantrasyonu (2,5 mL), b) Sulu faz/Organik faz oranı (%), c) PVA konsantrasyonu (%), d) ITB yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu

### 3.6.4.2. Nanopartiküllerin kararlılığı

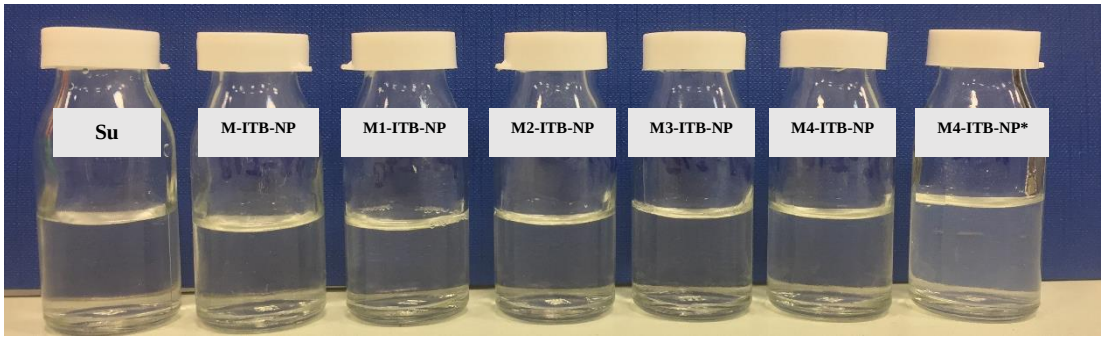
İlaç yüklü NP'lerin kararlılığı, 30 günlük bir süre boyunca oda sıcaklığında PBS çözeltisinde birleşmeye karşı direnci belirleyerek izlendi. Şekil 3.53d'de gösterildiği gibi, M4-ITB-NP'nin partikül büyüklüğü, yaklaşık 160 nm'lik bir ortalama çapa ulaştı. Hidrofilik MPEG zincirlerinin varlığının bir sonucu olarak, NP'lerin sulu durumda termodinamik kararlılığını gösteren gözlemlenebilir birleşme olmamıştır. Hazırlanan NP çözeltilerinin şeffaf görünümü, ilaç yüklü NP'lerin 30 gün sonra kararlı ve homojen olduğunu göstermektedir (Şekil 3.54). Dahası, ilaç yüklü NP'lerin kararlılığı, boyut değişimini değerlendirmek için farklı PBS (pH: 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5) çözeltilerinde ölçülerek değerlendirildi. İlaç yüklü NP'ler 37 °C'de 24 saat inkübe

edildi ve NP'lerin değişen pH çözeltilerinde oldukça kararlı oldukları bulundu (Tablo 3.7). pH 6,5-7,5 arasında ortalama partikül boyutunda anlamlı bir değişiklik görülmezken, pH 3,5-5,5 arasında boyutta küçük bir artış gözlendi.




Şekil 3.53. A) M4-NP B) M4-ITB-NP (200 büyütme) C) M4-ITB-NP (100 büyütme) TEM görüntüleri D) M4-ITB-NP'nin partikül büyüklüğü kararlılığı

Bu durum daha önce rapor edildiği gibi nispeten zayıf asidik durumda hidrolizi daha hızlı ancak nötr ortamda kararlı olduğunu göstermektedir [9]. Ayrıca, ITB yüklü NP'lerin gastrointestinal kanaldaki kararlılığını kontrol etmek için, parçacık büyüklüğü biyolojik ortamlara simüle edilmiş farklı ortamlarda inkübasyonundan sonra ölçüldü. Sonuçlar, partikül boyutlarının 0,1 N HCI'de (mide) 2 saat ve FaSSIF'de (bağırsak) 6 saat inkübasyondan sonra sabit olduğunu göstermektedir [94].




Şekil 3.54. Nanopartiküllerin 30 gün sonra görüntüsü (*dondurularak kurutma sonra)

Tablo 3.7. 24 saat sonra nanopartiküllerin çeşitli pH'larda stabilitesi

| Başlangıç pH değerleri | ITB-yüklü NP (son pH değerleri/ortalama partikül boyutu (nm)) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | M-ITB-NP | M1-ITB-NP | M2-ITB-NP | M3-ITB-NP | M4-ITB-NP |
| 3,5-4,5 | 3,48-4,63 | 3,59-4,56 | 3,54-4,83 | 3,52-4,65 | 3,93-4,82 |
| | 265-269 | 151-153 | 150-152 | 90-92 | 130-136 |
| 5,5-6,5 | 5,99-7,09 | 6,01-74,8 | 6,35-7,79 | 7,73-7,17 | 6,35-7,89 |
| | 261-279 | 158-173 | 158-168 | 100-105 | 139-180 |
| 7,5-8,5 | 7,80-8,75 | 8,03-8,57 | 8,06-9,00 | 8,05-9,30 | 8,65-8,93 |
| | 282-269 | 177-151 | 172-150 | 111-100 | 183-170 |
| 0,1 N HCl | 260±1,4 | 155±1,3 | 149±1,2 | 94±0,6 | 135±1,6 |
| FaSSIF | 280±2,2 | 180±1,4 | 165±1,6 | 100±2,0 | 175±2,2 |

### 3.6.5. İlaç yükleme ve nanopartiküllerin kapsülleme etkinliği

İlaç yükleme ve kapsülleme etkinliği antikanser ilaçların etkinliğini artırmak ve klinik uygulamalarını doğrulamak için önemli parametrelerdir. Yüklenen ITB miktarları, 265 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden belirlendi. ITB yüklü NP'lerin kapsülleme verimliliği (EE) ve ilaç yükleme (DL) yüzdesi, deneysel bölümünde verilen denklemler kullanılarak hesaplandı ve Tablo 3.8'de özetlendi. Sonuçlardan, NP'lerin EE% ve DL% sırasıyla %61-86 ve %10-14 arasında değişmektedir. Daha önce rapor edilen ITB yüklü NP'ler için benzer sonuçlar elde edildi [92, 95]. PCL-MPEG zincirlerinin artmasıyla EE% ve DL% değerlerinin artma eğiliminde olduğu görülmektedir. M3-ITB-NP ve M4-ITB-NP için maksimum EE% ve DL% elde edildi. Bir hidrofobik PCL zinciri ve bir hidrofilik MPEG zincirine sahip amfifilik PCL-MPEG kopolimerlerden hazırlanan NP'ler belirli miktarda ilacı hidrojen bağları veya hidrofobik-hidrofilik etkileşimle içine hapsetmektedir veya kapsamaktadır. M4-ITB-NP'deki ilaç EE% ve DL%'sinin artması hidrofobik PCL zincirinin diğer NP'lerden yüksek olmasına, ayrıca hidrofilik MPEG kabuğu ve su arasındaki etkileşim ile ilacın

suda çözünür hale getirilmesine bağlanmaktadır. Yüksek DL ve EE değerleri, ITB yüklü NP'lerin, ITB ve PCL bloğu arasındaki iyi etkileşim nedeniyle olabilecek ITB taşımı için uygun olduğunu göstermektedir [96].

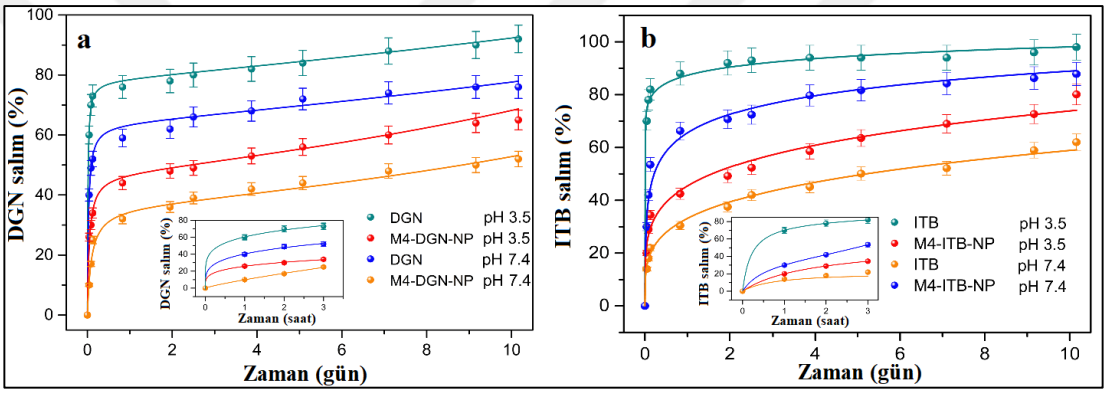
Tablo 3.8. Nanopartiküllerin kapsülleme verimliliği ve ilaç yükleme yüzdesi

| Formül | Kapsülleme verimliliği (%) | İlaç yükleme (%) |
|---|---|---|
| M-ITB-NP | 61,63 | 10,10 |
| M1-ITB-NP | 67,29 | 11,03 |
| M2-ITB-NP | 68,62 | 11,25 |
| M3-ITB-NP | 71,06 | 11,64 |
| M4-ITB-NP | 86,54 | 14,18 |

### 3.6.6. İn vitro ilaç salım çalışmaları

Hazırlanan NP'lerin ilaç salım davranışları, biyolojik sıvılara simüle edilmiş tampon çözeltilerde in vitro olarak incelendi. NP'lerin simüle edilmiş pH'lara maruz bırakılmasının etkileri in vivo olarak doğrudan doğrulanmamasına rağmen, ilaç salımı üzerinde gözlenen in vitro etkileri en azından testten önce bu ortamlara maruz kalma hakkında bilgi verebilir. NP'lerden ITB ve DGN salım davranışı pH 3,5'te (kanserli hücreler için asidik ortam) ve pH = 7,4'te (fizyolojik plazmanın pH'ı) incelendi [97]. Serbest ilaçların ve ilaç yüklü NP'lerin PBS içindeki (asidik pH=3,5 ve nötr pH=7,4) 37 °C'lik bir sıcaklıkta in vitro salım davranışları, Şekil 3.55'de (M4 NP ve diğer NP'ler için ekte) gösterilmektedir (Şekil 3.55 için her nokta, n tane deneyin ± standard sapma (n=3) ortalama değerini temsil eder). Serbest ilaçlar için ilk 3 saatte hızlı bir salım olduğu, ardından ilaçların serbest bırakılmasının giderek arttığı ve 24 saat içinde hemen hemen tüm serbest ilaçların pH değişiminden bağımsız olarak salındığı gözlenmektedir. Bu, ilaçların diyaliz zarı boyunca serbestçe yayılabileceğini göstermiştir. Diğer yandan, NP'lerden ilaçların salımı, serbest bırakılma süreci iki fazlı bir durumu resmetmektedir. Birinci fazda, ilk 3 saat içinde hızlı bir salım, ikinci fazda ilaçların salım hızının yavaşladığı ve sürekli bir salıma ulaştığı gözlenmektedir. Bu ilk hızlı salımın yüzeye bağlı ilacın salımına atfedilebileceğine inanılırken, yavaş ve sürekli salım NP'lerde sıkışan ilacın difüzyonuna bağlı olabilir [98]. M4-NP'den asidik ve nötr pH'ta (3,5 ve 7,4) hızlı bir salımla DGN serbest bırakıldı (Şekil 3.55a). M4-NP'lerden DGN salım miktarı pH 3,5 ve pH 7,4 için sırasıyla yaklaşık %30 ve %19 olarak hesaplandı. Şekil 3.55b'de görüldüğü gibi, M4-ITB-NP'lerden salınan ITB yüzdesi, pH değeri 3,5'ten 7,4'e yükselirken (pH 3,5= %35 ve pH 7,4= %22)

azaldı. Hidroliz ve ilaç difüzyonu, polimerik NP'lerin yapısal özelliklerine bağlanabilir [86]. Her iki ilacın da pH 3,5'te NP'lerden daha hızlı salınması, asidik ortamda ester bağının hidrolize olarak bozunmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, 3 saat sonra M4-NP'lerin DGN ve ITB salımları diğer NP'lerinkinden önemli ölçüde daha düşüktür. M4-NP'deki hidrofobik ester zincirlerinin sayısı diğer NP'lerde olduğundan daha fazla olduğu için hidrolizinin daha yavaş olduğu ve ilaçların daha yavaş salımına neden olduğu söylenebilir [80, 84]. Ek olarak, polimer zincirlerinindeki sterik engelinin ilacın serbest bırakılmasında da etkili olabileceği yorumlanabilir. Diosgenin ile başlatılan farklı polimerik kolların oluşturduğu sterik alanın ilacın daha yavaş salınması ile sonuçlandığı görülmektedir.




Şekil 3.55. M4-DGN ve ITB yüklü M4-DGN NP'lerin 37 °C'de PBS'de ilaç salım profilleri (a: DGN ve b: ITB)

On günlük bir inkübasyondan sonra, salımı olan DGN ve ITB miktarları, sürekli bir salım fazına ulaştı (pH=3,5 ve pH=7,4 için sırasıyla, DGN %65-73 ve %52-71, ITB %79-81 ve %62-86). DGN'nin salımı, ITB'den daha yavaştı. Bunun nedeni, DGN'nin, polimer omurgasına bir ester bağı ile konjuge edilmiş olmasıdır, oysa ITB, hidrofobik etkileşimle NP'lerin içinde kapsüllenmiştir [29]. Bu sonuçlar, ilaçların asidik ve nötr ortamlarda yavaş difüzyon mekanizmasıyla sürekli ve kontrollü salımını göstermektedir.

### 3.6.7. İn vitro sitotoksisite çalışmaları

Hücre canlılığı analizleri, NP'lerin biyouyumluluk ve antikanser aktivitesini değerlendirmek ve potansiyellerini doğrudan serbest ilaçlar ile karşılaştırmak için yapıldı. Şekil 3.56, L929 sağlıklı insan fibroblast, MCF-7 insan meme kanseri, SAOS-2 insan osteosarkomu ve K562 insan lösemi hücreleri için farklı DGN/ITB

konsantrasyonlarına sahip NP'lerin in vitro sitotoksik etkisini göstermektedir. Burada, aynı nanopartikül sistemindeki iki terapötik ilacın kombinasyon etkisini göstermek için bir çift ilaç olarak ITB ve DGN kullanılmıştır. M4-NP ve ilaç yüklü NP'lerin hiçbir konsantrasyonda sağlıklı insan fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkisi olmadığı aksine hücre büyümesi gösterdiği ve biyomedikal uygulamalar için NP'lerin güvenirliğini göstermektedir (Şekil 3.56 ve ekler kısmı). Daha önceden rapor edilen ITB ve DGN yüklü NP çalışmalarında sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkileri olmadığını gösteren benzer sonuçlar elde edilmiştir [29, 92].

Bununla birlikte, M4-NP ve ilaç yüklü NP'ler, farklı kanser hücre hatlarına karşı potansiyel sitotoksik etkiler göstermiştir. Sonuçlar, NP'lerin sitotoksik etkisinin, artan ilaç konsantrasyonları ile önemli ölçüde arttığını yansıtmaktadır. Daha yüksek ilaç konsantrasyonunun daha düşük hücre canlılığına neden olduğunu anlaşılmaktadır. İlaç konjuge ve ilaç kapsüllenmiş NP'leri, serbest ilaçlara kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda kanser hücrelerine karşı daha yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca ilaç kapsüllenmemiş olan M4-NP'nin kanser hücrelerine karşı serbest ITB'den daha yüksek bir sitotoksik etki gösterdiği fark edildi. Bu, önceki çalışmada tarif edildiği gibi ester bağının hidroliz olmasıyla DGN'nin nanopartikülden salımından kaynaklanmaktadır [25]. Hem serbest ilaçlara hem de M4-NP'ye kıyasla M4-ITB-NP'nin arttırılmış etkinliği ve daha yüksek toksik etkisi, ilaç kombinasyonunun NP'lerde sinerjistik etkisini arttırmasıyla ilgili olabilir [29]. Ayrıca, bu değerlendirmenin sonuçları, M4-ITB-NP'nin daha yüksek sitotoksisitesine olan olası katkının, sürekli ilaç salım profili ve hücre yıkımında artmaya neden olduğunu göstermiştir [91, 99]. Şekil 3.56b-d'de gözlendiği gibi, ITB yüklü NP'ler karşılaştırılabilir sitotoksisite göstermektedir. M4-ITB-NP, kısmen fazla polimerik zincir koluna sahip, her kanser hücresi için biraz daha yüksek sitotoksisite sergilemektedir.

Ancak bu formülasyonlar arasında önemli bir fark gözlenmedi. Ayrıca, hücre canlılığının ilaç salım çalışmaları ile benzer bir davranış gösterdiği sonucuna varıldı. (P değerleri ek bölümünde ANOVA ile belirlendi ve P değerlerinin $<0.05$ olması, verilerin %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu düşünülmektedir).

Tekli ilaçların ve kombine ilaçların NP'lerdeki yarı maksimal inhibisyon konsantrasyon ($IC_{50}$) değerleri de sitotoksisite eğrilerinden hesaplandı ve Tablo 3.9'da listelendi. $IC_{50}$ değerleri düşük NP konsantrasyonlarının kanser hücrelerine karşı serbest ilaçlardan daha toksik olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ilaçlar arasındaki ilişkiyi araştırmak için her kanser hücresi için kombinasyon indeksi (CI) değerleri analiz edildi. NP'lerde DGN ve ITB'nin CI değerleri, MCF-7, SAOS-2 ve K562 için sırasıyla 0,30; 0,41 ve 0,64 olarak hesaplandı. Daha önce rapor edilen çalışmadan, CI değerinin 1'den daha küçük, 1'e eşit ve 1'den büyük olmasının, sırasıyla sinerjik, eşit katkı ve antagonizm (zıt) etki gösterdiği anlamına geldiği bilinmektedir [100]. NP'lere yüklenen iki antikanser ilacı DGN ve ITB kombinasyonunun sinerjik etki gösterdiği görülmektedir. Kısacası, DGN ve ITB'nin birlikte kullanımı, her bir ilacın $IC_{50}$ değerlerini azaltırken, NP'lerin ilaç etkinliğini büyük ölçüde arttırmaktadır. Ayrıca, CI değerlerinden MCF-7 hücre çizgisinin M4-ITB-NP'ye daha duyarlı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Tablo 3.9. İn vitro sitotoksisite analizi ($IC_{50}$, μg/mL)

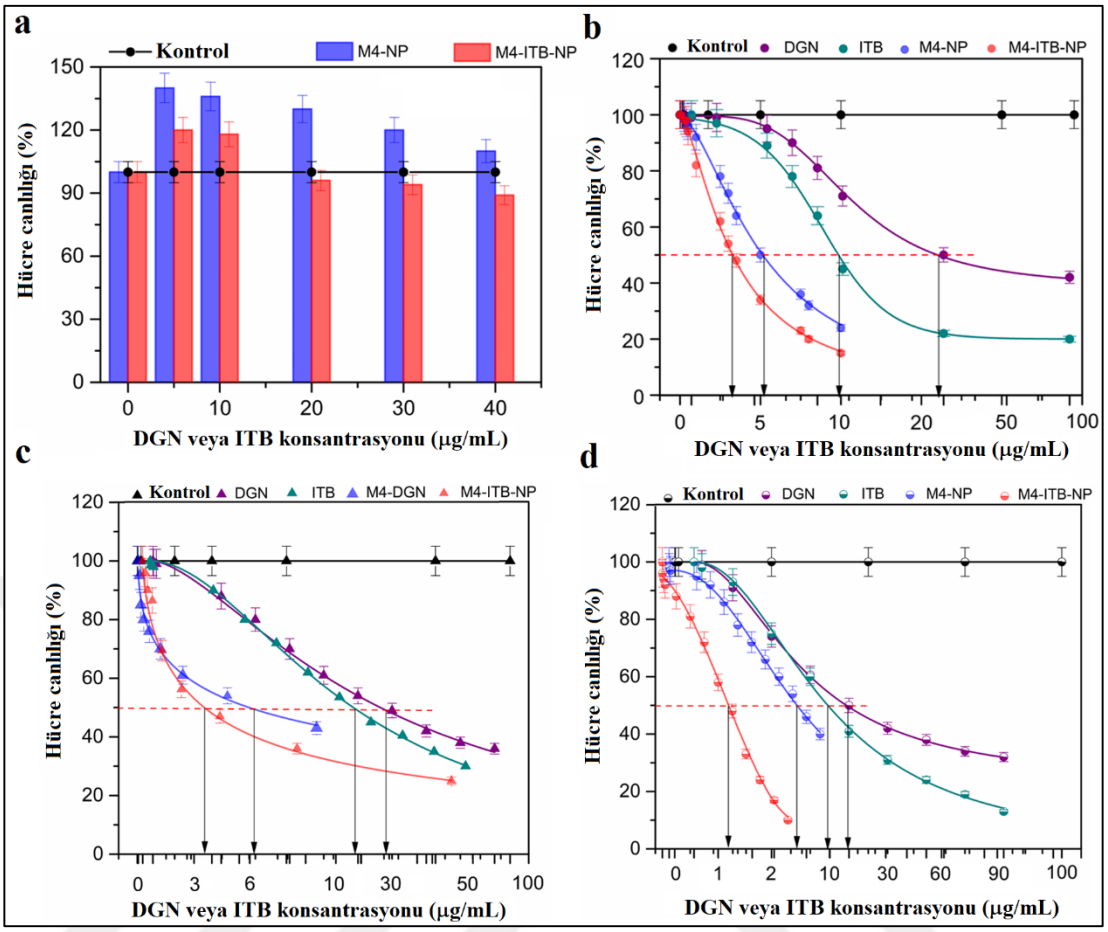
| Formülasyon | MCF-7 | SAOS-2 | K562 |
|---|---|---|---|
| ITB | 11,6 | 12,5 | 9,25 |
| DGN | 20,1 | 39,2 | 19,8 |
| M4-NP | 1,08 | 6,18 | 3,64 |
| M4-ITB-NP | 0,65 | 3,20 | 2,36 |
| CI | 0,30 | 0,41 | 0,64 |

## 3.7. Pickering Emülsiyonlarının Hazırlanması

### 3.7.1. Emülsiyon hazırlanması ve optimizasyonu

#### 3.7.1.1. Nanoemülsiyonların formülasyonu

Nanoemülsiyonların (NE) hazırlanmasında, NE'lerin kararlılığını etkileyen yağ/sulu faz oranı ve sıcaklık gibi bazı faktörler vardır. Yüksek enerjili emülsiyonla NE'lerin hazırlanmasında yağ içeriği olarak jojoba yağı kullanıldı. Jojoba yağı, çöl bitkisi jojoba (Simmondsia Chinensis) tohumlarından elde edilen kararlı, oldukça lipofilik, toksik olmayan "yağlı" bir malzemedir [101]. Tween 80, o/w tipi NE'lerin stabilizasyonu ve oluşumu için iyonik olmayan bir yüzey aktif madde olarak seçildi. NE'lerin formülasyonu için değişkenler Tablo 3.10'da verildi.




Şekil 3.56. Farklı DGN ve ITB konsantrasyonları ile ITB, DGN, M4-NP ve M4-ITB-NP ile muamele edilmiş L929 hücrelerinin (a), MCF-7 (b), SAOS-2 (c) ve K562 (d) hücrelerinin hücre canlılığı (n=3, hata çubukları standart sapmayı temsil eder, farklı zaman noktalarındaki değerler arasında anlamlı fark yoktur ($P < 0.05$)).

Sıcaklık ve yağ/yüzey aktif madde oranı gibi değişkenler sabit olarak belirlendi. Birinci aşamada, o/w tipi emülsiyon için gerekli hidrofilik-lipofilik denge (HLB) üçlü faz diyagramı ile belirlendi (Şekil 3.57a). Genellikle, o/w emülsiyonları hazırlamak için HLB değerleri 8-20 arasında seçilmektedir [102]. Tween 80, üçlü faz diyagramının oluşturulmasında 15,0'lik HLB değerine sahiptir. O/W emülsiyon fazı bölgesinin, sulu faz ile yağ fazı arasındaki düşük yüzey geriliminden kaynaklanan sütlü bir görünüme sahip olduğu görsel bir gözlem ile belirlendi [103]. Daha sonra NE'ler, artan yağ içeriği oranı ağırlıkça %10, 20 ve 30 olarak formüle edildi ve NE'lerin damlacık büyüklüğü üzerindeki etkileri incelendi. Şekil 3.57b'de gösterildiği gibi, ortalama damlacık boyu, NE formülasyonları için yağ viskozitesindeki artış ile hafifçe artmıştır. Hazırlanan NE'ler için yaklaşık 147 nm'lik ortalama damlacıkların

boyutunu sağlayan ağırlıkça %10 yağ içeriği uygun bulundu. Daha fazla kararlılık testi ve Pickering emülsiyonlarının hazırlanması ile çalışmaya devam edildi.

Tablo 3.10. NE'lerin formülasyonu için deneysel çalışmalar

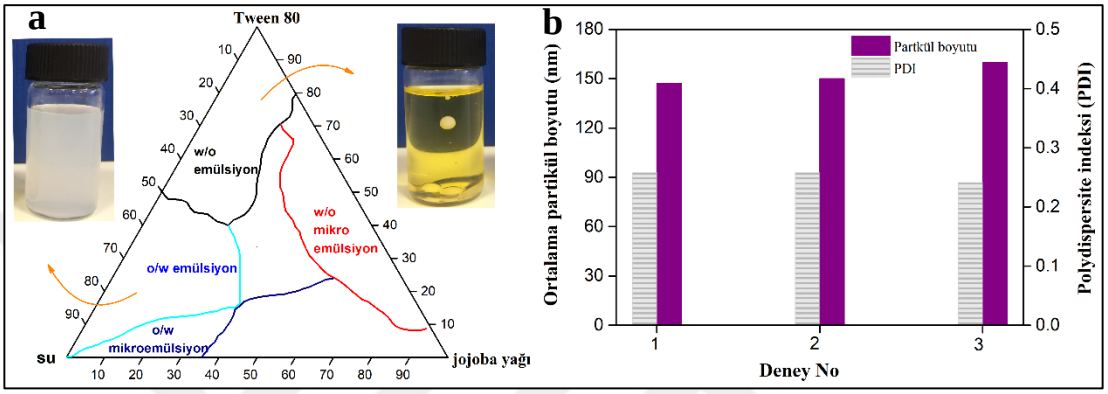
| No | Deneysel faktörler | | | | Cevap | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tween 80 (wt%) | Jojoba yağı (wt%) | Yağ fazı sıcaklığı (°C) | Sulu faz (wt%) | Ort. damlacık boyutu (nm) | PDI |
| 1 | 4 | 6 | 40 | 90 | 147±6,3 | 0,258 |
| 2 | 8 | 12 | 40 | 80 | 149±7,4 | 0,258 |
| 3 | 12 | 18 | 40 | 70 | 159±5,4 | 0,241 |

### 3.7.1.2. PE sistemlerinin hazırlanması

İlk olarak, PE sistemini formüle etmek için nanoselüloz (NS) ve aljinat (ALG) modifikasyonu yapıldı. DGN-ALG, DCC kullanılarak bir esterleştirme reaksiyonu ile sentezlendi. Yaklaşık olarak, sodyum aljinat üzerindeki sodyum karboksilat gruplarının (-COONa) yarısı, Şekil 3.58a'da gösterilen diosgenin hidroksil grupları (-OH) tarafından DCC varlığında esterlendi. Diğer tarafta NS katyonik reaksiyonu iki aşamada gerçekleştirildi: (1) trimetilamonyum klorit gruplarının nanoselülozun aktive edilmiş hidroksil grupları ile nükleofilik yerdeğiştirmesi, (2) kuaternize nanoselüloz (Q-NS) elde etmek için EPTAC'ın epoksi kısmına eklenmesi (Şekil 3.58b). Trimetilamonyum klorürün NS üzerine eklenmesi elementel analizle belirlendi. Yer değiştirme derecesine (DS) karşılık gelen oldukça yüksek bir içerikle başarılı olduğu doğrulandı.

Çok katmanlı emülsiyonlar, damlacıkların etrafında bir ara yüzey membranı oluşturan yüklü polimerik maddelerden oluşan sulu fazda dağılmış küçük yağ damlacıklarından meydana gelir. Çok katmanlı PE'lerin üretimi, yağ fazının Q-NS'un sulu süspansiyonuna dağılmasıyla gerçekleştirildi. Böylece birincil PE sistemi oluşturuldu. Elde edilen birincil PE daha sonra, DGN-ALG'nin zıt yüklenmiş polielektrolit çözeltisinin sulu fazında dağıtıldı ve ikincil PE sistemi oluşturuldu (Şekil 3.58c). Daha önce rapor edildiği gibi uygun fizikokimyasal özelliklere sahip kararlı ve çok katmanlı emülsiyon sistemlerinin hazırlanması, emülgatör ve biyopolimerlerin uygun bir kombinasyonunu gerektirir [104]. Bu nedenle, emülsiyonlaştırıcı ve emülsiyon sisteminde kullanılan her bir biyopolimerik malzeme arasındaki pH'ın bir fonksiyonu olarak elektriksel yük davranışı, en yüksek emülsiyonlaştırıcı-biyopolimer

elektrostatik çekiciliği belirlemek için değerlendirildi. Kararlı çok katmanlı PE'lerin hazırlanmasına izin verecek şekilde çözelti pH'ı 8-9 arasında uygun değer olarak seçildi. Bu durum, seçilen pH'ta meydana gelen kuvvetli elektrostatik çekime atfedilmektedir ve sulu fazda dağılan katyonik Q-NS ve anyonik DGN-ALG partiküllerinin çok katmanlı bir düzenek oluşturarak yağ damlacıklarına adsorpsiyonunu desteklemektedir [59].

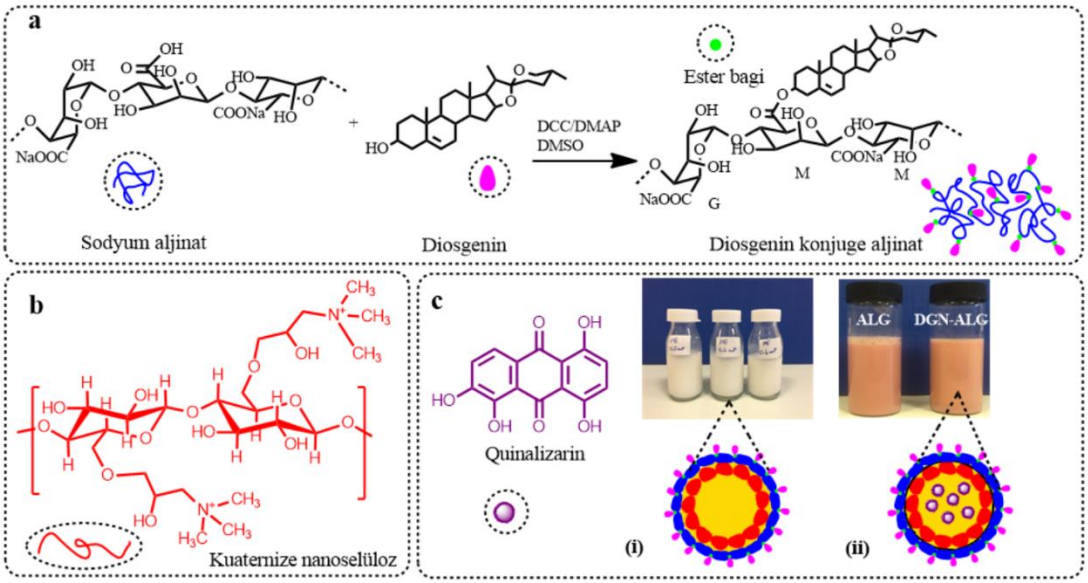



Şekil 3.57. (a) Üçlü faz diyagramı, b) NE'lerin damlacık boyut dağılımı

### 3.7.2. Emülsiyon kararlılığının değerlendirilmesi

Genellikle o/w tipi emülsiyon ürünleri pH, elektrolit konsantrasyonu ve endüstriyel üretim sırasında karşılaşılan ısıl işlem gibi temel parametrik faktörlerin etkileri açısından analiz edilir. Bu durum emülsiyon kararlılığını etkileyen parametrelerinin anlaşılmasını kolaylaştırır.

Bu nedenle, iyonik kuvvet, ısıl işlem, depolama süresi ve biyopolimerik konsantrasyon gibi faktörlerin formüle edilen PE'ler üzerindeki olası etkileri açısından inceleme yapıldı. Deneme öncesi araştırmalara göre, incelenen tüm parametrik faktörler için nihai ortam olarak PBS (pH 7,4) çözeltisi kullanıldı.




Şekil 3.58. DGN-ALG (a), Q-NS (b) ve yüklü olmayan (i) ve yüklü (ii) ilaç emülsiyonu için çok katmanlı PE'lerin şematik gösterimi (c)

### 3.7.2.1. İyonik kuvvet

NaCl konsantrasyonunun (0 ile 100 mmol/L) hazırlanan çok katmanlı PE sistemlerinin kararlılığı üzerindeki etkisi test edildi. Şekil 3.59a, NaCl'nin varlığında ve yokluğunda, emülsiyonların ortalama damlacık boyutlarının, çalışılan tüm tuz konsantrasyonları için 112 ile 114 nm aralığında yaklaşık olarak sabit kaldığını göstermektedir. Bu, damlacıkların toplanmaya karşı stabilitesini artıran, zayıf elektrostatik itişe yol açan, damlacıklar üzerinde üretilen nispeten düşük net yüke bağlanabilir. Emülsiyon damlacıkları içindeki çekici kuvvetlerin (hidrofobik, van der waals kuvvetleri gibi) çalışma alanı için oluşturulan itici etkileşimlerin üstesinden gelmek için yeterince yüksek olduğunu belirtmektedir [105].

### 3.7.2.2. Depolama süresi

Çok katmanlı stabilize edilmiş PE'lerin 30 günlük bir süre boyunca oda sıcaklığında (25 °C) saklanmasının, ortalama damlacık büyüklüğü üzerindeki etkisi ve farklı zaman aralıklarında ölçülen damlacık çapları Şekil 3.59b verildi. Kolloidal sistemdeki boyutsal yeniden düzenlemeler nedeniyle belirli bir süre boyunca damlacık büyüklüğü dağılımında önemli bir değişiklik göstermezlerse emülsiyonlar kararlı olarak adlandırılır, böylece birleşme veya birikmeye karşı kararlılık gösterirler [106]. Mevcut formülasyondaki emülsiyon damlacıklarının, artan depolama süresi ile birlikte

ortalama damlacık büyüklüğünde 118 ile 114 nm arasında bir miktar azalma meydana geldiğini göstermiştir. Genel olarak, ortalama damlacık büyüklüğündeki ilk günden 1 aylık süreye kadar olan değişme, Q-NS ve DGN-ALG'nin ara yüzler arası çok katmanlı adsorpsiyonuna bağlı olarak, anlamlı olmayan bir değişim gösterdi. Bu durum ayrıca, polielektrolit partikülleri arasındaki elektrostatik etkileşime bağlı olarak iyi 3D düzenlenmesinin oluşumuna da bağlanmaktadır.

#### 3.7.2.3. Isıl işlem

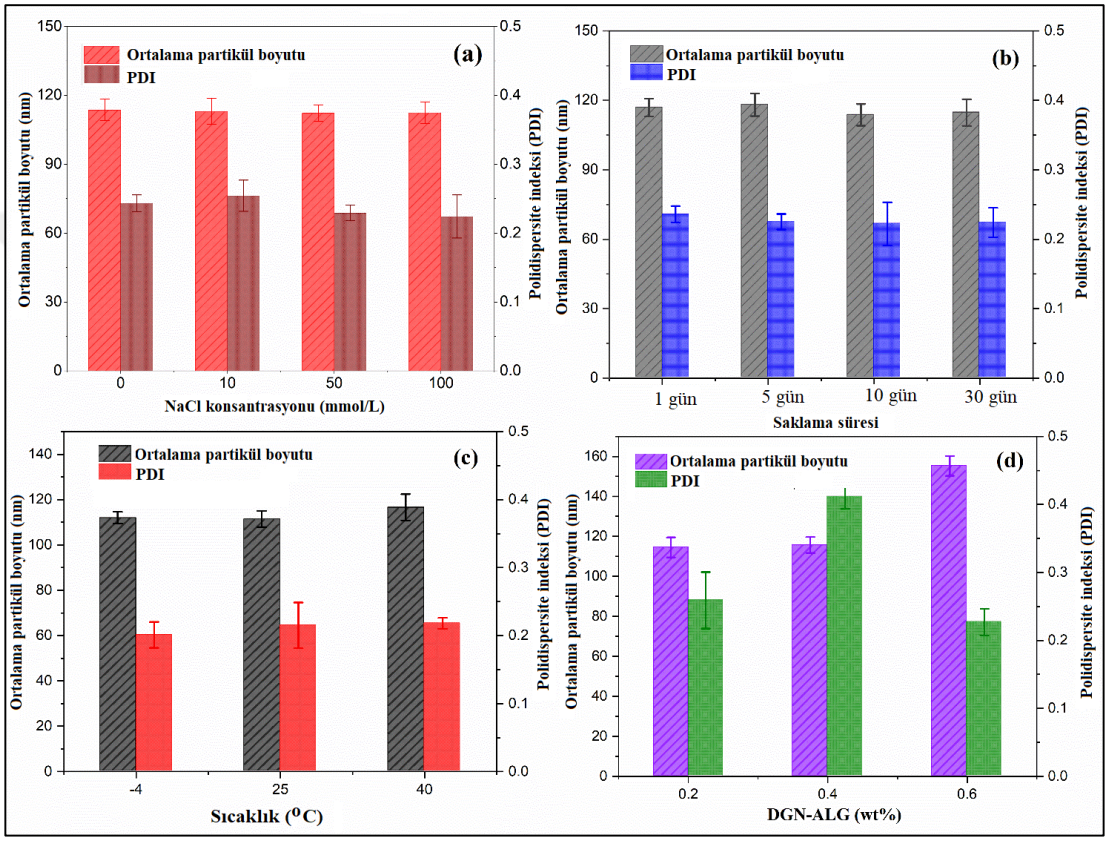
Hazırlanan çok katmanlı PE'lerin kararlılığı ayrıca analizlerden önce 24 saatlik bir süre içinde -4 ve 40 ° C arasındaki değişen sıcaklıklarda depolandı ve değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, PE sistemlerinin, Şekil 3.59c'de gösterildiği gibi artan sıcaklıkla birlikte 111 ile 116 nm ortalama damlacık boyutunda hafif bir artışla, değerlendirilen tüm sıcaklıklara karşı kararlı olduğunu gösterdi. Genel olarak, sonuçlar, ara yüzey katmanlarının bileşiminin, hafif soğutma veya ısıtma işleminden etkilenmediğini göstermektedir. Bazı gıda emülsiyonları üretim, depolama ve pastörizasyon veya sterilizasyon gibi uygulama sırasında çeşitli ısıl işlemlerden geçer. Bu nedenle, bir emülsiyonun, bu gibi ısıl işlem basamaklarına, topaklanma, bozulma veya birleşme olmadan dayanıklı özelliklere sahip olması hayati önem taşımaktadır [107].

#### 3.7.2.4. Biyopolimer konsantrasyonu

Anyonik biyopolimer (DGN-ALG) konsantrasyonunun polielektrolit PE sistemlerinin kararlılığı üzerindeki etkisi incelendi. Temelde, bu değerlendirme, Q-NS stabilize damlacıkları çevresinde iyi bir kaplama oluşturmak için gereken en uygun anyonik biyopolimer miktarını belirlemek için yapıldı. o/w emülsiyonları, tabaka-tabaka yaklaşımı izlenerek formüle edildi. Nanoselüloz miktarının değişimi ile yapılan araştırmalar, tek tabakalı stabilizasyon için optimum konsantrasyon olarak ağırlıkça %0,2 olarak belirlenmiştir. İkincil stabilizasyon katmanının oluşumu için anyonik biyopolimerin konsantrasyonu ise yapılan diğer değerlendirmeler ile incelendi.

Şekil 3.59d, anyonik biyopolimer konsantrasyonunda değişiklik yaparak elde edilen sonuçları göstermektedir. Gözlendiği gibi, ortalama damlacık boyu, DGN-ALG konsantrasyonunun artmasıyla arttı. Bu durum anyonik biyopolimerin kattığı artan

negatif yük konsantrasyonuna bağlandı. Anyonik aljinat biyopolimeri, Q-NS stabilize emülsiyon damlacıklarının ara yüzey tabakası üzerine elektrostatik etkileşim yoluyla daha fazla adsorpsiyona neden oldu. Bu ara yüzey adsorpsiyon işlemi, oluşan emülsiyon damlacıklarının pozitif yük yüzeyini yavaşça değiştirdi. Bu nedenle, bu çalışmada tüm PE formülasyonları, ikincil PE stabilizasyon tabakası için ağırlıkça %0,6 DGN-ALG kullanılarak hazırlandı.




Şekil 3.59. (a) NaCl konsantrasyonu, (b) saklama süresi, (c) ısıl işlem ve (d) anyonik biyopolimer konsantrasyonunun formüle edilen PE'ler ve damlacık büyüklüğü dağılımı üzerindeki etkisi

### 3.7.3. İlacın yüklenmesi ve kapsülasyonun belirlenmesi

Potansiyel bir kazein kinaz II (CK2) inhibitörü olarak quinalizarin, kanser tedavisi için güçlü bir ilaç görevi görme eğilimindedir, ancak bu ilacın zayıf suda çözünürlüğü ve kararsızlığı nedeniyle ilaç taşınımı alanında sınırlı uygulamaları vardır.

İlaç, katyonik modifiye edilmiş nanoselüloza yüklendi ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanımını kolaylaştırmak ve salımını sürdürmek için anyonik aljinat ile daha da kararlı hale getirildi. İlaç yüklemesi, 490-495 nm dalga boyu bölgesinde

quinalizarin'in karakteristik absorbansını gösteren UV/vis absorbans spektrumları ile belirlendi. PE sistemlerinde kapsüllenen quinalizarin miktarı, PE-ALG ve PE-DGN-ALG için sırasıyla 0,532 mg/mL ve 0,620 mg/mL olarak belirlendi. PE sistemlerinin kapsülleme etkisinin yüzdesi (% EE), PE-ALG için %53 ve PE-DGN-ALG için %62 olarak hesaplandı. Genel olarak, çok katmanlı PE damlacıkları üzerinde hidroksil ve karboksil grupları gibi fonksiyonel grupların varlığı, hidrojen bağları sayesinde ilacın emülsiyon sistemi ile etkileşimlerini arttırmaktadır. Bununla birlikte, PE-DGN-ALG için % EE'nin daha yüksek olması, diosgenin'in kimyasal özelliklerine (hidrofobik yapı) bağlanabilir. DGN'nin kovalent bağlanma yoluyla ALG'ye bağlandığı DGN-ALG, makromoleküler yapıya amfifilik karakter kazandırdı. ALG hidrofilik biyopolimer ve DGN ise hidrofobik biyolojik molekül olduğundan, bu çok katmanlı PE damlacıkları için yoğun bir dış katman oluşturabilir. İlacın PE-DGN-ALG sistemlerine yüklenmesi PE-ALG ile karşılaştırıldığında daha gömülü, enkapsüle ve kararlı olduğu sonucuna varıldı. Daha önce rapor edilen çalışmalar, konjuge ALG'lerin çok katmanlı mikrosferler ve amfifiik çekirdek-kabuk mikropartiküllerinin hazırlanmasında kullanılması, yüksek bağlama etkinliği ve ilaç yüklemesi sergilemesini bildirilmektedir [108, 109].

### 3.7.4. Karakterizasyon teknikleri

#### 3.7.4.1. Bulanıklık ve CAC analizi

Hazırlanan NE ve PE'lerin optik özellikleri, emülsiyonun bulanıklığı 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak analiz edildi. Bunun için emülsiyon bulanıklığı yağ fazı oranı seyreltilerek ayarlandı. Seyreltilmiş NE ve PE'lerin bulanıklığını, bütün NE (30/70, 20/80, 10/90) numuneleri için absorbans ve yağ içeriği arasında doğrusal bir ilişki içerecek şekilde cihazda belirlendi. Grafiğinin eğiminden hesaplanan bulanıklığın, hazırlanan NE'ler için yağ fazı içeriğindeki azalma ile değişmediği görüldü (Şekil 3.60a). Daha önceki çalışmada, bir emülsiyonun "berrak" olarak sınıflandırılması için bulanıklık değerinin $<0,05\ cm^{-1}$ olması gerektiği bildirilmiştir [60].

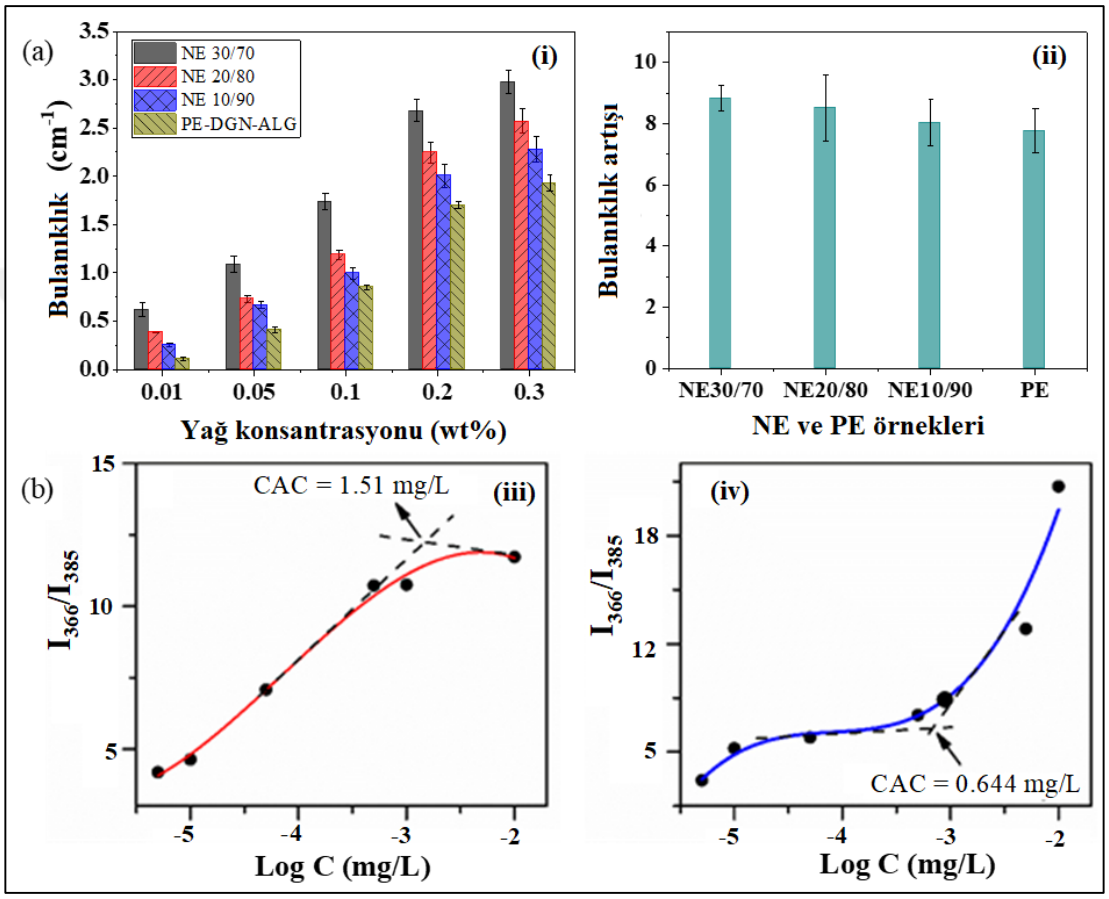
Emülsiyon damlacıklarının teorik hesaplamaları üzerine yapılan bir başka çalışmada, bulanıklık artışının emülsiyon damlacık boyu ile doğrudan orantılı olduğunu göstermiştir [110]. NE'lerin aksine, incelenen PE sistemleri en düşük bulanıklık ve bulanıklık artış değerleri göstermektedir. Partikül stabilizasyonuyla elde edilen emülsiyonların birleşmeye karşı olan dirençlerinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Kritik toplanma konsantrasyonu (CAC), toplanmanın amfifilik moleküller arasında başladığı belirli minimum konsantrasyonu tanımlar. CAC değeri, PE'lerin kararlılığını ilaç taşıma ajanları olarak değerlendirmek için önemli bir parametredir. Çok katmanlı PE'lerin CAC'sı, piren kullanılarak floresans spektroskopisi ile belirlendi. Piren, özellikle agregaların iç hidrofobik çekirdeğini çözündürmek için kullanılan hidrofobik floresan probtur [111]. PE'lerin CAC değerlerini bulmak için, floresan emisyon spektrumunda elde edilen 366 nm'deki pik şiddetinin 373 nm'dekine oranı ($I_{366}/I_{373}$) ile PE'lerin logaritmik konsantrasyonuna (logC) karşı grafik çizildi (Şekil 3.60b). CAC değerleri, iki doğrunun kesişiminden hesaplandı. PE-ALG ve PE-DGN-ALG için CAC değerleri sırasıyla 1,51 ve 0,64 mg/mL olarak bulundu. PE-DGN-ALG'nin CAC değerinin daha küçük olması DGN'nin ALG'ye konjugasyonunun PE'lerin toplanma-oluşum kabiliyeti üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu durum sulu çözeltideki PE-DGN-ALG agregatlarını kontrol eden aşağıdaki etkileşimlerden kaynaklanabilir: (i) diosgenin grupları arasındaki hidrofobik etkileşim; (ii) su molekülleri ve hidrofilik sodyum aljinat omurgaları arasında oluşan hidrojen bağı ve (iii) anyonik karboksilat grubu arasındaki elektrostatik itme etkileşimi [112]. ALG ile konjuge hidrofobik grupların varlığının, sterik engelin bir sonucu olarak sistemlerin CAC değerlerini düşürdüğü daha önceki çalışmalar ile desteklenmiştir [57, 113].

### 3.7.4.2. Kremleşme indeksi analizi

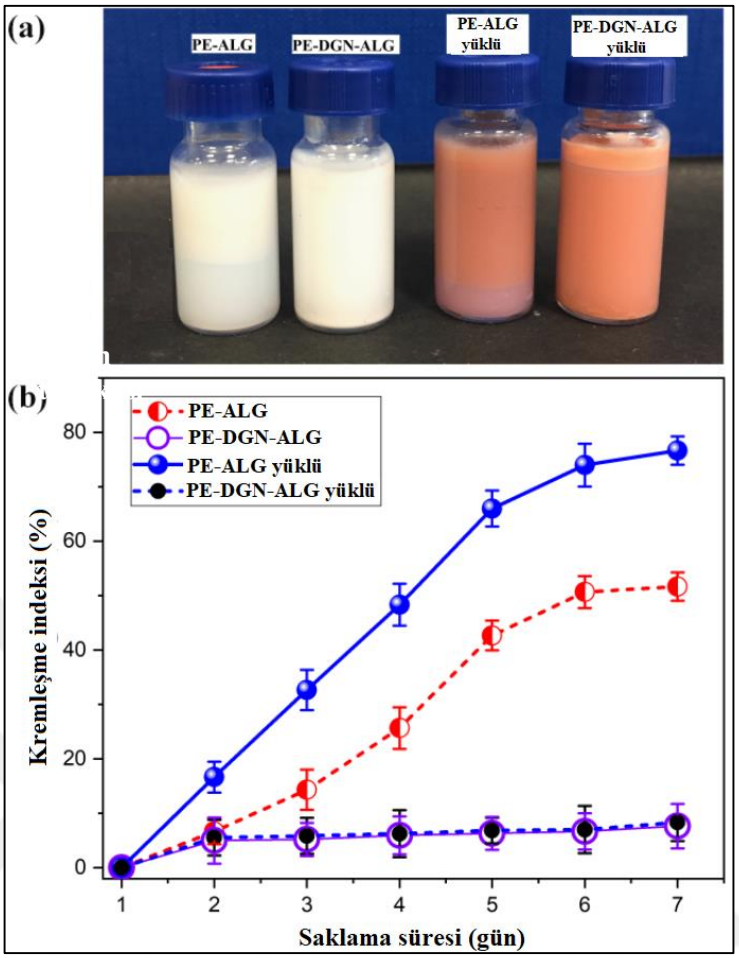
Tipik olarak, Pickering stabilizatörlerinin altında yatan temel faktörler, katı parçacıkların yağ-su arayüzlerindeki ıslanabilirliği ve üretilen emülsiyon tipi ile ilgilidir. İlaç yüklü olan ve olmayan ALG ve DGN-ALG stabilize PE'lerin fiziksel görünümü, Şekil 3.61a'da gösterilmektedir. 7 gün boyunca sürekli izlemeden sonra, krem katmanının oluştuğu ve faz ayrımının meydana geldiği görülmektedir. PE-ALG'nin emülsiyon faz hacmi, PE-DGN-ALG'ninkine kıyasla daha azdır.

Bu durum, ALG ve DGN-ALG stabilize edilmiş sistemlerden oluşturulan emülsiyon damlacıklarının büyüklüğü ile ilişkili olabilir. Ek olarak, kremsi katman oluşumu ve faz ayrılması, yağ ve su fazı arasındaki yoğunluk farkına bağlanabilir [114]. PE sistemlerinin kremleşme indeksi hesaplandı ve zamanın bir fonksiyonu olarak arttığı gözlendi (Şekil 3.61b).




Şekil 3.60. (a) (i) bulanıklık ölçümleri ve (ii) formüle edilmiş NE ve PE'ler için bulanıklık artışları, (b) (iii) PE-ALG ve (iv) PE-ALG-DGN için logC'ye karşı şiddet oranı ($I_{366}/I_{385}$)

PE-DGN-ALG, 7 günlük saklama süresi boyunca kremleşme indeksinde önemli bir değişiklik göstermedi, PE-ALG ile karşılaştırmalı olarak 6 günlük izlemeden sonra krem indeksi kademeli olarak kararlı hale geldi. Bu durum, DGN-ALG'nin çok katmanlı PE sistemine ikinci bir stabilizasyon katmanı olarak dahil edilmesinin, jojoba yağı granüllerinin topaklanmasını etkili bir şekilde engellemek için uzaysal engelleme yoluyla yağ-su ara yüzünün daha güçlü stabilitesine katkıda bulunduğunu göstermiştir [115].

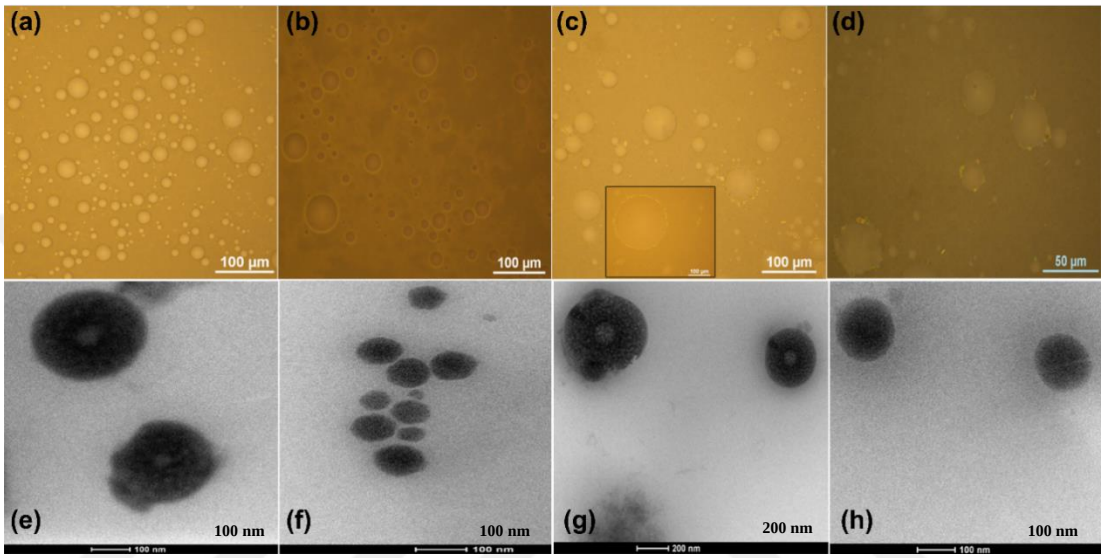



Şekil 3.61. (a) Emülsiyon kremleşme katmanını gösteren optik görüntüler ve (b) Kremleşme indeksi grafiği

### 3.7.4.3. POM ve TEM analizi ile morfolojik karakterizasyon

İlaç yüklü ve yüklü olmayan PE'lerin polarize optik mikroskop gözlemleri (POM), Şekil 3.62a'da gösterilmektedir. İlaç yüklemesinden önce, yaklaşık 100 nm çaplı küresel PE-ALG damlacıklarının varlığı gözlenmektedir. PE-DGN-ALG ise küresel damlacıklar ve onları çevreleyen kristal yapılar sergilemektedir. Bu kristal yapılar diosgenin sıvı kristal özelliklerinden kaynaklanmaktadır [23]. İlaç yüklenmesinden sonra, damlacıkların görsel olarak yoğunluğunun farklı olduğu, büyük ve toplanmış yapıların gözlenmesi olmadan sulu fazda iyi bir dağılım gösterdiği gözlenmektedir. TEM görüntüleri, çekirdek ve kabuk arasında farklı sınırları olan küresel çok katmanlı PE yapılarının varlığını göstermektedir. PE'lerin çekirdek-kabuk yapısının, Şekil 3.62b'de gösterildiği gibi siyah kenar boşluğu ile açık gri merkezi arasında bir boşluğa sahip olan küreler sergiledikleri de gözlenmiştir [116]. Katmanın hidrofilik kısımları siyah, hidrofobik kısımlar ise açık gridir.

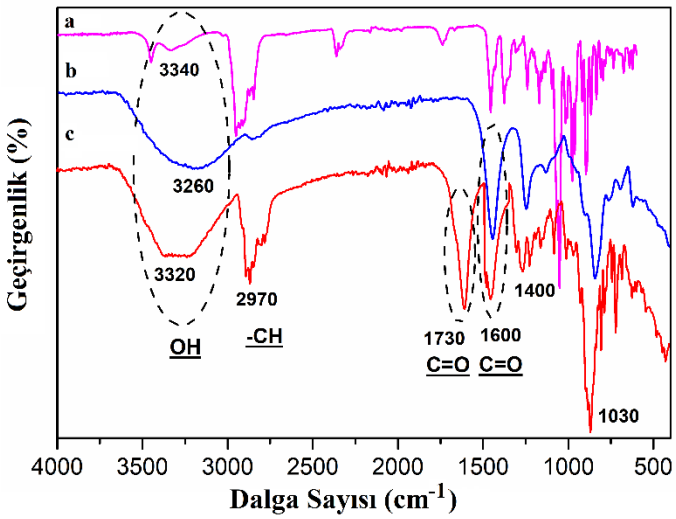
PE-ALG ve PE-DGN-ALG, yaklaşık 50 nm çapında bir çekirdek ve 120 nm kalınlığında bir kabuktan oluşan iyi tanımlanmış bir yapı sergilemektedir. İlaç yüklenmesinden sonra PE'lerin, su içinde homojen olarak dağılmış ve ortalama 100-200 nm aralığında çaplara sahip küresel yapılara sahip oldukları gözlenmektedir. TEM görüntülerinden PE'ler için elde edilen boyutlar, DLS ölçümlerinden elde edilen değerlerle uyum içerisindedir.




Şekil 3.62. PE-ALG (a ve e), PE-DGN-ALG (c ve g), yüklü PE-ALG (b ve f) ve yüklü PE-DGN-ALG için POM (yukarı) ve TEM (aşağı) görüntüleri (d ve h)

### 3.7.4.4. Yapısal Analiz

Konjugat örneklerinin kimyasal yapısı FTIR ve $^{1}$H-NMR teknikleri ile karakterize edildi. DGN'nin FTIR spektrumuna göre, 3340 $cm^{-1}$'deki geniş band hidroksil grubunun gerilmesine karşılık gelir. 2970 ve 1100 $cm^{-1}$ deki gerilme titreşimleri, sırasıyla -CH- ve C-O-C'ye aittir (Şekil 3.63a). 3200 $cm^{-1}$ ile 3500 $cm^{-1}$ aralığındaki geniş band ve 1600 $cm^{-1}$'deki keskin pik, sırasıyla ALG'nin karboksilat gruplarının hidroksil (-OH) ve karbonil (C=O) grubundan kaynaklanmaktadır (Şekil 3.63b). DGN-ALG'ye ait spektrumda, moleküller arası ester reaksiyonundan sonra oluşan ester bağının bir sonucu olarak, 1730 $cm^{-1}$'de yeni karbonil piki görüldü ve bu muhtemel konjugasyonu göstermektedir. Ayrıca spektrumda, 3320 $cm^{-1}$ ve 1600 $cm^{-1}$'de (-OH ve C=O) piklerinin varlığını sürdürmesi, ALG'nin kısmen DGN ile konjuge olduğunu ve hala serbest karboksilat grupları içerdiğini göstermektedir (Şekil 3.63c).



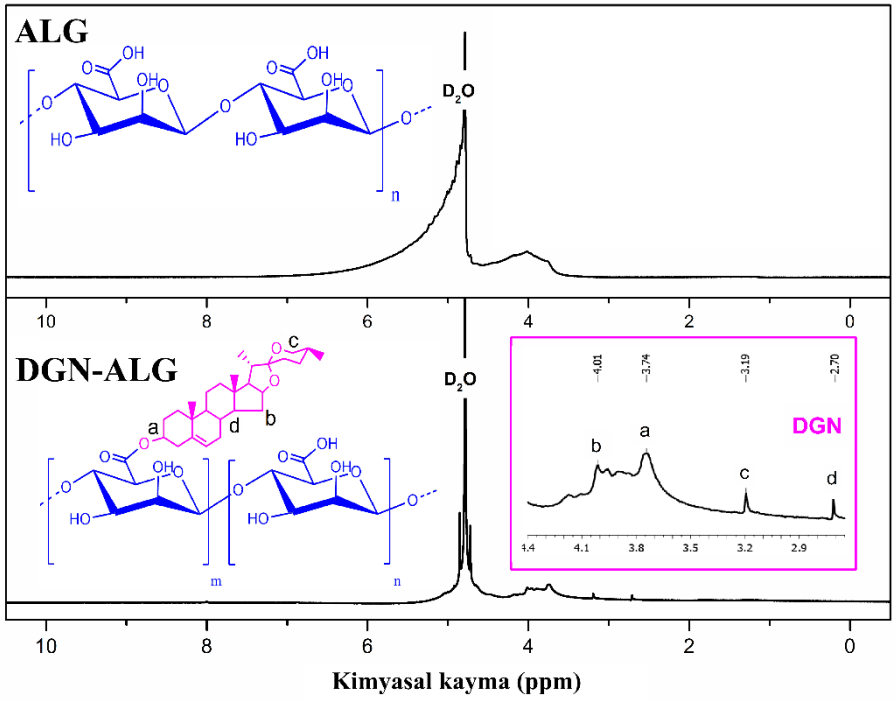

Şekil 3.63. Diosgenin (a), aljinat (b) ve DGN-ALG (c)'nin FTIR spektrumları

DGN'nin ALG ile başarılı bir şekilde bağlandığını görmek için $^{1}$H-NMR ile analiz edildi. Şekil 3.64'de görüldüğü gibi, DGN-ALG'deki diosgenin protonları, seyreltilmiş suda ($D_2O$) tespit edildi. 3,5-6,0 ppm arasındaki geniş kimyasal kayma, aljinat ana zincirlerinin heksuronik asit kalıntılarına ait metil protonlarını (-CH-) göstermektedir. Yeni proton pikleri ise diosgenin molekülünde bulunan H3, H19, H27 ve H11 protonlarına aittir ve 2,7-4,01 ppm aralığında görülmektedir. DGN'nin çift bağ protonu ise aljinat tekrar eden birimlerinin sinyallerin altına kalmıştır. DGN, ALG'nin karboksil gruplarına başarıyla konjuge edildiği görülmektedir.

DGN-ALG'nin sübstitüsyon derecesi (DS), heksuronik asit kalıntılarına (G/M) ($N_{G(M)}$) ester bağı ile bağlı ortalama DGN grubu ($N_{DGN}$) sayısı olarak tanımlandı. Diosgenin molekülleri üzerindeki H3 ve H6 protonlarının integrasyonu önemsiz olduğu varsayıldı. DGN-ALG'nin kimyasal yapısına göre DS'nin belirlenmesi, $N_{DGN}=N_{DGN\text{-}H}/39$ ve $N_{G(M)}=N_{G(M)\text{-}H}/5$ eşitliğinden yararlanılarak ve Denklem (3.1) kullanılarak hesaplandı;

$$DS = 5I_{DGN\text{-}H}/39I_{G(M)\text{-}H} \quad (3.1)$$

Bu denklemde, $N_{DGN\text{-}H}$ ve $I_{DGN\text{-}H}$, sırasıyla DGN üzerinde H3 ve H6 dışındaki protonların sayısına ve intergrasyonuna karşılık gelirken, $N_{G(M)\text{-}H}$ ve $I_{G(M)\text{-}H}$, sırasıyla aljinat ana zincirlerindeki protonların sayısına ve intergrasyonuna karşılık gelmektedir [117]. Bu çalışmada, DGN-ALG'nin DS değeri 0,02 olarak hesaplandı ve ortalama 100 heksuronik asit kalıntısına esterlenmiş iki diosgenil grubu olduğunu gösterdi.




Şekil 3.64. Aljinat (a) ve DGN-ALG (b)'nin $^{1}$H-NMR spektrumları

Kuaternize nanoselüloz için katyonik modifikasyon derecesi (KMC) element analiz sonuçlarından elde edilen verilerle hesaplandı. Modifiye nanoselülozdaki azot (N) element içeriğinin % 0,35 olduğu belirlendi. CHTAC-kimyasal modifikasyon işlemi sırasında katyonik hidroksipropiltrimetilamonyum gruplarının nanoselülozun yüzey hidroksil gruplarının modifikasyonu için katyonik modifikasyon derecesinin 0.042 olduğu aşağıdaki Denklem (3.2) kullanılarak elde edildi [56];

$$KMD = \frac{162 \times \%N}{1400\text{-}151{,}6 \times \%N} \qquad (3.2)$$

Bu denklemde N; ağırlık yüzdesinde katyonik NS üzerindeki azot miktarıdır. 162; AGU ünitesinin moleküler ağırlığı ve 151,6; 2,3-epoksipropiltrimetilamonyum klorürün (EPTAC) moleküler ağırlığıdır [118].

### 3.7.5. Pickering emülsiyonunda ilacın kararlılığı

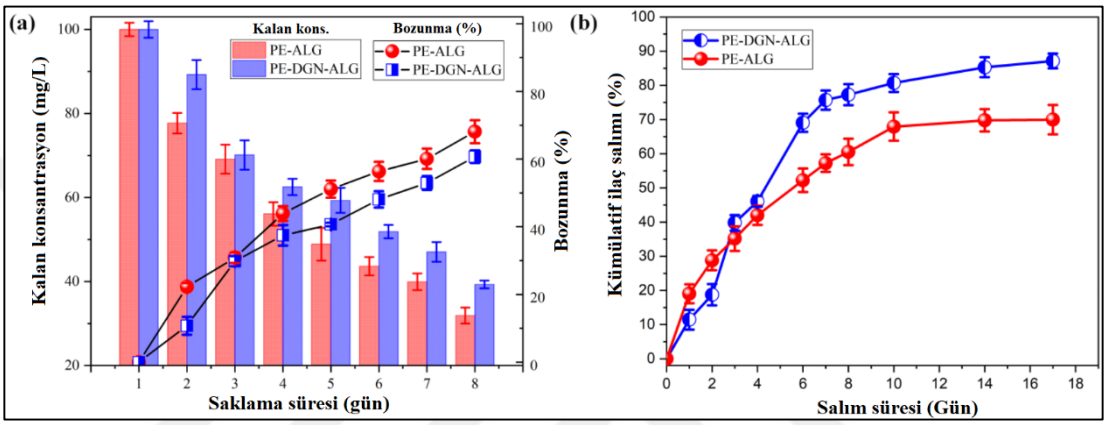
Kapsüllenmiş biyoaktif moleküllerin emülsiyondaki kararlılığı, endüstriyel ürünlerde olası uygulama için hayati öneme sahiptir. Bozulmadan kalan ilacın konsantrasyonunun yanı sıra zaman içinde PE'lerdeki quinalizarin bozulma yüzdesi Şekil 3.65a'da gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar, 24 saat sonra, sırasıyla PE-ALG ve PE-DGN-ALG'de yaklaşık %22 ve %10 oranında quinalizarinin bozunduğunu

göstermektedir. İlaç bozulmasının yarı ömrü (ilacın %50'si) için gereken süre, sırasıyla PE-ALG ve PE-DGN-ALG için 5 ve 7 gün olarak belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda, kapsüllenmiş biyoaktif moleküllerin yarı ömrünün 3-5 gün arasında olduğu rapor edilmiştir [106]. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlar, ara yüzler arası çok katmanlı düzenlenmenin iyi oluşumuna ve ilaç kapsüllenmiş PE-DGN-ALG sisteminin kararlılığını arttırdığını göstermektedir. Aynı zamanda, ilacın maksimum bozulma yüzdesi, 8 günlük depolamadan sonra, PE-ALG ve PE-DGN-ALG için sırasıyla %70 ve %60 olarak hesaplandı ve bu durum PE-ALG'nin daha düşük bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. (Şekil 3.65a). PE-DGN-ALG için daha yüksek kararlılığın, aljinatın omurgası üzerine diosgenin konjugasyonunun, emülsiyon damlacığı dış tabakasına daha yüksek hidrofobik özellik kazandırmış olmasına bağlanmaktadır. Böylece hidrofilikliği ve olası bozulmayı azaltmaktadır. PE-ALG dış katman üzerinde yüksek yoğunlukta serbest karboksil grupları (-COO-) içeren aljinat tabakasının varlığı emülsiyon damlacıklarının daha hidrofilik olması ve kapsüllenmiş ilaç moleküllerinin parçalanmasında daha kolay olmasına neden olmuştur.

### 3.7.6. Picking emülsiyonundan quinalizarinin in vitro salımı

Doğal polimerik polielektrolitlerden oluşan kapsüllenmiş sistemler, biyoaktif moleküllerin kontrollü salımında geniş çapta çalışılmıştır [119]. Quinalizarin, iyi bir protein kinaz CK2 inhibitörü olmasının yanı sıra bir model ilaç olarak oral kontrollü salım formülasyonlarının geliştirilmesi için iyi bir aday olarak görülmektedir [120, 121]. Bu çalışmada, çok katmanlı PE-ALG ve PE-DGN-ALG'ye kapsüle edilmiş quinalizarin'in bu sistemlerden kontrollü salımı incelendi. Şekil 3.65b, simüle edilmiş kan sıvısının pH'ına karşılık gelen PBS (pH=7,4) çözeltisi içindeki zamanın bir fonksiyonu olarak PE'lerden quinalizarin salım davranışlarının göstermektedir. PE-DGN-ALG daha yüksek ve sürekli bir ilaç salım profili sunmaktadır. Bu durum PE sisteminde ilaç kararlığını artıran DGN-ALG'dan oluşan ikinci emülsiyon tabakasının gelişmiş hidrofobik özelliğine atfedilmektedir. PE-ALG daha ise düşük bir ilaç salım profili gösterdi. Bu durum, ilacın hızlı bir şekilde serbest bırakılmasını sağlayan ve serbest bırakma işlemi sırasında ilaç moleküllerinin bozunmasını kolaylaştıran PE-ALG'nin yüksek hidrofilik özelliğinden kaynaklanmaktadır. İlk gün PE-ALG ve PE-DGN-ALG için sırasıyla %19 ve %11 ilaç salımı elde edildi. Yüklenen ilacın salım

hızı, 8-10 gün boyunca kademeli olarak artarak 17 gün sonra PE-ALG ve PE-DGN-ALG için sırasıyla %68 ve %89'luk maksimum kümülatif ilaç salımına ulaştı. Yavaş ve sürekli ilaç salımın, ikinci katmanı DGN-ALG stabilize edilmiş emülsiyon için nispeten daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, daha önce de belirtildiği gibi, diosgenin konjüge edilmiş polianyonik biyopolimerin kullanımının, PE sistemlerinde yüklü ilacın kararlılığının ve salım oranının artmasını amaçlayan emülsiyon damlacıklarına hidrofobik özellikler kazandırması ile açıklanabilir.

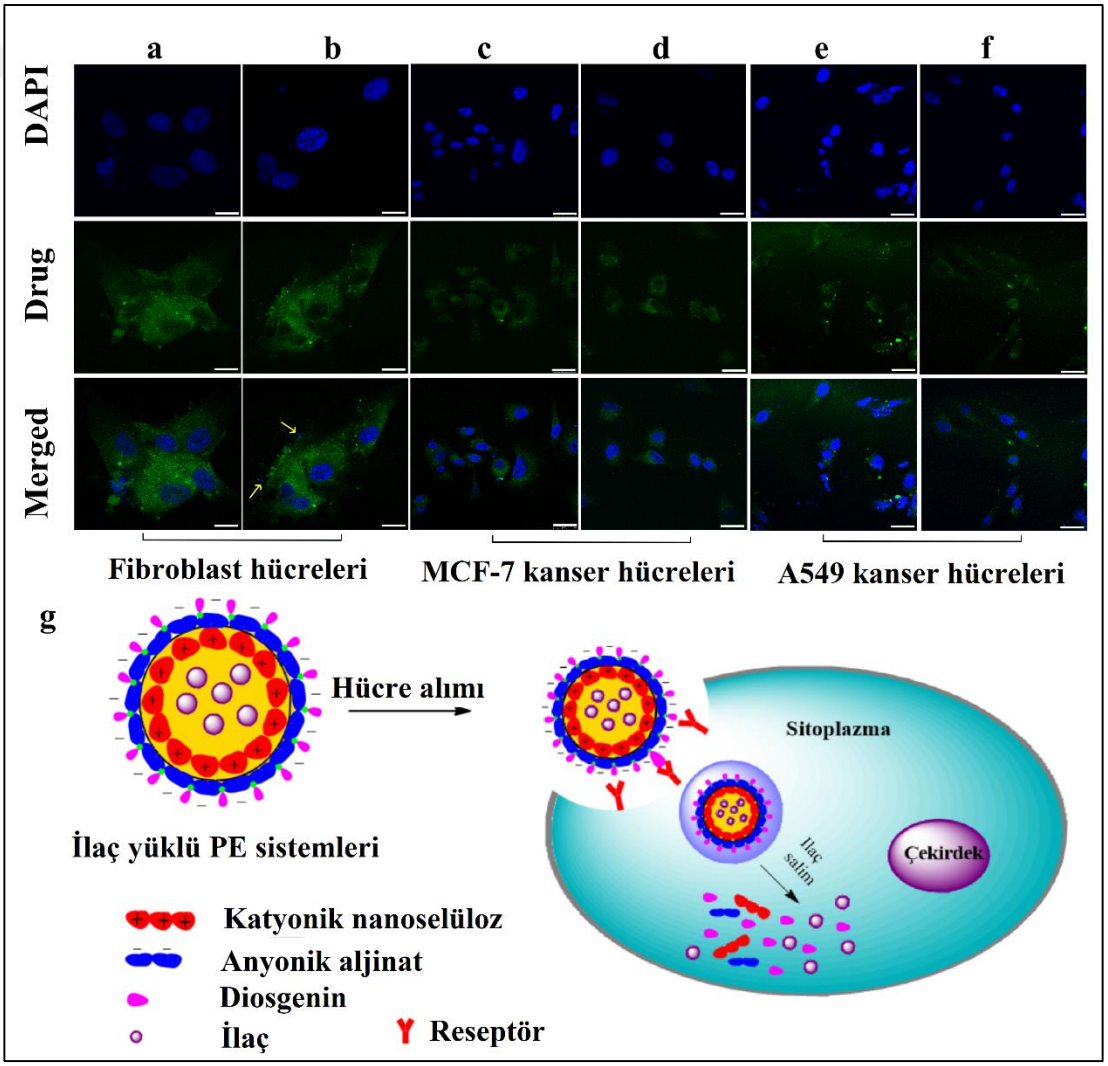



Şekil 3.65. (a) PE sisteminde quinalizarin kararlılığı ve (b) 37 °C'de PBS pH 7.4'te PE'lerden ilacın in vitro salım profilleri

### 3.7.7. İn vitro hücresel alım ve sitotoksisite çalışmaları

PE'lerin etkin ilaç taşıyıcı sistemler olarak potansiyelini değerlendirmek için, hücresel alım deneyleri ayrıca incelendi. İlaç yüklü PE'lerin optik görüntülenmesi konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) ile izlendi. Mavi bir floresan boya olan DAPI, hücre çekirdeğini boyamak için kullanıldı. Bu PE'lerin çekirdeğe nüfuz etmesinin değerlendirilmesinde kullanılan kolay bir yöntemdir. PE'lerin hücresel alımı üç farklı hücre hattında 4 saatlik inkübasyon süreleri için değerlendirdi. Şekil 3.66'da, yukarı, orta ve aşağı sütundaki görüntüler, sırasıyla DAPI ile boyanmış hücre çekirdeğinden gelen mavi floresanı, herhangi bir floresan işaretleyici kullanmadan PE'lerden kaynaklanan yeşil floresanı ve iki görüntünün birleşmesini göstermektedir. Tüm ilaç yüklü PE'lerin (yeşil floresans) sitoplazmada yoğun bir şekilde lokalize oldukları ve hücresel alımlarının makrofajlara yansıtan esas olarak mavi çekirdeklerin etrafında zenginleştikleri görülmektedir.

Fibroblast hücrelerinin birleştirilmiş görüntüleri, ilaç yüklü PE'lerin, sitoplazmada alınmış PE'leri temsil eden yüksek floresans yoğunluğuna sahip olduklarını ve hücre bölünmesinin hala belirgin olarak devam ettiğini Şekil 3.66a ve b'de (sarı oklar) göstermektedir [111]. İlaç yüklü PE'ler, 4 saatlik inkübasyondan sonra MCF-7 ve A549 hücreleri için CLSM'de izlendi (Şekil 3.66c-f). İlaç yüklü PE'lerin hücre zarı içine alındıkları, ilaçların kanser hücrelerinin asidik ortamında salımının gerçekleştiği ve sitotoksik etkisini sergilediği sitoplazmada yeşil floresans olarak gözlenmesinden anlaşılmaktadır [25, 57]. Ayrıca, sitoplazmadaki bu geniş dağılımın, endositoz yoluyla kanser hücrelerinin başarılı içselleştirmeyi gösterdiğini öne sürmektedir.



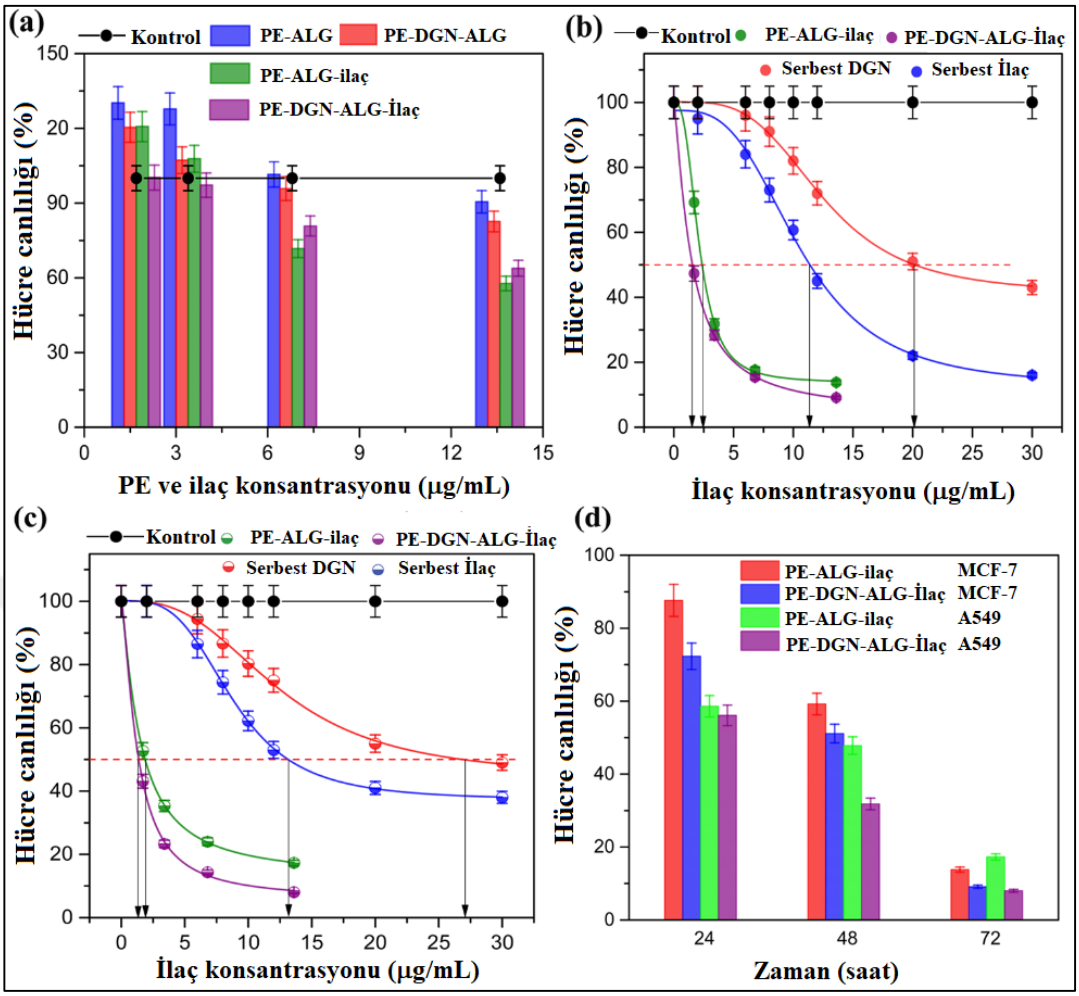

Şekil 3.66. CLSM görüntüleri. İlaç yüklü PE-ALG (a, c, e), İlaç yüklü PE-DGN-ALG (b, d, f) (12.5 μM ilaç eşdeğeri). Ölçek çubuğu 25 μm. (g) İlaç yüklü PE'lerin hücre içi salımının şematik gösterimi

Benzer şekilde, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, DGN fonksiyonelleştirilmiş nanosistemlerin (nanopartiküller, emülsiyonlar ve supramoleküler platformlar gibi) önce hücre zarında, ardından sitoplazma ve çekirdek bölgesinde tutulduğu görülmektedir [25, 29]. Çalışmalarda ayrıca, ilaç taşıyıcısı nanosistemlerinin, serbest ilaçlara kıyasla daha yüksek hücre alımı gösterdiğini rapor edilmiştir. Bu, serbest ilaçların zayıf çözünürlüğüne, nanosistemlerin yüksek dağılım ve geçirgenliğine bağlanmaktadır [122, 123]. Hücre içi ilaç salım davranışı için şematik bir gösterim Şekil 3.66g'de verilmiştir. DGN ve quinalizarin, hücre canlılığını azaltma yeteneğine sahiptir ve ayrıca DGN için hetero-şeker kısmının ve 5,6-çift bağın, quinalizarin için 2 konumundaki asidik hidroksil grubunun anti-proliferatif ve antikanser etkileşimlerden sorumlu oldukları bildirilmiştir [20, 124]. İn vitro sitotoksisite çalışmaları, hem PE'lerin hem de ilaç yüklü PE'lerin sağlıklı (fibroblast) ve kanserli hücre hatları (meme kanseri MCF-7 ve akciğer kanseri A549) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmesiyle gerçekleştirildi. Karşılaştırma için, kontrol deneyleri de paralel olarak çalışıldı. Hücre canlılığı, WST analizi ile değerlendirildi. Hücre canlılığının yüzdeleri, Şekil 3.67'de konsantrasyona bağlı (Şekil 3.67a-c) ve zamana bağlı (Şekil 3.67d) olarak gösterilmektedir. İlaç yüklü olmayan PE'lerin sitotoksisitesi, sağlıklı hücrelere olan toksisitesini ve biyogüvenliğini doğrulamak için fibroblast hücrelerinin inkübe edilmesiyle test edildi. Hücre canlılığının, yüksek biyo-uyumluluğa işaret eden 14 μg/mL'ye kadar ilaç konsantrasyonuyla %90'ın üzerinde olduğu görüldü (Şekil 3.67a). Konsantrasyon 14 μg/mL'nin altındayken ilaç yüklü olmayan PE'lerin herhangi bir toksik etkiye sahip olmadıkları açıkça görülmektedir.

İki kanser hücresi hattına karşı antikanser testi, ilaç yüklü PE'ler için 2 ile14 μg/mL, serbest ilaçlar için 1 ile 30 μg/mL aralığında farklı ilaç konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. MCF-7 hücre hattı için en yüksek ilaç konsantrasyonlarında hücre canlılıkları, 72 saatlik inkübasyondan sonra ilaç yüklü PE-ALG ve PE-DGN-ALG, serbest ilaç ve serbest DGN için sırasıyla %13,8; %9,1; %45 ve %72 olarak belirlendi (Şekil 3.67b). A549 hücreleri için ise, ilaç yüklü PE-ALG ve PE-DGN-ALG, serbest ilaç ve serbest DGN ile inkübe edildikten sonra hücre canlılıkları sırasıyla %17; %8; %32 ve %49 olarak ölçüldü (Şekil 3.67c). İlaç yüklü PE'lerin hücre inhibisyonunun, serbest ilaçlarınkinden belirgin şekilde daha yüksek olduğu sonucuna varıldı. Zamana bağlı hücre canlılıkları, Şekil 3.67d'de özetlendi. İlaç yüklü PE-ALG

ve PE-DGN-ALG için 14 mg/mL ilaç konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılıkları sırasıyla MCF-7 için %88-72, ve A549 için %59-56, ve MCF-7 için %59-51 ve A549 için %48-32, MCF-7 için %14-9 ve A549 için %17-8 olarak belirlendi. Temelde, ilaç yüklü PE'lerin sitotoksik etkisinin daha uzun inkübasyon süresiyle artığı görülmektedir. Sitotoksisitenin ilacın kendisinden mi yoksa diosgeninin ile kombinasyonundan kaynaklandığını değerlendirmek için ilaç yüklü PE-ALG kontrol olarak kullanıldı.

Çıkarılan verilerden, ilaç yüklü PE-DGN-ALG'nin ilaç yüklü PE-ALG daha etkili sitotoksisiteye sahip olduğu elde edildi. Bu, PE formülasyonlarındaki iki ilacın katkısının güçlü sitotoksisitesine bağlanmaktadır. DGN'nin in vitro antikanser aktivitesi, daha önceki raporlar ile uyumludur [25, 29]. Diğer taraftan, ilaç yüklü PE'lerin sitotoksik etkisi, aynı konsantrasyondaki serbest ilaçlarla karşılaştırıldığında daha yüksek hücre inhibisyonu gösterdiği görülmektedir. Bunun nedeni, serbest ilaçların hücrelerin büyümesi üzerine olası inhibisyon etkisi, zayıf sulu çözünürlükleri ve kararsızlıkları nedeniyle düşük sitotoksik potansiyel oluşturduklarına bağlanmaktadır [125, 126]. Bununla birlikte, ilaç yüklü PE'ler iyi bir kararlılığa ve sulu çözünürlüğe sahiptir. Bu nedenle, serbest ilaçlara kıyasla kanser tedavisinde ilaç yüklü PE formülasyonları kullanmanın güvenli ve etkili bir yol olduğu düşünülebilir [58]. Antikanser aktivitesi, hem MCF-7 hem de A549 hücrelerine karşı yarı maksimal inhibitör konsantrasyon ($IC_{50}$) ile daha da belirlendi. Çalışılan tüm hücrelerin sigmoidal eğrilerinden elde edilen $IC_{50}$ değerleri Tablo 3.11'de listelendi. Sonuçlar çalışılan her iki kanser hücre hattı için; ilaç yüklü PE-DGN-ALG < ilaç yüklü PE-ALG yüklü < serbest ilaç < serbest DGN şeklinde sıralandı. İlaç yüklü PE'lerin $IC_{50}$ değerlerinin serbest ilaçlardan çok daha düşük olduğu açıkça görülmektedir. Bununla birlikte, ilaç yüklü PE-DGN-ALG'nin $IC_{50}$ değerleri, ilaç yüklü PE-ALG'ninkinden düşük olduğu görülmektedir. Bu, DGN'in quinalizarin antikanser aktivitesini arttığını göstermektedir. İki ilacın kombinasyon etkisini elde etmek amacıyla kanser hücre hatları için kombinasyon indeksi (CI) hesaplandı. İlaç yüklü PE-DGN-ALG'nin CI değerlerinin, MCF-7 ve A549 için sırasıyla 0,28 ve 0,19 olduğu ve 1'den küçük bu değerlerin ilaçların kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği sonucuna varıldı. Ayrıca, CI değerlerinden ilaç yüklü PE-DGN-ALG'ye A549 hücre hattının daha duyarlı olduğu sonucuna varıldı.




Şekil 3.67. (a) Fibroblast (b) MCF-7, (c) A549 ile inkübe edildikten sonra PE'lerin ve serbest ilaçların hücre canlılığı ve (d) MCF-7 ve A549 hücreleri için zamana bağlı hücre canlılığı (veriler ortalama ± SD (n = 3) ve P< 0.05 olarak gösterilmiştir)

Tablo 3.11. PE'lerin ve serbest ilaçların 72 saat inkübasyon sonrası MCF-7 ve A549 hücrelerine karşı $IC_{50}$ değerleri

| Formülasyon | $IC_{50}$ (µg/mL) | |
|---|---|---|
| | MCF-7 | A549 |
| Quinalizarin | 11,3 | 13,1 |
| Diosgenin | 20,1 | 27,0 |
| PE-ALG ilaç yüklü | 2,41 | 1,92 |
| PE-DGN-ALG ilaç yüklü | 1,50 | 1,36 |
| Kombinasyon indeksi (CI) | 0,28 | 0,19 |

# 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tezin ilk çalışmasında diosgenin bileşiğinden yola çıkarak yeni spirostan türev bileşikleri sentezlendi. Bu bileşiklerin sentezi için daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli değişiklikler yapılarak yeni ve daha pratik metotlar geliştirildi ve bileşikler yüksek verimlerle elde edildi. Bileşiklere ait FTIR, $^{1}$H-NMR ve $^{13}$C-NMR spektrumları incelendiğinde sentezlerin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görüldü. Bilim dünyasına kazandırılan yeni türev bileşikleri özellikle ilaç sektöründe olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecekleri öngörülmektedir.

Yapılan ikinci çalışmada, mPEG'in hidrofilik kabuğunu, diosgenin ve kurkumin'in hidrofobik çekirdeğini oluşturan yeni biyolojik olarak parçalanabilir amfifilik polimerik konjugat tasarlandı ve başarıyla sentezlendi. Polimerik konjugatın tasarlanmasında diosgenin ve kurkumin, anti-kanser, anti-oksidan ve anti-inflamatuar gibi biyolojik aktiviteleri nedeniyle ve mPEG, çözünürlüğünün iyi olması, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olmasından dolayı seçildiler. $^{1}$H NMR ve FTIR analizi, polimerik konjugatın beklenen yapılarını doğruladı. Termal davranışları ve kararlılıkları DSC geçiş sıcaklıkları ve TGA eğrileri ile sıvı kristal davranışı ise POM analizleri ile desteklendi. Polimerik konjugat sıvı kristal özellik gösterdi ve ürünün kristal halden sıvı kristale geçiş sıcaklığı, ısıtma ve soğutma döngüleri sırasında simektik fazının fan şeklinde yapı sergilediğini gösterdi. Kurkumin mono alkin ve polimerik konjugatın farklı çözücülerde absorpsiyon ve emisyon davranışları da incelendi. CMA ile karşılaştırıldığında, polimerik konjugatın, çözücünün polaritesi arttıkça batokromik kayma sergilediği görüldü. Parlak sarı renkli floresan emisyonları, uzun dalga boyundaki UV lamba altında yeşil renge dönüştürüldü. Kurkumin'in absorpsiyon ve floresan özelliklerinden dolayı, kurkumin konjuge edilen sistemler, ilgili spektrumlarda onun karakteristik piklerinin izlenmesi ile kolayca takip edilebilir. Polimerik konjugat, kendi kendine düzenlenme yoluyla sulu çözeltide küresel miseller oluşturdu. Ortalama polimerik miselin boyutunun 100-200 nm arasında olduğunu DLS ve TEM analizlerinden belirlendi.

Sitotoksisite çalışmaları, düşük konsantrasyonda polimerik konjugatın insan fibroblast hücreleri üzerinde (L929) hücre çoğalmasına imkan verdiği ve insan meme kanseri hücrelerine (MCF-7) karşı yüksek konsantrasyonlarda yüksek toksisiteye sahip olduğunu gösterdi. Gelecekteki ilaç uygulamaları için doğal ürünlere dayanan amfifilik konjugatlar etkin anti-kanser ilaç taşıyıcı sistemler olarak önerilmektedir.

Üçüncü çalışmada, hidrofobik anti-kanser çekirdeğinden ve hidrofilik bir kabuktan oluşan DGN konjuge edilen polimerik nanopartiküller geliştirildi. Diosgenin, geniş biyolojik uygulama yelpazesin karşı mükemmel terapötik etkilerinden dolayı seçildi. Kopolimerler, $^{1}$H-NMR, FTIR, GPC, DSC ve TGA teknikleri ile karakterize edildi. Bu çalışma, bir model anti-kanser ilacın kontrollü salımı ve taşınması için yeni polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasını ve uygulanmasını içermektedir. Aynı zamanda bir anti-kanser ilacı olan imatinib ile diosgenin birleştirilerek önemli bir sinerjistik etki elde etmeyi amaçlamaktadır. Polimerik NP'ler çözücü emülsiyon buharlaştırma metodu ile hazırlandı ve <200 nm boyut dağılımı, iyi kapsülleme verimliliği (%60-85) ve yüksek ilaç yükleme kapasitesi (%10-15) gibi özellikler sergiledi. İmatinib 265 nm'de absorpsiyon bandı (UV), 328-445 °C bozunma sıcaklığı (TGA) ve 3345 $cm^{-1}$'de NH gerilme piki (FTIR) ile teyit edilerek partiküllere yüklenmesinin başarılı olduğu görüldü. NP'lerin simüle edilmiş gastrointestinal sıvılarda partikül boyutunun değişmemesi iyi kararlılık sergilediklerini gösterdi. NP'lerden in vitro ilaç salım davranışı, vücut sıvılarının taklit edildiği PBS çözeltilerinde (pH 3,5 ve 7,4) sürekli bir DGN ve ITB salımı olduğunu gösterdi. Serbest ilaçlar ile karşılaştırıldığında, ilaç yüklü NP'lerin daha yavaş salım sergilediği ve 10 gün içinde test edilen tüm ortamlarda salımın devam ettiği görüldü. MTT analizleri NP'lerin insan fibroblast hücreleri (L929) için biyo-uyumlu ve toksik olmadığını, ilaç yüklü NP'lerin, üç farklı kanser hücresine, serbest ilaçlardan daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini ve tüm konsantrasyonlarda kanser hücresi çoğalmasını etkili şekilde inhibe ettiği sonucunu gösterdi. İn vitro çalışmalar NP'lerin antikanser ilaçların gögüs, kemik ve lösemi kanser hücrelerine verilmesi için uygun bir sistem sağladığını göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, hazırlanan DGN-konjuge ve ITB-yüklü NP'lerin, kanser tedavisi için sürekli ve kontrollü salım çalışmaları için potansiyele sahip olduğu düşünülebilir.

Gastrointestinal şartlar altında kararlılıklarından dolayı oral ilaç verme sistemleri gibi potansiyel uygulamalarda kullanılabilir. Aynı zamanda, nanopartikül sistemlerinde DGN ve ITB kombinasyonu, sinerjik bir etki ve kanser tedavisi için yüksek ve hızlı iyileştirici etki edebilir.

Yapılan son çalışmada, kuaternize nanoselüloz ve diosgenin-konjuge aljinat ile stabilize edilmiş yeni çok katmanlı Pickering emülsiyonu, antikanser ilaçların kontrollü salımı için başarıyla hazırlandı. Birinci katman olarak katyonik selüloz ve ikinci katmanı anyonik diosgenin konjuge aljinat olarak tasarlandı. Diosgeninin aljinata doğrudan konjugasyonu, esterifikasyon reaksiyonu yoluyla gerçekleştirildi. Daha sonra FTIR ve $^{1}$H-NMR spektroskopileri ile karakterize edildi. Çok katmanlı PE'ler, doğal özellik, mükemmel kararlılık, yüksek kapsülleme verimliliği, iyi biyouyumluluk ve kontrollü salım özelliği sergileyen, su içinde yağ tipi Pickering emülsiyonu yaklaşımı ile elde edildi. Hazırlanan PE'ler TEM ve POM analizi altında küresel şekiller sergiledi. PE'lerin kritik toplanma konsantrasyonu, 0,6 ve 1,5 mg/L olarak belirlendi. Bir kanser ilacı olan quinalizarin PE'lerin içinde başarıyla kapsüllendi ve kapsülleme verimliliği > %90 olarak hesaplandı. İn vitro ilaç salım profili, PBS pH 7,4'te 17 gün boyunca sürekli salım gösterdi. CLSM'den elde edilen in vitro hücresel alım çalışması, ilaç yüklü PE'lerin, hem MCF-7 hem de A549 hücrelerine karşı yüksek hücresel alım kabiliyetine sahip olduğunu ve ilacı hücrelerin sitoplazmasına başarıyla taşıdığını gösterdi. Ek olarak, ilaç yüklü PE'lerin in vitro sitotoksisite analizi, konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığı ile yapıldı. Hücre canlılığı çalışmaları şu bulguları ortaya çıkardı: (1) Boş PE'lerin ve ilaç yüklü PE'lerin, insan sağlıklı fibroblast hücreleri için toksik olmadığı ve yaşayan hücre yüzdesi %50'nin üzerinde olduğu için iyi biyouyumluluğa sahip olduğunu gösterdi. (2) İlaç yüklü PE'ler, gögüs (MCF-7) ve akciğer (A549) kanser hücrelerinin çoğalmasını etkili şekilde inhibe ettiği ve yaşayan hücrelerin yüzdesinin %50'nin altında olduğundan yüksek toksisiteye sahip olduğunu gösterdi. (3) Düşük $IC_{50}$ değerleri ve sinerjistik kombinasyon indeksi, ilaç yüklü PE'lerin antikanser aktivitesinin serbest ilaçlardan daha yüksek olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar ışığında, elde edilen PE'lerin umut verici biyomalzemeler ve kanser tedavisi için etkili taşıyıcılar olduğu düşünülebilir. Klinik uygulama çalışmaları için yeterli bilgi sağlamak amacıyla in vivo değerlendirme yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR


[1] Liu Y., Li K., Pan J., Liu B., Feng S. S., Folic Acid Conjugated Nanoparticles of Mixed Lipid Monolayer Shell and Biodegradable Polymer Core for Targeted Delivery of Docetaxel, *Biomaterials,* 2010, **31**(2), 330-338.

[2] Kaskiw M. J., Tassotto M. L., Mok M., Tokar S. L., Pycko R., Thng J., Jiang Z. H., Structural Analogues of Diosgenyl Saponins: Synthesis and Anticancer Activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* 2009, **17**(22), 7670-7679.

[3] Küçükkurt İ., Fidan A. F., Saponinler ve Bazı Biyolojik Etkileri, *Kocatepe Veteriner Dergisi,* 2008, **1**(1), 89-96.

[4] Yan C., You Mei T., Su Lan Y., Yu Wei H., Jun Ping K., Bao Lin L., Bo Yang Y., Advances in the Pharmacological Activities and Mechanisms of Diosgenin, *Chinese Journal Of Natural Medicines,* 2015, **13**(8), 578-587.

[5] Gong N., Zhang B., Hu F., Du H., Du G., Gao Z., Lu Y., Development of A New Certified Reference Material of Diosgenin Using Mass Balance Approach and Coulometric Titration Method, *Steroids,* 2014, **92**, 25-31.

[6] Lu X. F., Yang Z., Huang N. Y., He H. B., Deng W. Q., Zou K., Synthesis and Cytotoxic Activities of 2-Substituted (25R)-Spirostan-1, 4, 6-triene-3-ones via Ring-Opening/Elimination and 'Click' Strategy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015, **25**(17), 3726-3729.

[7] Cai B., Liao A., Lee K. K., Ban J. S., Yang H. S., Im Y. J., Chun C., Design, Synthesis of Methotrexate-Diosgenin Conjugates and Biological Evaluation of Their Effect on Methotrexate Transport-Resistant Cells, *Steroids* 2016, **116**, 45-51.

[8] Li W., Wang H., Wei Z., Ning J., Ma L., Zheng H., Niu H., Huang W., Supramolecular Prodrug Micelles Based on the Complementary Multiple Hydrogen Bonds as Drug Delivery Platform for Thrombosis Therapy, *RSC Advances,* 2016, **6**(67), 62478-62484.

[9] Wei Z., Xin G., Wang H., Zheng H., Ji C., Gu J., Ma L., Qin C., Xing Z., Niu H., The Diosgenin Prodrug Nanoparticles with pH-Responsive as A Drug Delivery System Uniquely Prevents Thrombosis without Increased Bleeding Risk, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology And Medicine,* 2018, **14**(3), 673-684.

[10] Villegas, A. S., Sanchez Tainta A., *The Prevention of Cardiovascular Disease through the Mediterranean Diet,* 1st ed., Academic Press, Massachusetts, 2017.

[11] Bone K., Simon M., *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*, 2nd ed., Elsevier Health Sciences, London, 2012.

[12] Akbel E., Karabağ F., Saponinler ve Reproduktif Etkileri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2012, **5**(1), 25-29.

[13] Galanakis C. M., *Innovations in Traditional Foods*, 1st ed., Woodhead Publishing, Cambridge, 2019.

[14] Gupta, R. C., *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 1st ed., Academic Press, Massachusetts, 2016.

[15] Ma E., Kim J., Epoxidation of Diosgenin, 25 (R)-1, 4, 6-Spirostatrien-3-one and 25 (R)-4, 6-Spirostadien-3β-ol, *Molecules*, 2003, **8**(12), 886-893.

[16] Manivannan J., Shanthakumar J., Silambarasan T., Balamurugan E., Raja B., Diosgenin, A Steroidal Saponin, Prevents Hypertension, Cardiac Remodeling and Oxidative Stress in Adenine İnduced Chronic Renal Failure Rats, *RSC Advances*, 2015, **5**(25), 19337-19344.

[17] Jesus M., Martins A. P., Gallardo E., Silvestre S., Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology, *Journal Of Analytical Methods in Chemistry*, DOI: 10.1155/2016/415629318.

[18] Jiang B., Shi H., Tian W., Zhou W., The Convergent Synthesis of Novel Cytotoxic Certonardosterol D2 from Diosgenin, *Tetrahedron*, 2008, **64**(3), 469-476.

[19] Tohda C., Urano T., Umezaki M., Nemere I., Kuboyama T., Diosgenin is an Exogenous Activator of 1, 25D 3-MARRS/Pdia3/Erp57 and Improves Alzheimer's Disease Pathologies in 5XFAD Mice, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/Srep00535.

[20] Raju J., Mehta R., Cancer Chemopreventive And Therapeutic Effects of Diosgenin, A Food Saponin, *Nutrition and Cancer*, 2008, **61**(1), 27-35.

[21] He L., Jiang Y., Liu K., Gomez Murcia V., Ma X., Torrecillas A., Chen Q., Zhu X., Lesnefsky E., Gomez Fernandez J. C., Insights into the İmpact of A Membrane-Anchoring Moiety on the Biological Activities of Bivalent Compounds as Potential Neuroprotectants for Alzheimer's Disease, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, **61**(3), 777-790.

[22] Liagre B., Vergne Salle P., Corbiere C., Charissoux J. L., Beneytout J. L., Diosgenin, A Plant Steroid, Induces Apoptosis in Human Rheumatoid Arthritis Synoviocytes with Cyclooxygenase-2 Overexpression, *Arthritis Res Ther*, 2004, **6**(4), R373.

[23] Yao D., Li P., Liu X., Hu J., Yang L., New Side Chain Liquid Crystal Aliphatic Polycarbonate with Pendant Functionalized Diosgenyl Groups: I. Synthesis And Mesomorphism, *Colloid and Polymer Science*, 2015, **293**(10), 3049-3059.

[24] Yang, J., Li Q., Li Y., Jia L., Fang Q., Cao A., Chemical Preparation and Characterization of New Biodegradable Aliphatic Polyesters End Capped with Diverse Steroidal Moieties, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* 2006, **44**(6), 2045-2058.

[25] Li C., Dai L., Liu K., Deng L., Pei T., Lei J., A Self-Assembled Nanoparticle Platform Based on Poly (Ethylene Glycol)–Diosgenin Conjugates for Co-Delivery of Anticancer Drugs, *RSC Advances*, 2015, **5**(91), 74828-74834.

[26] Sheng R., Zhuang X., Wang Z., Cao A., Lin K., Zhu J., Cationic Nanoparticles Assembled from Natural-Based Steroid Lipid for İmproved İntracellular Transport of Sirna and Pdna, *Nanomaterials*, 2016, **6**(4), 69.

[27] Quinones J. P., Brüggemann O., Covas C. P., Hydrophobically-Modified Chitosan Microspheres for Release of Diosgenin, *International Journal of Nanoparticle Research,* 2018, **11**(2:3), 12.

[28] Liao A. M., Jung H., Yu J. W., Lee D. H., Park S. S., Cai B., Chun C., Synthesis and Biological Evaluation of Arginyl–Diosgenin Conjugate as A Potential Bone Tissue Engineering Agent, *Chemical Biology & Drug Design*, 2018, **91**(1), 17-28.

[29] Li C., Dai J., Zheng D., Zhao J., Tao Y., Lei J., Xi X., Liu J., An Efficient Prodrug-Based Nanoscale Delivery Platform Constructed by Water Soluble Eight-Arm-Polyethylene Glycol-Diosgenin Conjugate, *Materials Science And Engineering: C*, 2019, **98**, 153-160.

[30] Qiao W., Wang B., Wang Y., Yang L., Zhang Y., Shao P., Cancer Therapy Based on Nanomaterials and Nanocarrier Systems, *Journal of Nanomaterials*, DOI: 10.1155/2010/796303.

[31] Suri S. S., Fenniri H., Singh B., Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems, *Journal of Occupational Medicine And Toxicology*, 2007, **2**(1), 16.

[32] Rekha M., Sharma C. P., Nanoparticle Mediated Oral Delivery Of Peptides And Proteins: Challenges and Perspectives, Editor: Chris Van Der Walle, *Peptide And Protein Delivery,* Academic Press, Massachusetts, 165-194, 2011.

[33] Lee, J. H., Yeo Y., Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers, *Chemical Engineering Science,* 2015, **125**, 75-84.

[34] Zhang Y., Wang C., Huang Y., Yan H., Liu K., Core-Crosslinked Polymeric Micelles with High Doxorubicin Loading Capacity and Intracellular pH-and Redox-Triggered Payload Release, *European Polymer Journal,* 2015, **68**, 104-114.

[35] Tiwari G., Tiwari R., Sriwastawa B., Bhati L., Pandey S., Pandey P., Bannerjee S. K., Drug Delivery Systems: An Updated Review, *International Journal of Pharmaceutical Investigation,* 2012, **2**(1), 2-11.

[36] Krishnaswamy K., Orsat V., *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 2017.

[37] Mohapatra S., Ranjan S., Dasgupta N., Mishra R. K., Thomas S., Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems, Editors: Shyam S. M., Shivendu R., Nandita C., Raghwandra K. M., Sabu T., *Nanoscience and Nanotechnology İn Drug Delivery*, Elsevier, Amsterdam, 15-33, 2018.

[38] Yadav H. K., Almokdad A. A., Sumia I., Debe M. S., Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers, Editor: Shyam S. M., Shivendu R., Nandita C., Raghwandra K. M., Sabu T., *Nanocarriers for Drug Delivery*, Elsevier, Amsterdam, 531-556, 2019.

[39] Sinha V., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A., Poly-ε-Caprolactone Microspheres And Nanospheres: An Overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, **278**(1), 1-23.

[40] Burdıck J. A., Stevens M. M., Biomedical Hydrogels, Editors: Larry L. H., Julian R. J., *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, Elsevier, Amsterdam, 2005, 107-115.

[41] Ivanova E. P., Bazaka K., Crawford R. J., *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*, 1st ed., Woodhead Publishing, New Delhi, 2014.

[42] Syed I., Garg S., Sarkar P., Entrapment of Essential Oils in Hydrogels for Biomedical Applications, Editor: Kunal P., Indranil B., *Polymeric Gels*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 125-141, 2018.

[43] Sosnik, A., Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art, *ISRN Pharmaceutics*, DOI: 10.1155/2014/926157.

[44] Yang Y., Fang Z., Chen X., Zhang W., Xie Y., Chen Y., Liu Z., Yuan W., An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications, *Frontiers in Pharmacology*, DOI: 10.3389/Fphar.2017.00287.

[45] Chevalier, Y., Bolzinger M. A., Emulsions Stabilized with Solid Nanoparticles: Pickering Emulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, **439**, 23-34.

[46] Dickinson E., Stabilising Emulsion Based Colloidal Structures with Mixed Food İngredients, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, **93**(4), 710-721.

[47] Shawakfeh K. Q., Al Said N. H., Synthesis of New Symmetrical Bis-Steroidal Pyrazine Analogues from Diosgenin, *Steroids*, 2011, **76**(3), 232-237.

[48] Chaosuancharoen N., Kongkathip N., Kongkathip B., A Novel Synthetic Approach from Diosgenin to A 17α Hydroxy Orthoester via A Regio and Stereo Specific Rearrangement of An Epoxy Ester, *Synthetic Communications*, 2004, **34**(6), 961-983.

[49] Zhao Q., Qian C., Chen X. Z., N-Hydroxyphthalimide Catalyzed Allylic Oxidation of Steroids with t-Butyl Hydroperoxide, *Steroids*, 2015, **94**, 1-6.

[50] Zhang Y., Li Y., Zhu S., Guan H., Lin F., Yu B., Synthesis of Bidesmosidic Dihydrodiosgenin Saponins Bearing A 3-O-B-Chacotriosyl Moiety, *Carbohydrate Research*, 2004, **339**(10), 1753-1759.

[51] Iglesias Arteaga M. A., Perez Gil R., Lara V. L., Perez Martinez C. S., Manchado F. C., Perez A. R., Rios L. P., Synthesis of (22R, 25R)-3β, 26-dihydroxy-5α-furostan-6-one, *Synthetic Communications* 1998, **28**(8), 1381-1386.

[52] Yang R., Zhang S., Kong D., Gao X., Zhao Y., Wang Z., Biodegradable Polymer-Curcumin Conjugate Micelles Enhance the Loading and Delivery of Low-Potency Curcumin, *Pharmaceutical Research*, 2012, **29**(12), 3512-3525.

[53] Quiram G., Montagner F., Palmer K., Stefan M., Washington K., Rodrigues D., Novel Chlorhexidine-Loaded Polymeric Nanoparticles for Root Canal Treatment, *Journal of Functional Biomaterials*, 2018, **9**(2), 29.

[54] Tang Y., Yang S., Zhang N., Zhang J., Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose via Low-Intensity Ultrasonic-Assisted Sulfuric Acid Hydrolysis, *Cellulose*, 2014, **21**(1), 335-346.

[55] Ngwabebhoh F. A., Erdem A., Yildiz U., A Design Optimization Study on Synthesized Nanocrystalline Cellulose, Evaluation and Surface Modification as A Potential Biomaterial for Prospective Biomedical Applications, *International Journal Of Biological Macromolecules*, 2018, **114**, 536-546.

[56] Lin N., Geze A., Wouessidjewe D., Huang J., Dufresne A., Biocompatible Double-Membrane Hydrogels from Cationic Cellulose Nanocrystals and Anionic Alginate as Complexing Drugs Codelivery, *ACS Applied Materials & İnterfaces,* 2016, **8**(11), 6880-6889.

[57] Wang J., Wang M., Zheng M., Guo Q., Wang Y., Wang H., Xie X., Huang F., Gong R., Folate Mediated Self-Assembled Phytosterol-Alginate Nanoparticles for Targeted Intracellular Anticancer Drug Delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, **129**, 63-70.

[58] Ngwabebhoh F. A., Erdagi S. I., Yildiz U., Pickering Emulsions Stabilized Nanocellulosic-Based Nanoparticles for Coumarin and Curcumin Nanoencapsulations: in Vitro Release, Anticancer and Antimicrobial Activities, *Carbohydrate Polymers*, 2018, **201**, 317-328.

[59] Choi A. Y., Kim C. T., Park H. Y., Kim H. O., Lee N. R., Lee K. E., Gwak H. S., Pharmacokinetic Characteristics of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Fabricated with Alginate and Chitosan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(9), 2096-2102.

[60] Lee S. J., Mcclements D. J., Fabrication of Protein-Stabilized Nanoemulsions Using A Combined Homogenization and Amphiphilic Solvent Dissolution/Evaporation Approach, *Food Hydrocolloids*, 2010, **24**(6-7), 560-569.

[61] Oppenauer R., Eine Methode Der Dehydrierung Von Sekundären Alkoholen Zu Ketonen. I. Zur Herstellung Von Sterinketonen Und Sexualhormonen, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Paysbas*, 1937, **56**(2), 137-144.

[62] Mylvaganam M., Meng L. J., Lingwood C., Oxidation of Glycosphingolipids Under Basic Conditions: Synthesis of Glycosyl "Serine Acids" as Opposed to "Ceramide Acids". Precursors for Neoglycoconjugates with Increased Ligand Binding Affinity, *Biochemistry*, 1999, **38**(33), 10885-10897.

[63] Goswami L. N., Ethirajan M., Dobhal M. P., Zhang M., Missert J. R., Shibata M., Kadish K. M., Pandey R. K., Remarkable Features Of The Mcmurry Reaction Conditions in Dimerization of Formyl-And 2-Formylvinylpurpurinimides. Electrochemistry of Monomeric Ni (II) Purpurinimide and the Corresponding Dyads, *The Journal of Organic Chemistry*, 2008, **74**(2), 568-579.

[64] Shawakfeh K. Q., Al Said N. H., Al Zoubi R. M., Synthesis of bis-Diosgenin Pyrazine Dimers: New Cephalostatin Analogs, *Steroids*, 2008, **73**(6), 579-584.

[65] Zheng S., Huang J. T. J., Knatko E. V., Sharp S., Higgins M., Ojima I., Dinkova Kostova A. T., Honda T., Synthesis Of $^{13}C^{15}N$ Labeled Anti İnflammatory and Cytoprotective Tricyclic Bis (Cyanoenone) ([$^{13}C^{15}N$] TBE 31) As An İnternal Standard for Quantification by Stable Isotope Dilution LC MS Method, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2014, **57**(10), 606-610.

[66] Ajdukovic J. J., Gasi K. M. P., Jakimov D. S., Klisuric O. R., Jovanovic-Santa S. S., Sakac M. N., Aleksic L. D., Djurendic E. A., Synthesis, Structural Analysis and Antitumor Activity of Novel 17α-Picolyl and 17 (E)-Picolinylidene A-Modified Androstane Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, **23**(7), 1557-1568.

[67] Shi W., Dolai S., Rizk S., Hussain A., Tariq H., Averick S., L'Amoreaux W., El Idrissi A., Banerjee P., Raja K., Synthesis of Monofunctional Curcumin Derivatives, Clicked Curcumin Dimer, and A PAMAM Dendrimer Curcumin Conjugate for Therapeutic Applications, *Organic Letters*, 2007, **9**(26), 5461-5464.

[68] Nishida H., Yamashita M., Nagashima M., Endo T., Tokiwa Y., Synthesis of Metal Free Poly (1,4-Dioxan-2-One) By Enzyme Catalyzed Ring Opening Polymerization, *Journal Of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2000, **38**(9), 1560-1567.

[69] Yuan W., Tang X., Huang X., Zheng S., Synthesis, Characterization and Thermal Properties Of Hexaarmed Star-Shaped Poly (E-Caprolactone)-B-Poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) Initiated with Hydroxyl-Terminated Cyclotriphosphazene, *Polymer,* 2005, **46**(5), 1701-1707.

[70] Banerjee C., Maiti S., Mustafi M., Kuchlyan J., Banik D., Kundu N., Dhara D., Sarkar N., Effect of Encapsulation of Curcumin in Polymeric Nanoparticles: How Efficient to Control ESIPT Process, *Langmuir,* 2014, **30**(36), 10834-10844.

[71] Patra D., Barakat C., Synchronous Fluorescence Spectroscopic Study of Solvatochromic Curcumin Dye, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* 2011, **79**(5), 1034-1041.

[72] Khopde S. M., Indira Priyadarsini K., Palit D. K., Mukherjee T., Effect of Solvent on the Excited State Photophysical Properties of Curcumin, *Photochemistry and Photobiology,* 2000, **72**(5), 625-631.

[73] Gogoi B., Sen Sarma N., Curcumin–Cysteine and Curcumin-Tryptophan Conjugate as Fluorescence Turn on Sensors for Picric Acid in Aqueous Media, *ACS Applied Materials & İnterfaces,* 2015, **7**(21), 11195-11202.

[74] Zhao L., Du J., Duan Y., Zhang H., Yang C., Cao F., Zhai G., Curcumin Loaded Mixed Micelles Composed of Pluronic P123 And F68: Preparation, Optimization and in Vitro Characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 2012, **97**, 101-108.

[75] Song Z., Feng R., Sun M., Guo C., Gao Y., Li L., Zhai G., Curcumin-Loaded PLGA-PEG-PLGA Triblock Copolymeric Micelles: Preparation, Pharmacokinetics and Distribution in Vivo, *Journal Of Colloid and İnterface Science,* 2011, **354**(1), 116-123.

[76] Li J., Liu X., Guo M., Liu Y., Liu S., Yao S., Electrochemical Study of Breast Cancer Cells MCF-7 And Its Application in Evaluating the Effect of Diosgenin, *Analytical Sciences,* 2005, **21**(5), 561-564.

[77] Taebnia N., Morshedi D., Yaghmaei S., Aliakbari F., Rahimi F., Arpanaei A., Curcumin-Loaded Amine-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Inhibit A-Synuclein Fibrillation and Reduce Its Cytotoxicity-Associated Effects, *Langmuir,* 2016, **32**(50), 13394-13402.

[78] Prabaharan M., Grailer J. J., Pilla S., Steeber D. A., Gong S., Folate-Conjugated Amphiphilic Hyperbranched Block Copolymers Based on Boltorn H40, Poly (L-Lactide) and Poly (Ethylene Glycol) for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Biomaterials,* 2009, **30**(16), 3009-3019.

[79] Yadav A. K., Mishra P., Jain S., Mishra P., Mishra A. K., Agrawal G., Preparation and Characterization of HA–PEG–PCL Intelligent Core–Corona Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin, *Journal of Drug Targeting,* 2008, **16**(6), 464-478.

[80] Feng R., Song Z., Zhai G., Preparation and in Vivo Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PCL-PEG-PCL Triblock Copolymeric Nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 4089.

[81] Rutnakornpituk M., Meerod S., Boontha B., Wichai U., Magnetic Core-Bilayer Shell Nanoparticle: A Novel Vehicle for Entrapmentof Poorly Water-Soluble Drugs, *Polymer*, 2009, **50**(15), 3508-3515.

[82] Gou M., Zheng X., Men K., Zhang J., Wang B., Lv L., Wang X., Zhao Y., Luo F., Chen L., Self-Assembled Hydrophobic Honokiol Loaded MPEG-PCL Diblock Copolymer Micelles, *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**(9), 2164-2173.

[83] Danafar H., Rostamizadeh K., Davaran S., Hamidi M., Co-Delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs by Micelles: A New Approach Using Drug Conjugated PEG–Pclnanoparticles, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, **43**(11), 1908-1918.

[84] Manjili H. K., Ghasemi P., Malvandi H., Mousavi M. S., Attari E., Danafar H., Pharmacokinetics and in Vivo Delivery of Curcumin by Copolymeric MPEG-PCL Micelles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, **116**, 17-30.

[85] Ramazani F., Chen W., Van Nostrum C., Storm G., Kiessling F., Lammers T., Hennink W. E., Kok R., Formulation and Characterization of Microspheres Loaded with Imatinib for Sustained Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, **482**(1-2), 123-130.

[86] Gong C., Wei X., Wang X., Wang Y., Guo G., Mao Y., Luo F., Qian Z., Biodegradable Self-Assembled PEG–PCL–PEG Micelles for Hydrophobic Honokiol Delivery: I. Preparation and Characterization, *Nanotechnology*, DOI: 10.1088/0957-4484/21/21/215103.

[87] Budhian A., Siegel S. J., Winey K. I., Haloperidol-Loaded PLGA Nanoparticles: Systematic Study of Particle Size and Drug Content, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **336**(2), 367-375.

[88] Sharma N., Madan P., Lin S., Effect Of Process and Formulation Variables on the Preparation of Parenteral Paclitaxel-Loaded Biodegradable Polymeric Nanoparticles: A Co-Surfactant Study, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, **11**(3), 404-416.

[89] Gou M., Zheng L., Peng X., Men K., Zheng X., Zeng S., Guo G., Luo F., Zhao X., Chen L., Poly (Ɛ-Caprolactone)–Poly (Ethylene Glycol)–Poly (ε-Caprolactone)(PCL–PEG–PCL) Nanoparticles for Honokiol Delivery in Vitro, *International Journal Of Pharmaceutics*, 2009, **375**(1-2), 170-176.

[90] Marslin G., Revina A. M., Khandelwal V. K. M., Balakumar K., Prakash J., Franklin G., Sheeba C. J., Delivery As Nanoparticles Reduces Imatinib Mesylate-Induced Cardiotoxicity and Improves Anticancer Activity, *International Journal of Nanomedicine,* 2015, **10**, 3163-3170.

[91] Li X., Li R., Qian X., Ding Y., Tu Y., Guo R., Hu Y., Jiang X., Guo W., Liu B., Superior Antitumor Efficiency of Cisplatin-Loaded Nanoparticles by Intratumoral Delivery with Decreased Tumor Metabolism Rate, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 2008, **70**(3), 726-734.

[92] Cortese B., D'Amone S., Gigli G., Palama I. E., Sustained Anti-BCR-ABL Activity with pH Responsive Imatinib Mesylate Loaded PCL Nanoparticles in CML Cells, *Medchemcomm,* 2015, **6**(1), 212-221.

[93] Zhao P., Wang H., Yu M., Liao Z., Wang X., Zhang F., Ji W., Wu B., Han J., Zhang H., Paclitaxel Loaded Folic Acid Targeted Nanoparticles of Mixed Lipid-Shell and Polymer-Core: in Vitro and in Vivo Evaluation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 2012, **81**(2), 248-256.

[94] Garinot M., Fievez V., Pourcelle V., Stoffelbach F., Des Rieux A., Plapied L., Theate I., Freichels H., Jerome C., Marchand Brynaert J., Pegylated PLGA-Based Nanoparticles Targeting M Cells for Oral Vaccination, *Journal of Controlled Release,* 2007, **120**(3), 195-204.

[95] Sadat Shandiz S. A., Shafiee Ardestani M., Shahbazzadeh D., Assadi A., Ahangari Cohan R., Asgary V., Salehi S., Novel Imatinib-Loaded Silver Nanoparticles for Enhanced Apoptosis of Human Breast Cancer MCF-7 Cells, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 2017, **45**(6), 1082-1091.

[96] Danafar H., Study of the Composition of Polycaprolactone/Poly (Ethylene Glycol)/Polycaprolactone Copolymer and Drug-to-Polymer Ratio on Drug Loading Efficiency of Curcumin to Nanoparticles, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products,* DOI: 10.5812/Jjnpp.34179.

[97] Dhavale R., Waifalkar P., Sharma A., Sahoo S. C., Kollu P., Chougale A., Zahn D., Salvan G., Patil P., Patil P., Monolayer Grafting of Aminosilane on Magnetic Nanoparticles: an Efficient Approach for Targeted Drug Delivery System, *Journal of Colloid and İnterface Science,* 2018, **529**, 415-425.

[98] Xin H., Chen L., Gu J., Ren X., Luo J., Chen Y., Jiang X., Sha X., Fang X., Enhanced Anti-Glioblastoma Efficacy By PTX-Loaded Pegylated Poly (ε-Caprolactone) Nanoparticles: in Vitro And in Vivo Evaluation, *International Journal of Pharmaceutics,* 2010, **402**(1-2), 238-247.

[99] Song Z., Zhu W., Liu N., Yang F., Feng R., Linolenic Acid-Modified PEG-PCL Micelles for Curcumin Delivery, *International Journal of Pharmaceutics,* 2014, **471**(1-2), 312-321.

[100] Liu Y., Fang J., Kim Y. J., Wong M. K., Wang P., Codelivery of Doxorubicin and Paclitaxel by Cross-Linked Multilamellar Liposome Enables Synergistic Antitumor Activity, *Molecular Pharmaceutics,* 2014, **11**(5), 1651-1661.

[101] Shevachman M., Shani A., Garti N., Formation and Investigation of Microemulsions Based on Jojoba Oil and Nonionic Surfactants, *Journal of the American Oil Chemists Society,* 2004, **81**(12), 1143-1152.

[102] Roohinejad S., Oey I., Wen J., Lee S. J., Everett D. W., Burritt D. J., Formulation Of Oil-in-Water b-Carotene Microemulsions: Effect of Oil Type and Fatty Acid Chain Length, *Food Chemistry,* 2015, **174**, 270-278.

[103] Chung H., Kim T. W., Kwon M., Kwon I. C., Jeong S. Y., Oil Components Modulate Physical Characteristics and Function of the Natural Oil Emulsions as Drug or Gene Delivery System, *Journal of Controlled Release,* 2001, **73**(3), 339-350.

[104] Burgos Diaz C., Wandersleben T., Marques A. M., Rubilar M., Multilayer Emulsions Stabilized by Vegetable Proteins and Polysaccharides, *Current Opinion in Colloid & İnterface Science,* 2016, **25**, 51-57.

[105] Burgos Diaz C., Hernandez X., Wandersleben T., Barahona T., Medina C., Quiroz A., Rubilar M., Influence of Multilayer O/W Emulsions Stabilized by Proteins from a Novel Lupin Variety Aluprot-CGNA And Ionic Polysaccharides on D-Limonene Retention During Spray-Drying, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 2018, **536**, 234-241.

[106] Shah B. R., Li Y., Jin W., An Y., He L., Li Z., Xu W., Li B., Preparation and Optimization of Pickering Emulsion Stabilized by Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Curcumin Encapsulation, *Food Hydrocolloids,* 2016, **52**, 369-377.

[107] Guzey D., Mcclements D. J., Formation, Stability And Properties of Multilayer Emulsions for Application in the Food Industry, *Advances in Colloid and Interface Science,* 2006, **128**, 227-248.

[108] Boekhoven J., Zha R. H., Tantakitti F., Zhuang E., Zandi R., Newcomb C. J., Stupp S. I., Alginate–Peptide Amphiphile Core–Shell Microparticles as a Targeted Drug Delivery System, *RSC Advances,* 2015, **5**(12), 8753-8756.

[109] Zuo Q., Guo R., Liu Q., Hong A., Shi Y., Kong Q., Huang Y., He L., Xue W., Heparin-Conjugated Alginate Multilayered Microspheres for Controlled Release of Bfgf, *Biomedical Materials,* 2015, **10**(3), 035008.

[110] Mcclements D. J., Theoretical Prediction of Emulsion Color, *Advances in Colloid and İnterface Science,* 2002, **97**(1-3), 63-89.

[111] Bagheri M., Shateri S., Thermosensitive Nanosized Micelles from Cholesteryl-Modified Hydroxypropyl Cellulose as a Novel Carrier of Hydrophobic Drugs, *Iranian Polymer Journal,* 2012, **21**(6), 365-373.

[112] Quinones J. P., Brüggemann O., Covas C. P., Ossipov D. A., Self-Assembled Hyaluronic Acid Nanoparticles for Controlled Release of Agrochemicals and Diosgenin, *Carbohydrate Polymers,* 2017, **173**, 157-169.

[113] Chen M., Liu Y., Yang W., Li X., Liu L., Zhou Z., Wang Y., Li R., Zhang Q., Preparation and Characterization of Self-Assembled Nanoparticles of 6-O-Cholesterol-Modified Chitosan for Drug Delivery, *Carbohydrate Polymers,* 2011, **84**(4), 1244-1251.

[114] Li J., Xu X., Chen Z., Wang T., Lu Z., Hu W., Wang L., Zein/Gum Arabic Nanoparticle-Stabilized Pickering Emulsion with Thymol as an Antibacterial Delivery System, *Carbohydrate Polymers,* 2018, **200**, 416-426.

[115] Lu X., Xiao J., Huang Q., Pickering Emulsions Stabilized by Media-Milled Starch Particles, *Food Research International,* 2018, **105**, 140-149.

[116] Dou H., Jiang M., Peng H., Chen D., Hong Y., Ph Dependent Self-Assembly: Micellization and Micelle-Hollow-Sphere Transition of Cellulose-Based Copolymers, *Angewandte Chemie International Edition,* 2003, **42**(13), 1516-1519.

[117] Yang L., Zhang B., Wen L., Liang Q., Zhang L. M., Amphiphilic Cholesteryl grafted Sodium Alginate Derivative: Synthesis and Self-Assembly in Aqueous Solution, *Carbohydrate Polymers,* 2007, **68**(2), 218-225.

[118] Zaman M., Xiao H., Chibante F., Ni Y., Synthesis and Characterization of Cationically Modified Nanocrystalline Cellulose, *Carbohydrate Polymers,* 2012, **89**(1), 163-170.

[119] Nguyen M. H., Hwang I. C., Park H. J., Enhanced Photoprotection for Photo-Labile Compounds Using Double-Layer Coated Corn Oil-Nanoemulsions with Chitosan and Lignosulfonate, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* 2013, **125**, 194-201.

[120] Cozza G., Mazzorana M., Papinutto E., Bain J., Elliott M., Di Maira G., Gianoncelli A., Pagano M. A., Sarno S., Ruzzene M., Quinalizarin as a Potent, Selective and Cell-Permeable Inhibitor of Protein Kinase CK2, *Biochemical Journal,* 2009, **421**(3), 387-395.

[121] Zhou Y., Li K., Zhang S., Li Q., Li Z., Zhou F., Dong X., Liu L., Wu G., Meng R., Quinalizarin, a Specific CK2 Inhibitor, Reduces Cell Viability and Suppresses Migration and Accelerates Apoptosis in Different Human Lung Cancer Cell Lines, *Indian Journal Of Cancer,* 2015, **52**(6), 119.

[122] Sun X., Luo Y., Huang L., Yu B. Y., Tian J., A Peptide-Decorated and Curcumin-Loaded Mesoporous Silica Nanomedicine for Effectively Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells, *Rsc Advances,* 2017, **7**(27), 16401-16409.

[123] Zhang, T., Chen Y., Ge Y., Hu Y., Li M., Jin Y., Inhalation Treatment of Primary Lung Cancer Using Liposomal Curcumin Dry Powder Inhalers, *Acta Pharmaceutica Sinica B,* 2018, **8**(3), 440-448.

[124] Cozza G., Venerando A., Sarno S., Pinna L. A., The Selectivity of CK2 Inhibitor Quinalizarin: a Reevaluation, *Biomed Research International,* DOI: 10.1155/2015/734127.

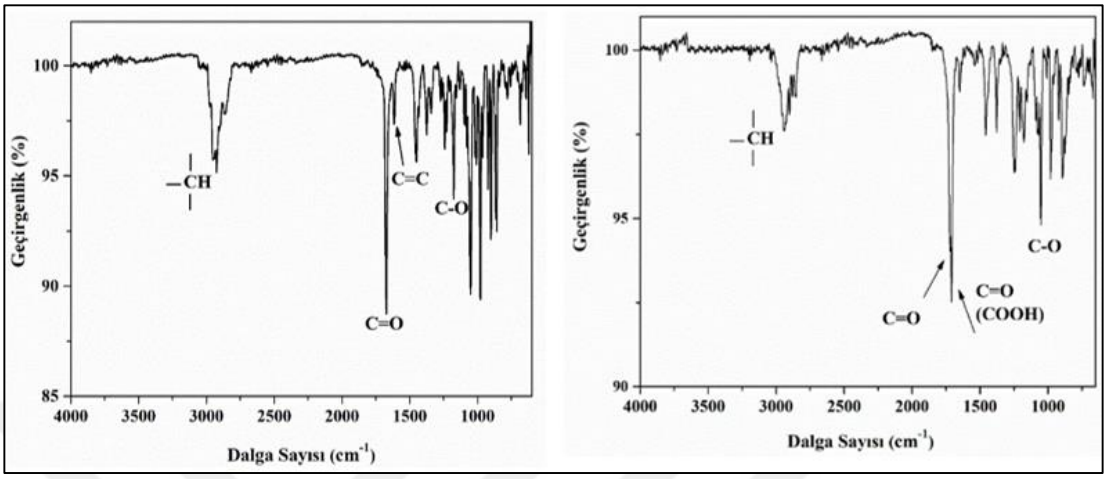
[125] Li W., Huo M., Chaudhuri A. S., Yang C., Cao D., Wu Z., Qi X., Self-Assembled Polyelectrolyte Complexes Films as Efficient Compression Coating Layers for Controlled-Releasing Tablets, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* DOI:10.1007/S10856-017-5886-7.

[126] Okawara M., Hashimoto F., Todo H., Sugibayashi K., Tokudome Y., Effect of Liquid Crystals with Cyclodextrin on the Bioavailability of a Poorly Water-Soluble Compound, Diosgenin, After Its Oral Administration to Rats, *International Journal of Pharmaceutics,* 2014, **472**(1-2), 257-261.

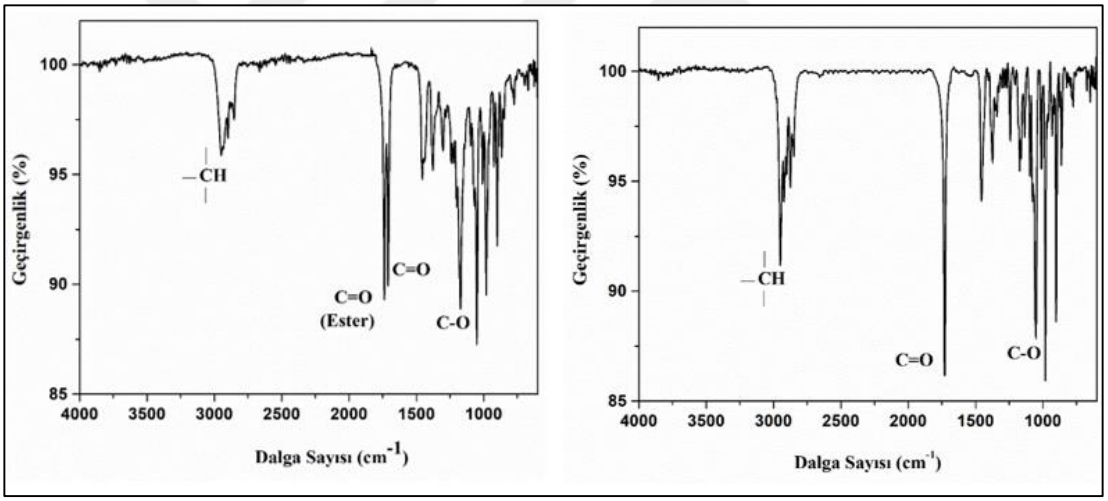
# EKLER

**Ek-A.**

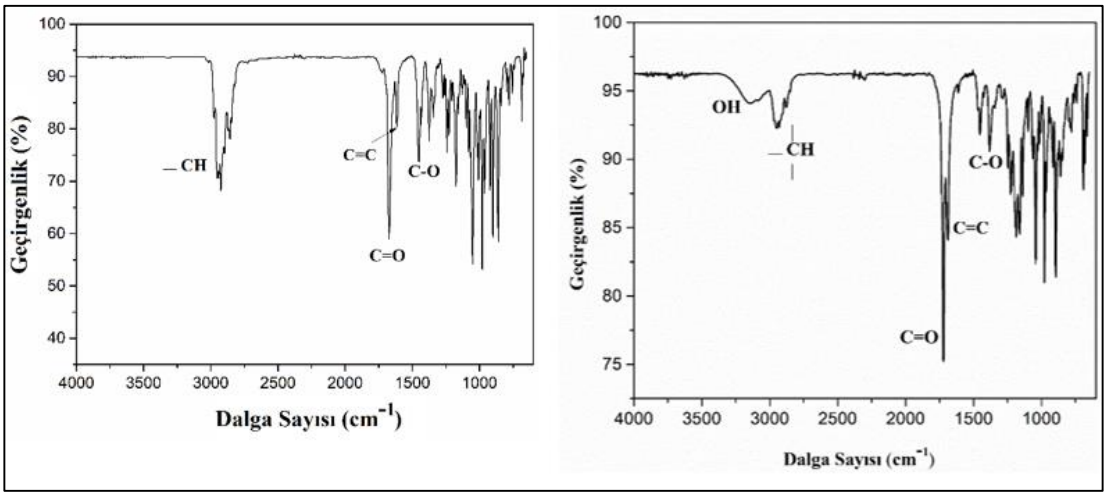
**FTIR Spektrumları**



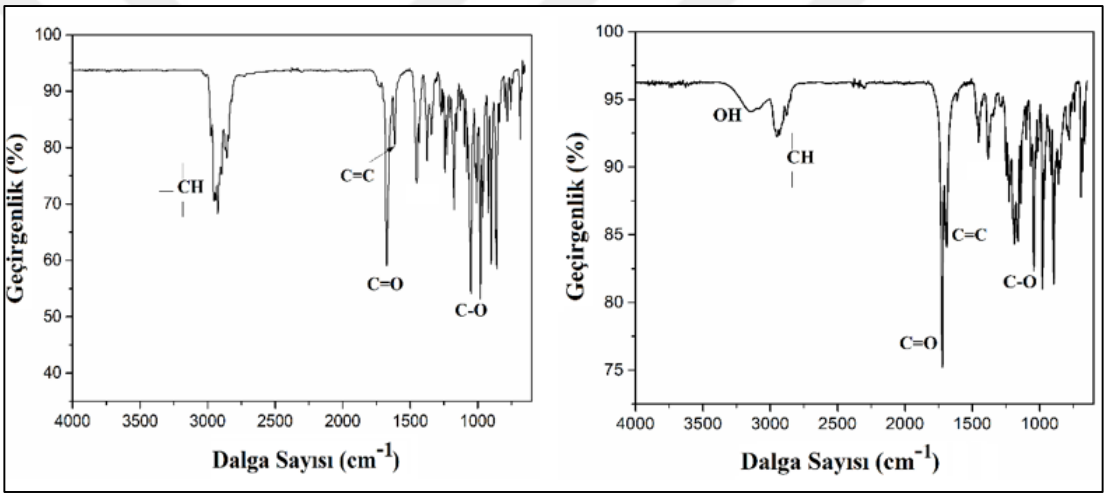

Şekil A.1. Bileşik 1'e ve Bileşik 2'ye ait FTIR spektrumları



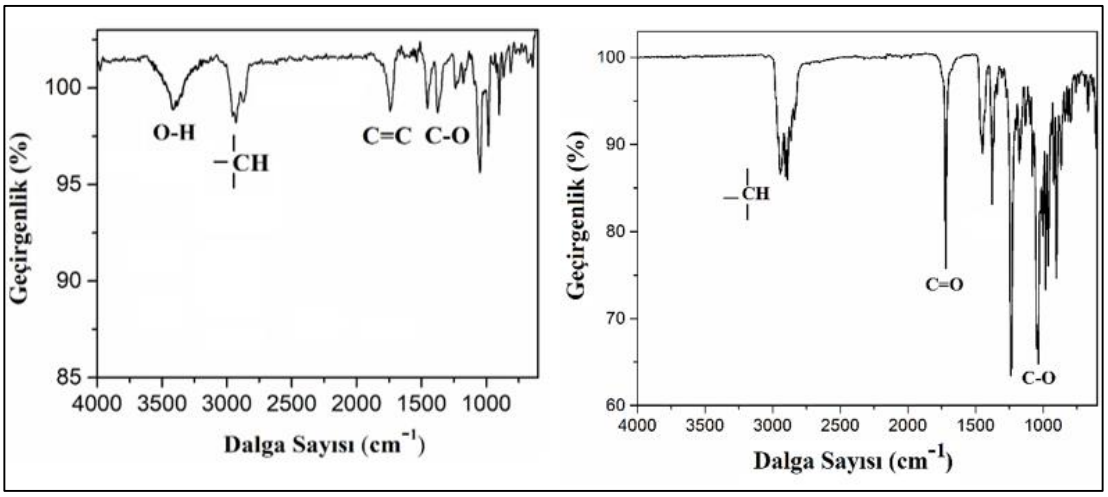

Şekil A.2. Bileşik 3'e ve Bileşik 4'e ait FTIR spektrumları



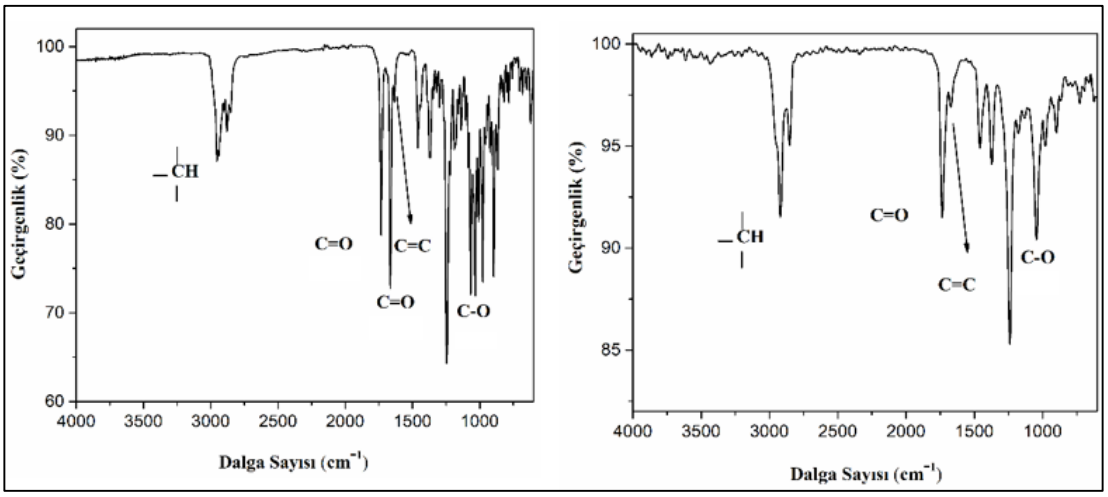

Şekil A.3. Bileşik 5'e ve Bileşik 6'ya ait FTIR spektrumları



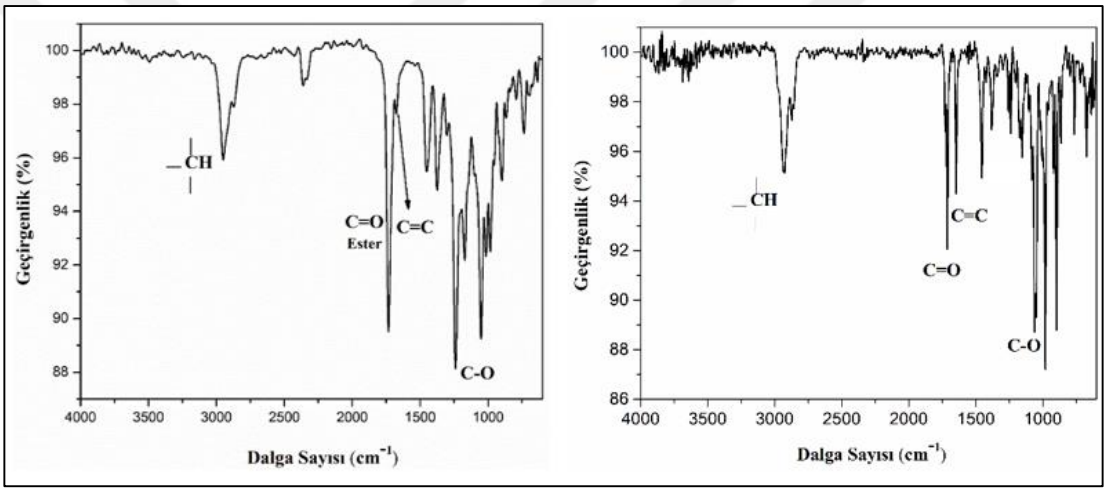

Şekil A.4. Bileşik 7'ye ve Bileşik 8'e ait FTIR spektrumları



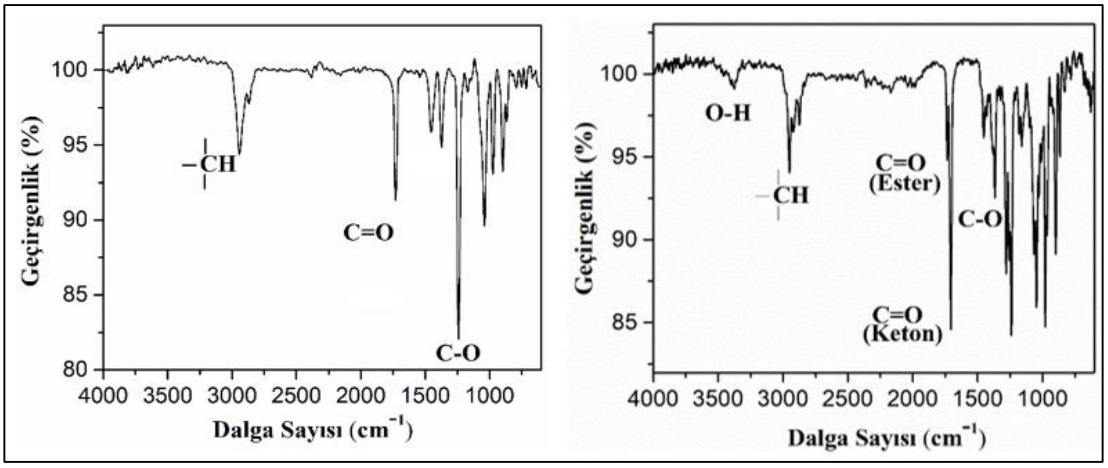

Şekil A.5. Bileşik 9'a ve Bileşik 10'a ait FTIR spektrumları



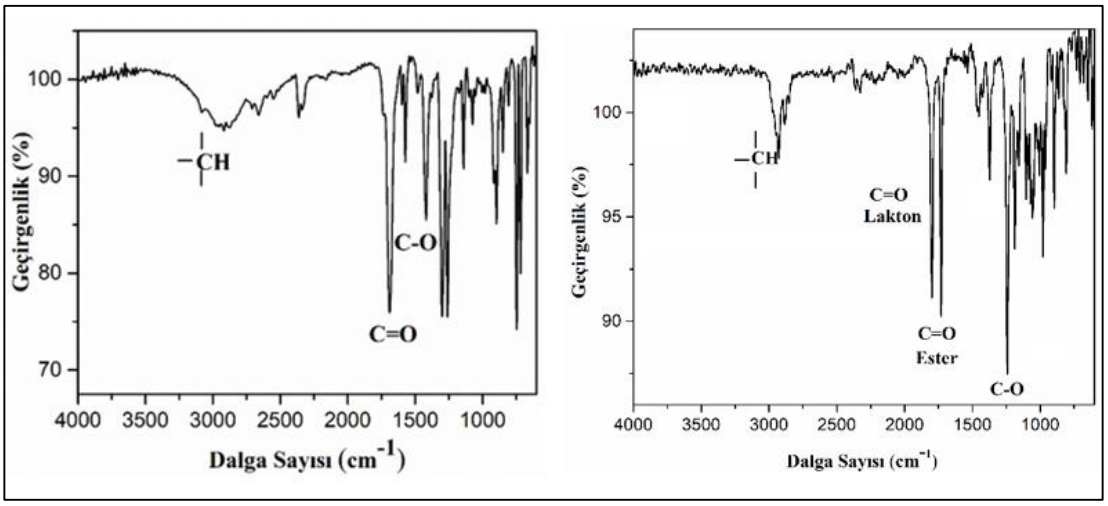

Şekil A.6. Bileşik 11'e ve Bileşik 12'ye ait FTIR spektrumları



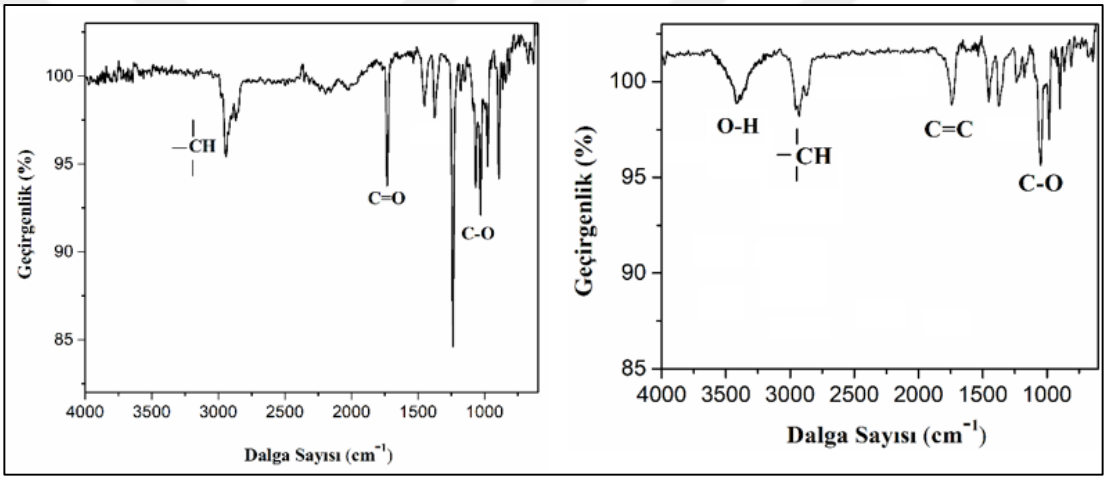

Şekil A.7. Bileşik 13'e ve Bileşik 14'e ait FTIR spektrumları



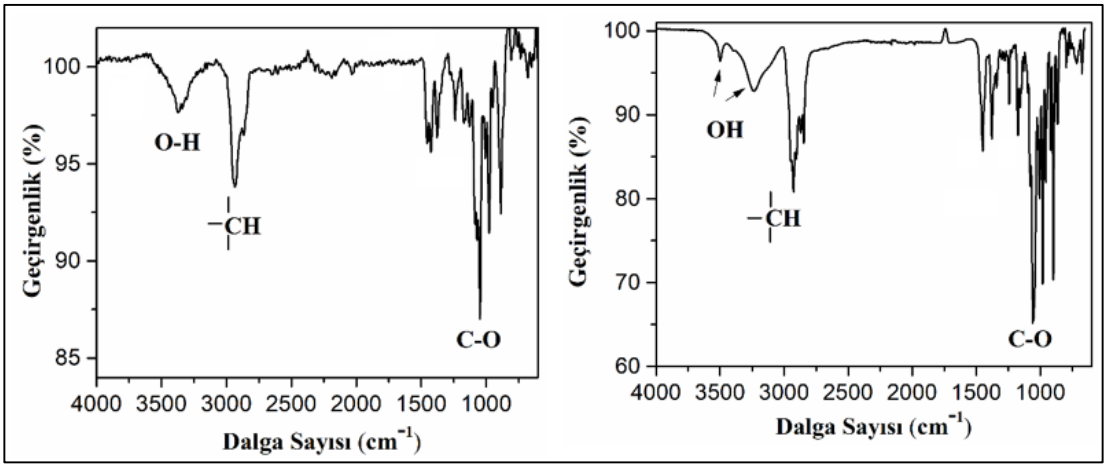

Şekil A8. Bileşik 15'e ve Bileşik 16'ya ait FTIR spektrumları



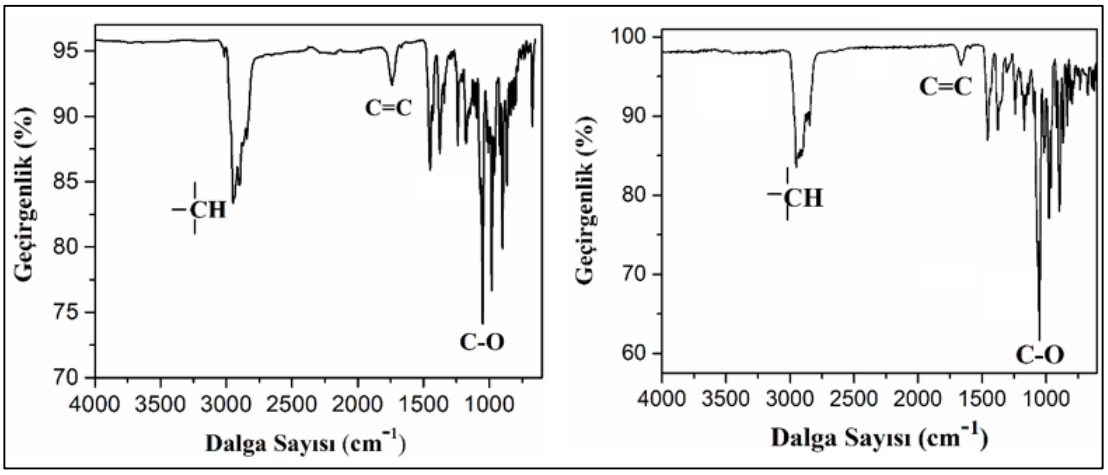

Şekil A.9. Bileşik 17'ye ve Bileşik 18'e ait FTIR spektrumları



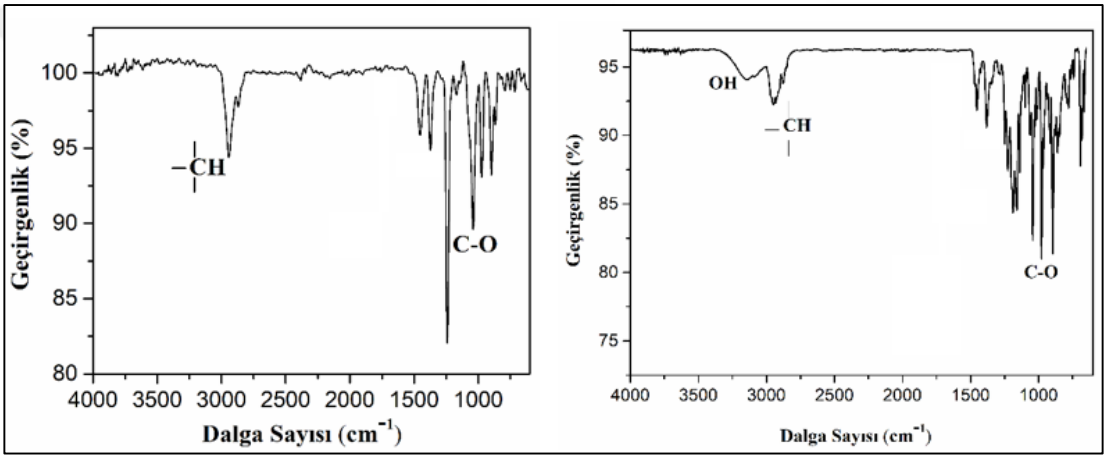

Şekil A.10. Bileşik 19'a ve Bileşik 20'ye ait FTIR spektrumları



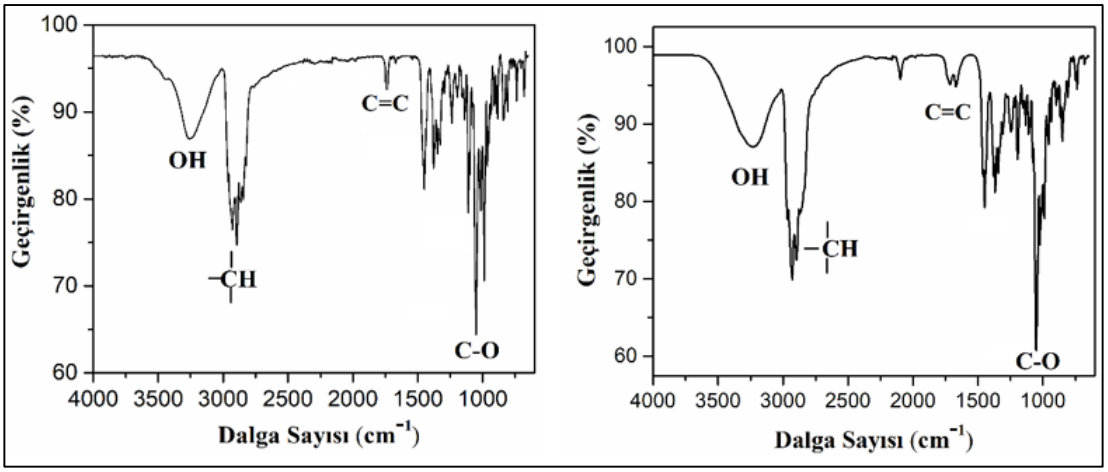

Şekil A.11. Bileşik 21'e ve Bileşik 22'ye ait FTIR spektrumları



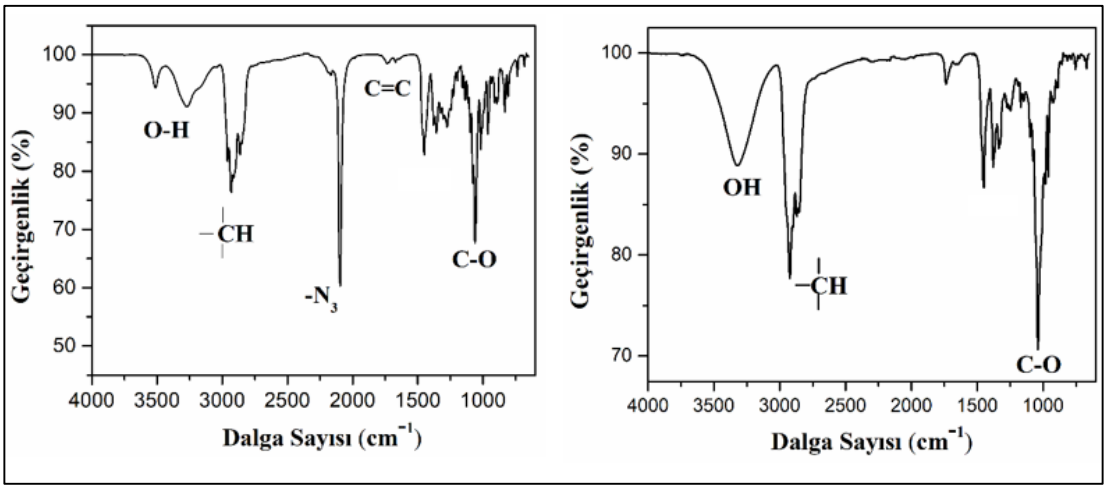

Şekil A.12. Bileşik 24'e ve Bileşik 25'e ait FTIR spektrumları



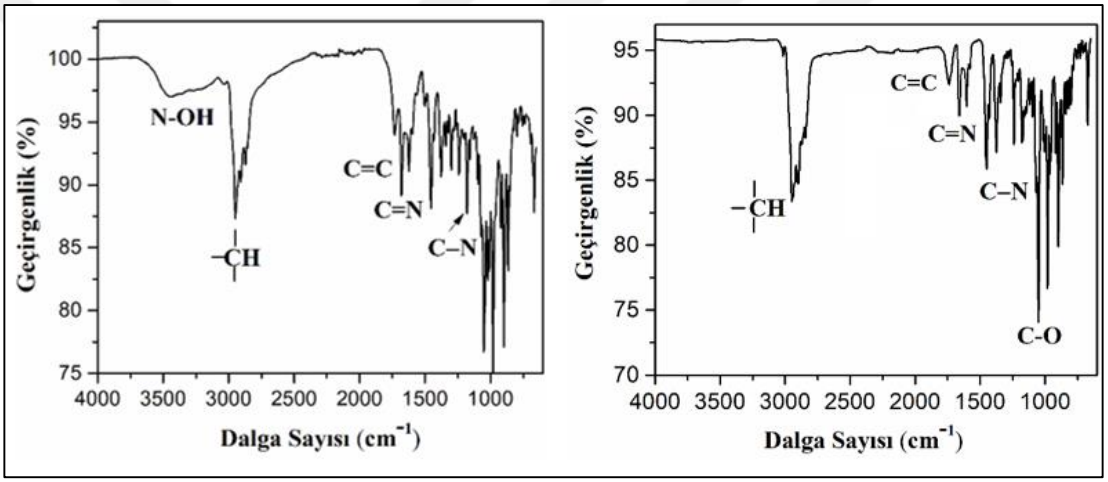

Şekil A.13. Bileşik 26'ya ve Bileşik 27'ye ait FTIR spektrumları



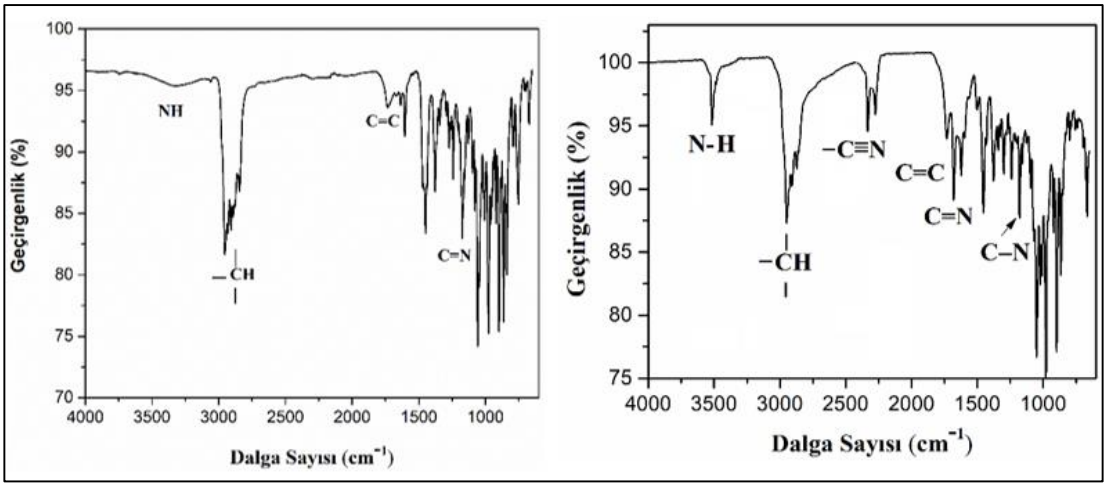

Şekil A.14. Bileşik 28'e ve Bileşik 29'a ait FTIR spektrumları



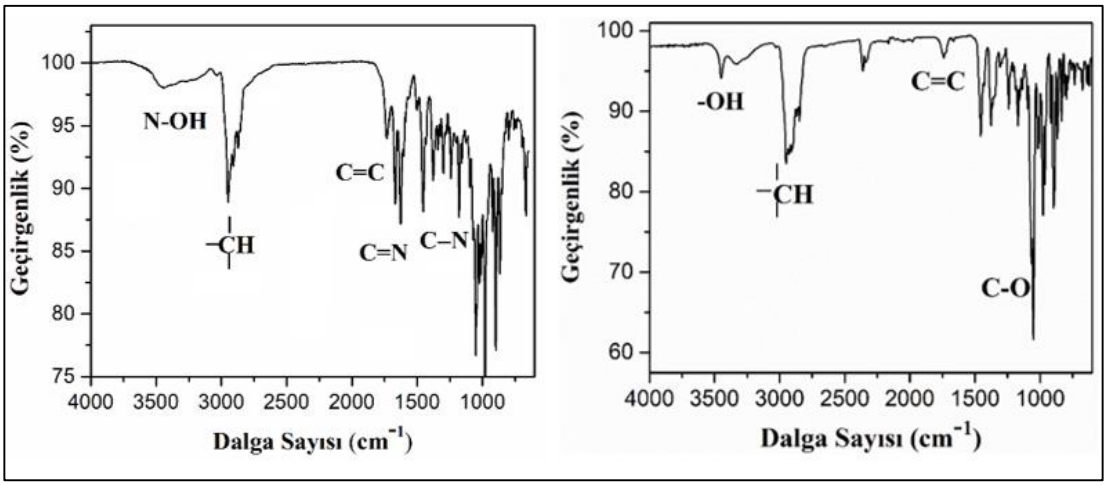

Şekil A.15. Bileşik 30'a ve Bileşik 31'e ait FTIR spektrumları



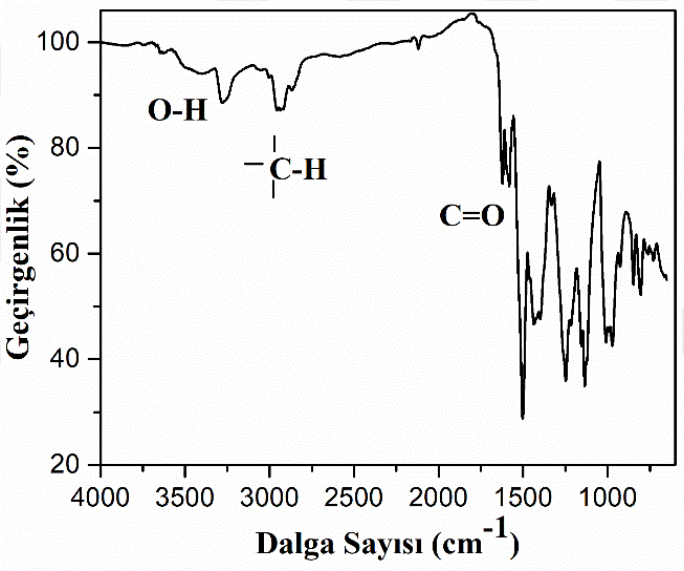

Şekil A.16. Bileşik 32'ye ve Bileşik 33'e ait FTIR spektrumları



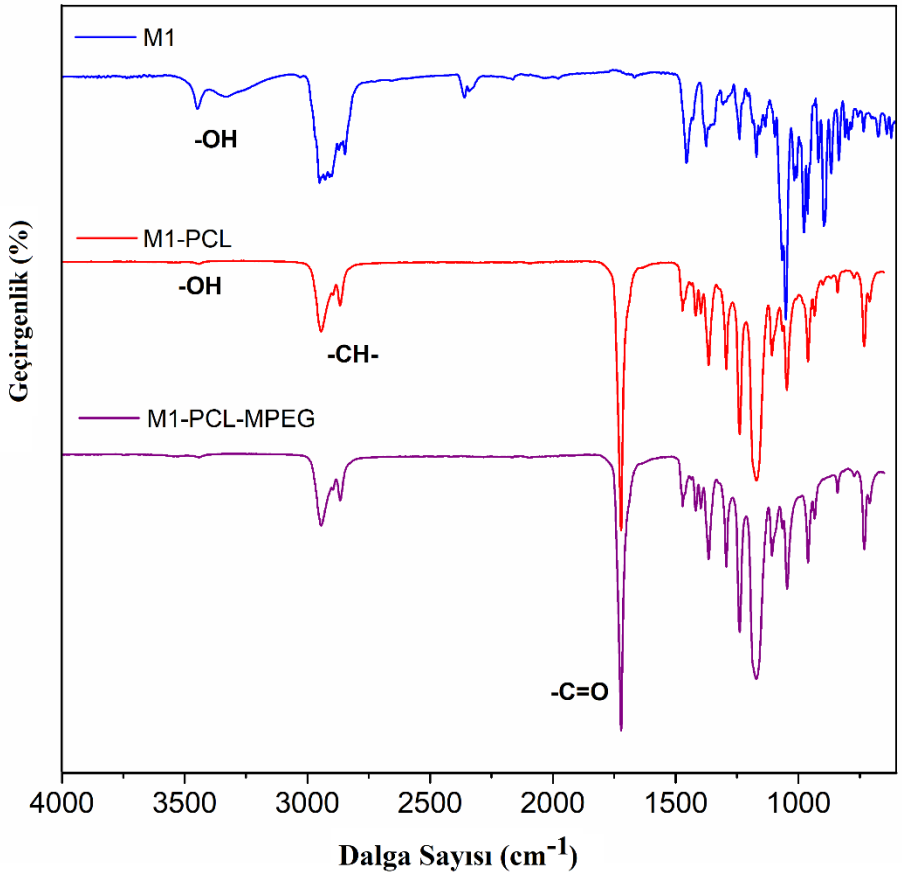

Şekil A.17. Bileşik 34'e ve Bileşik 35'e ait FTIR spektrumları



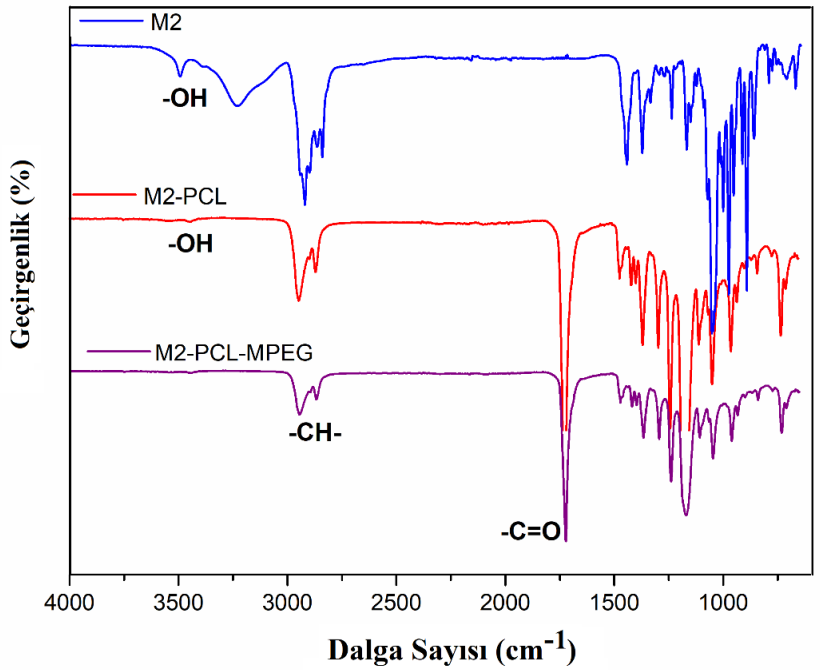

Şekil A.18. Bileşik 36'ya ve Diosgeninine ait FTIR spektrumları



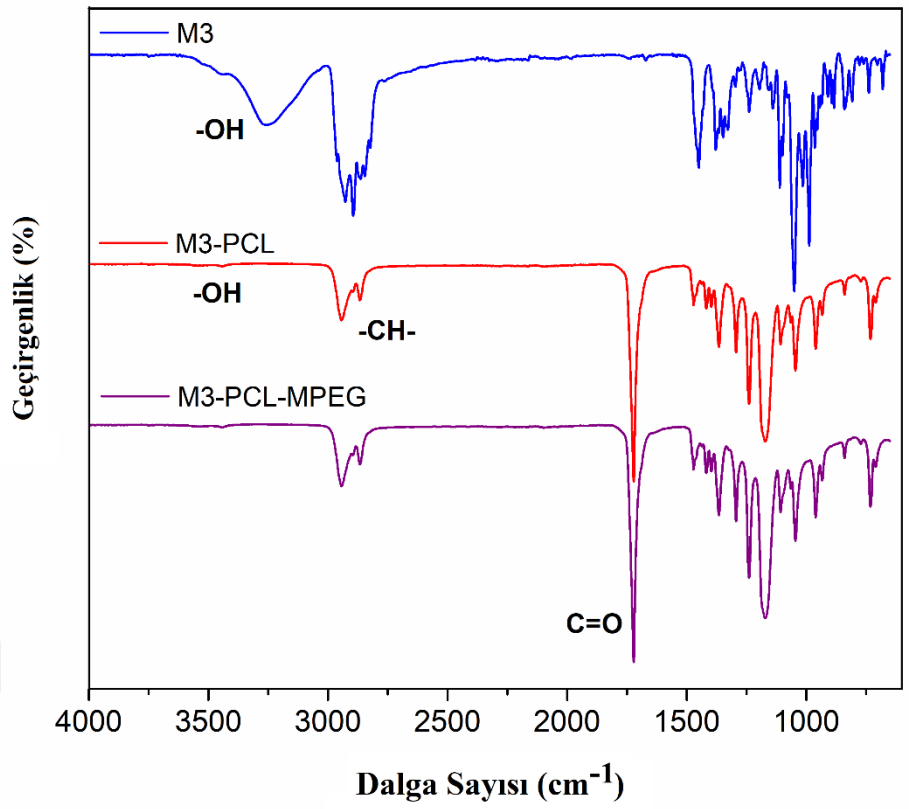

Şekil A.19. CMA'e ait FTIR spektrumu




Şekil A.20. M1-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu FTIR spektrumları



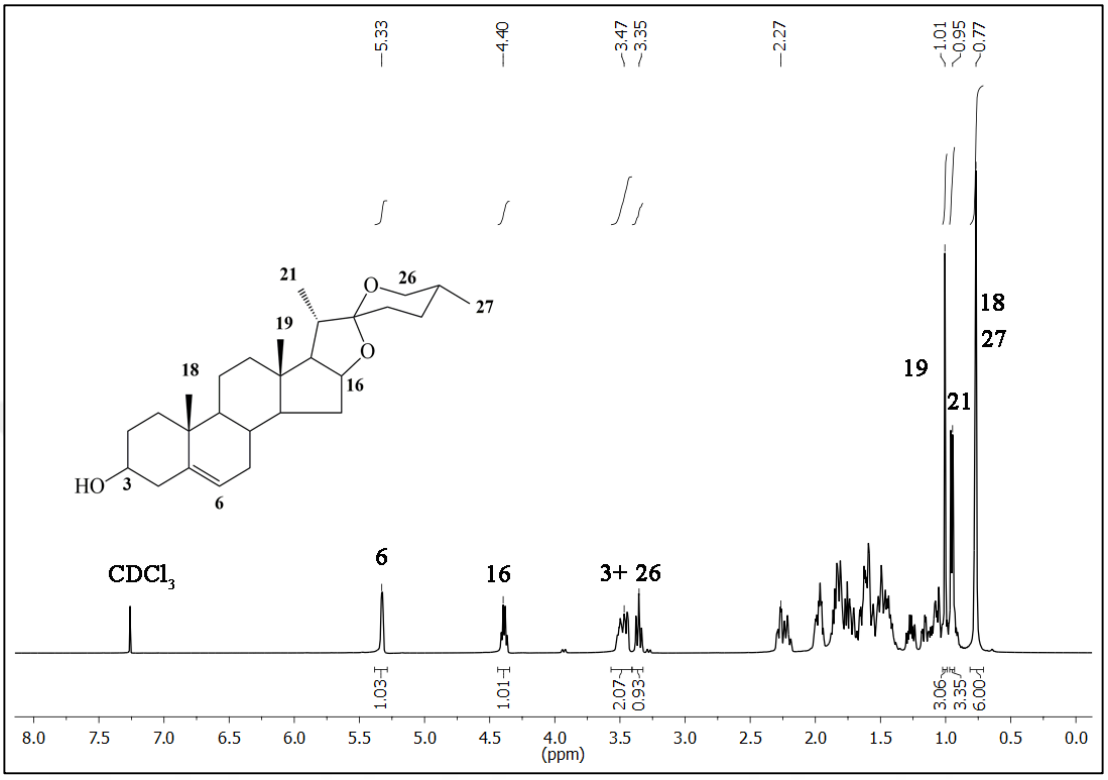

Şekil A.21. M2-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu FTIR spektrumları



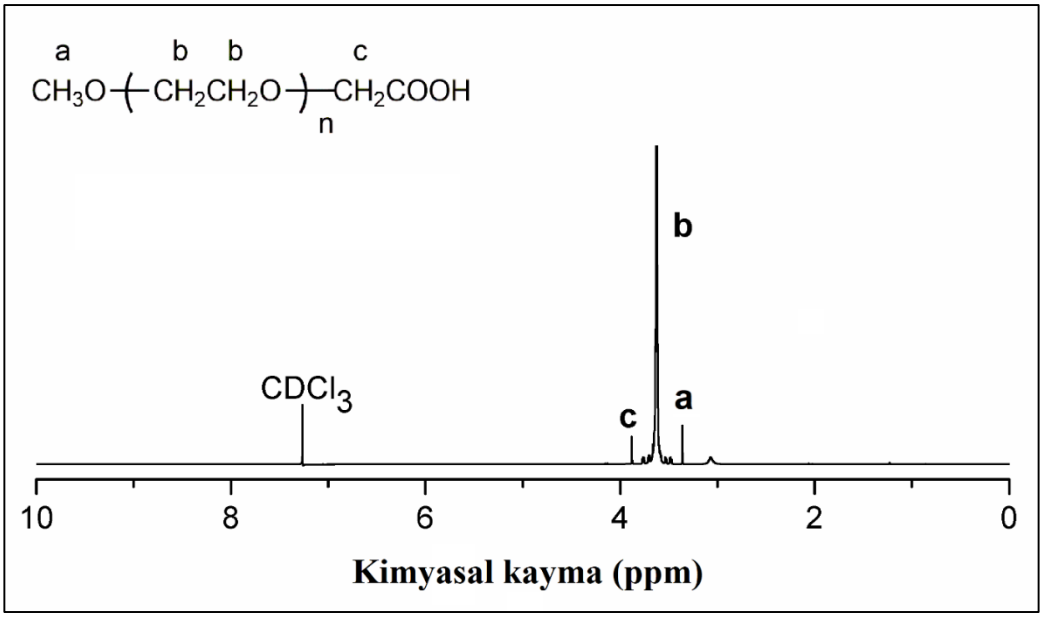

Şekil A.22. M3-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu FTIR spektrumları

## Ek-B

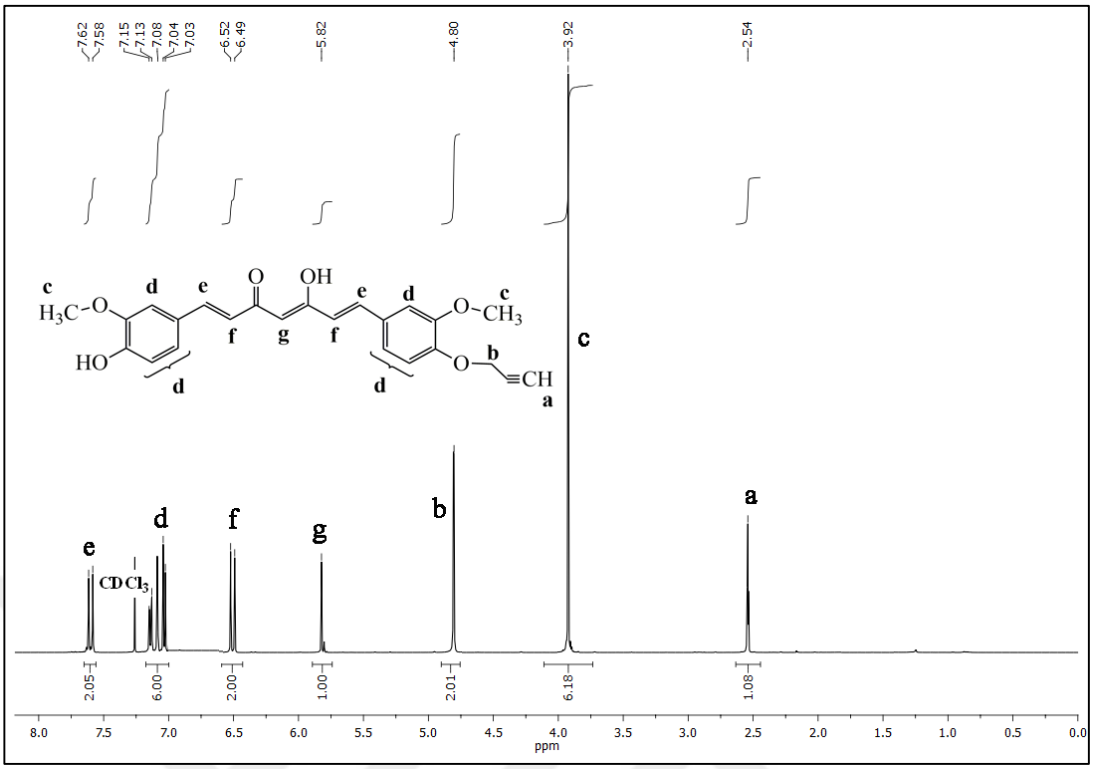
### $^{1}$H-NMR Spektrumları



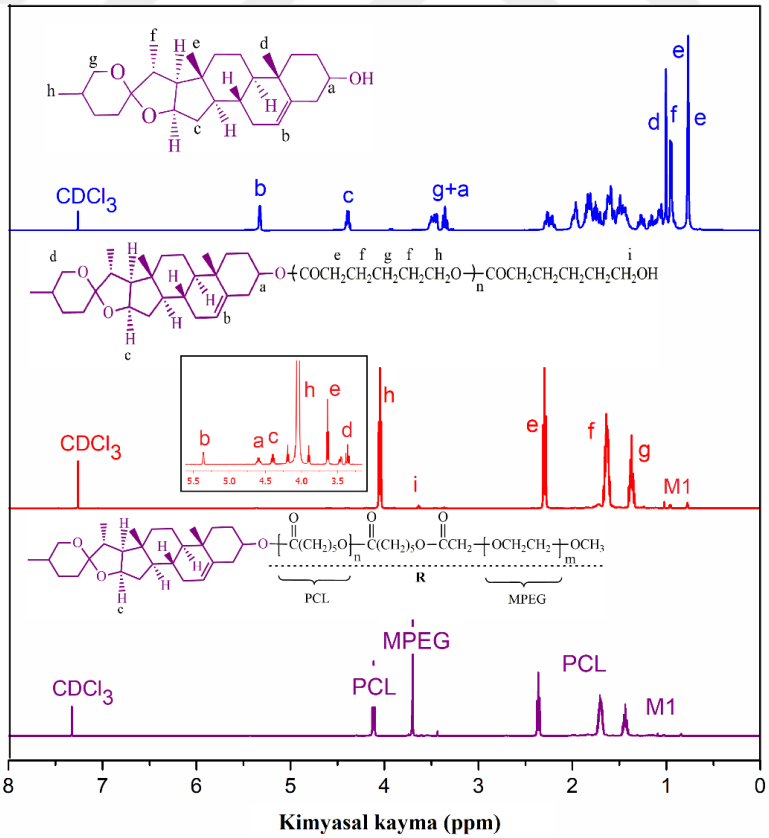

Şekil B.1. Diosgenin $^{1}$H-NMR spektrumu



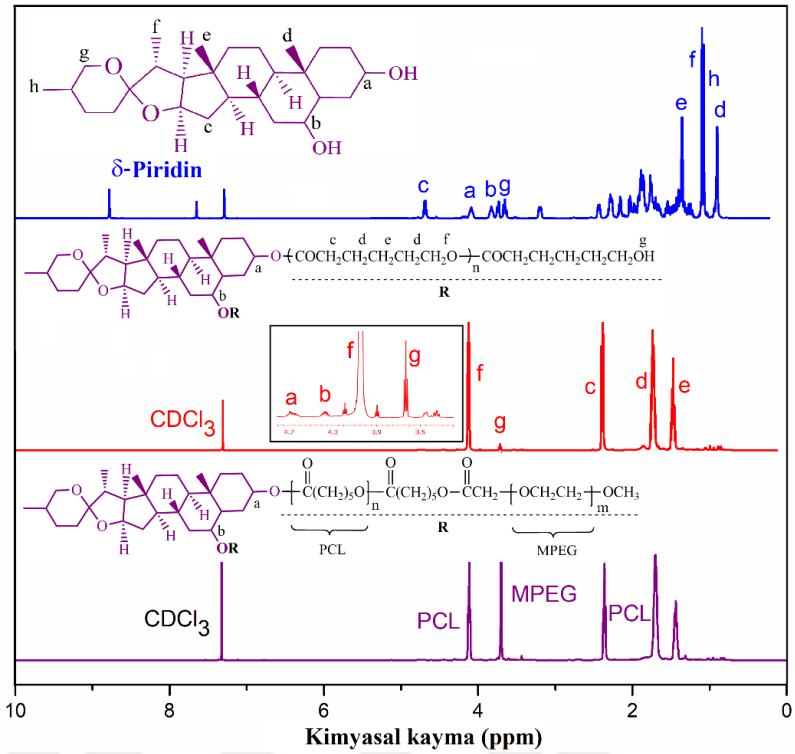

Şekil B.2. mPEG-COOH $^{1}$H-NMR spektrumu



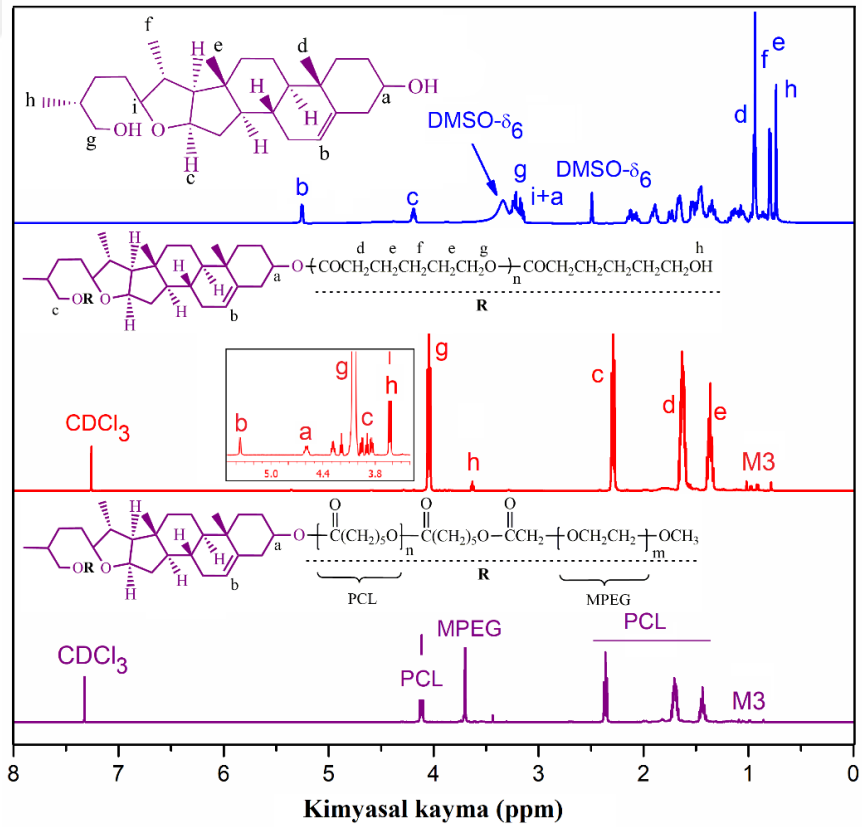

Şekil B.3. CMA'e ait $^{1}$H-NMR spektrumu




Şekil B.4. M1-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu $^{1}$H-NMR spektrumları



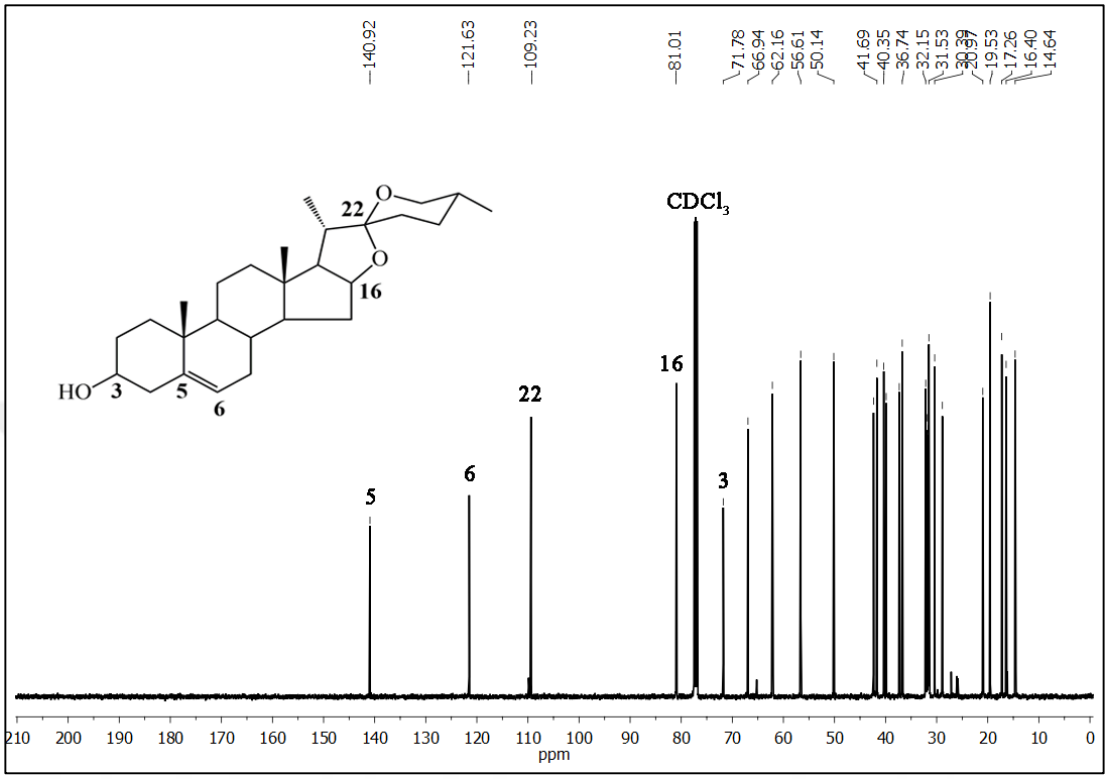

Şekil B.5. M2-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu $^{1}$H-NMR spektrumları



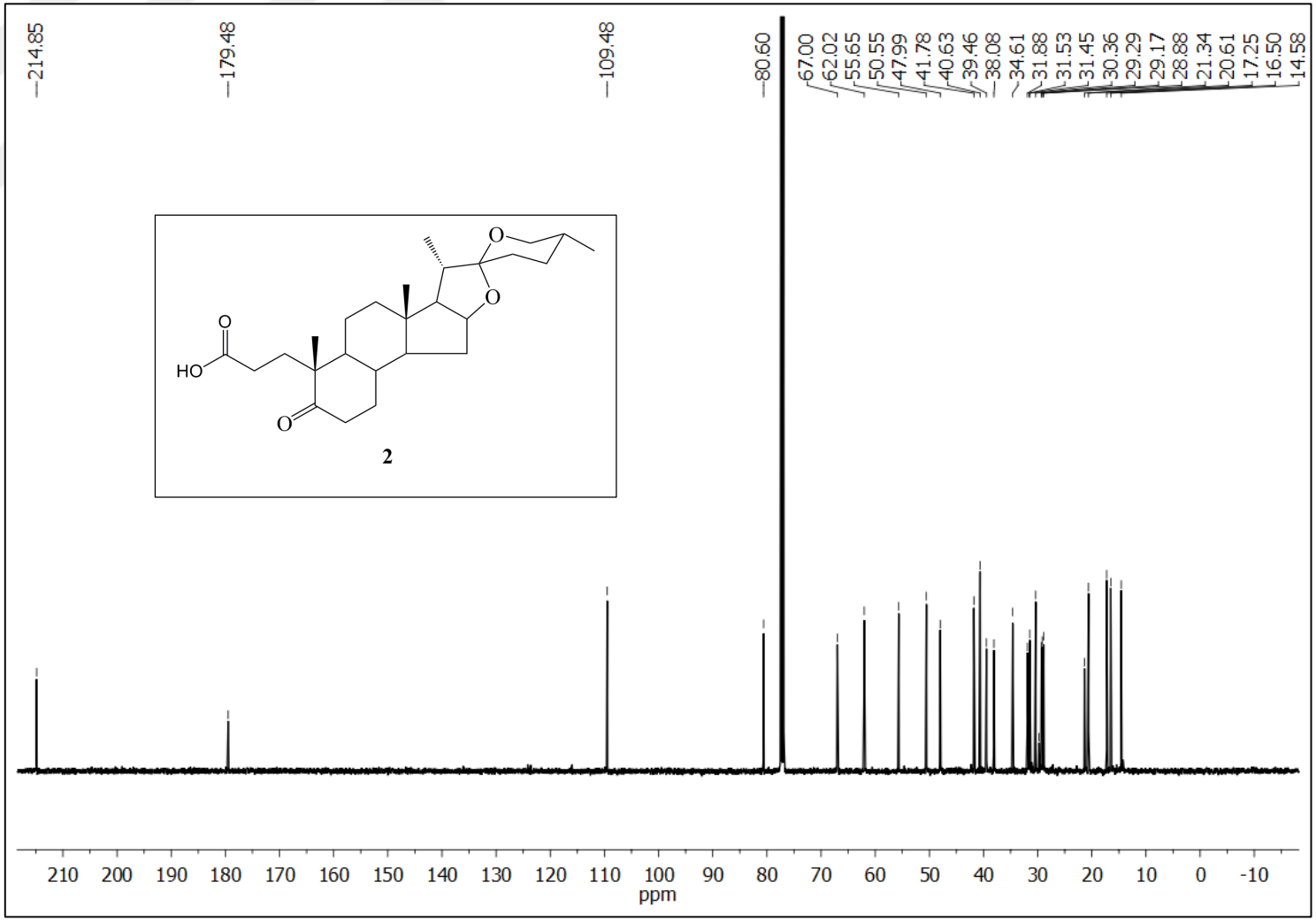

Şekil B.6. M3-PCL-MPEG polimerlerine ait toplu $^{1}$H-NMR spektrumları

## Ek-C

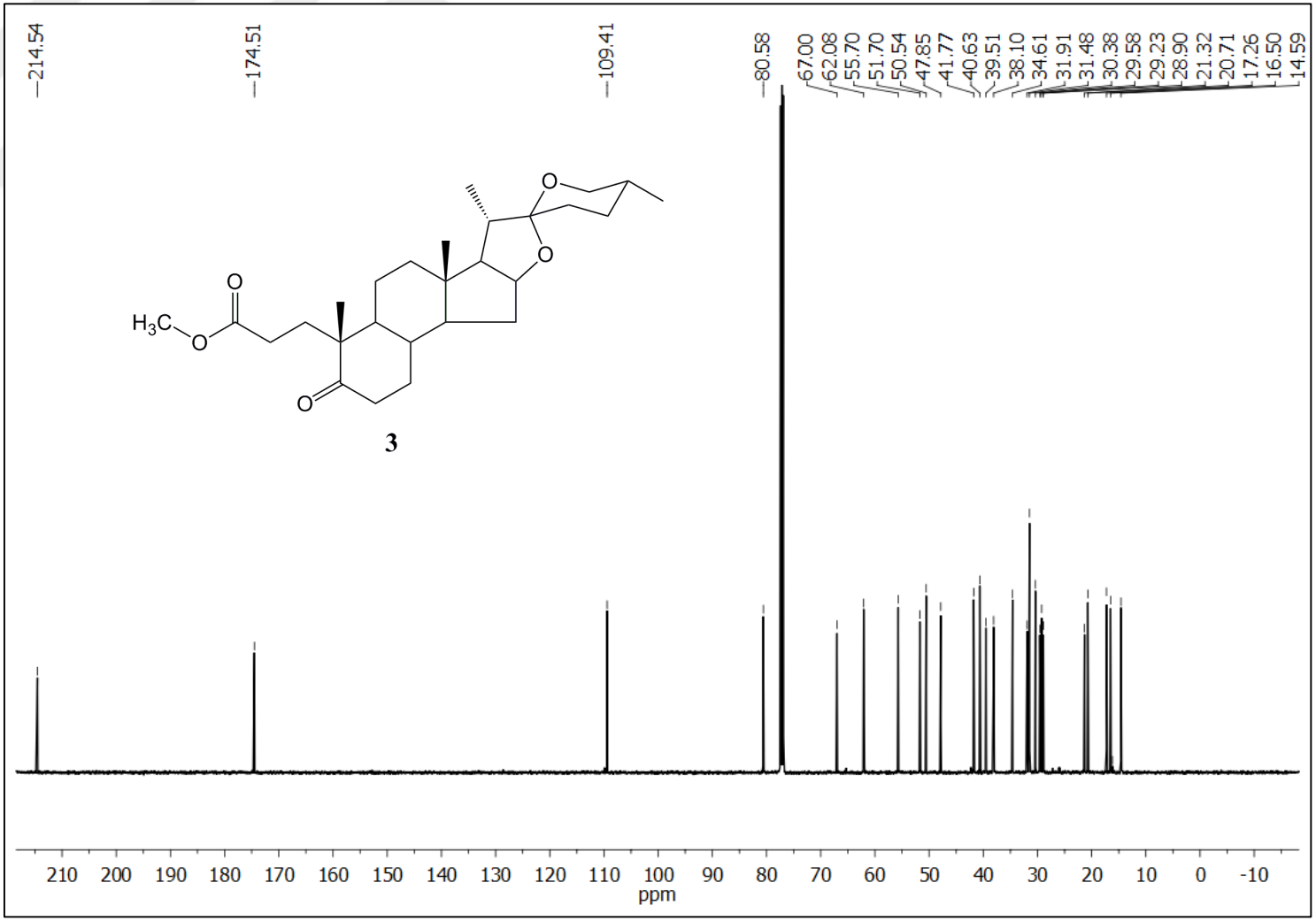
## $^{13}$C-NMR Spektrumları



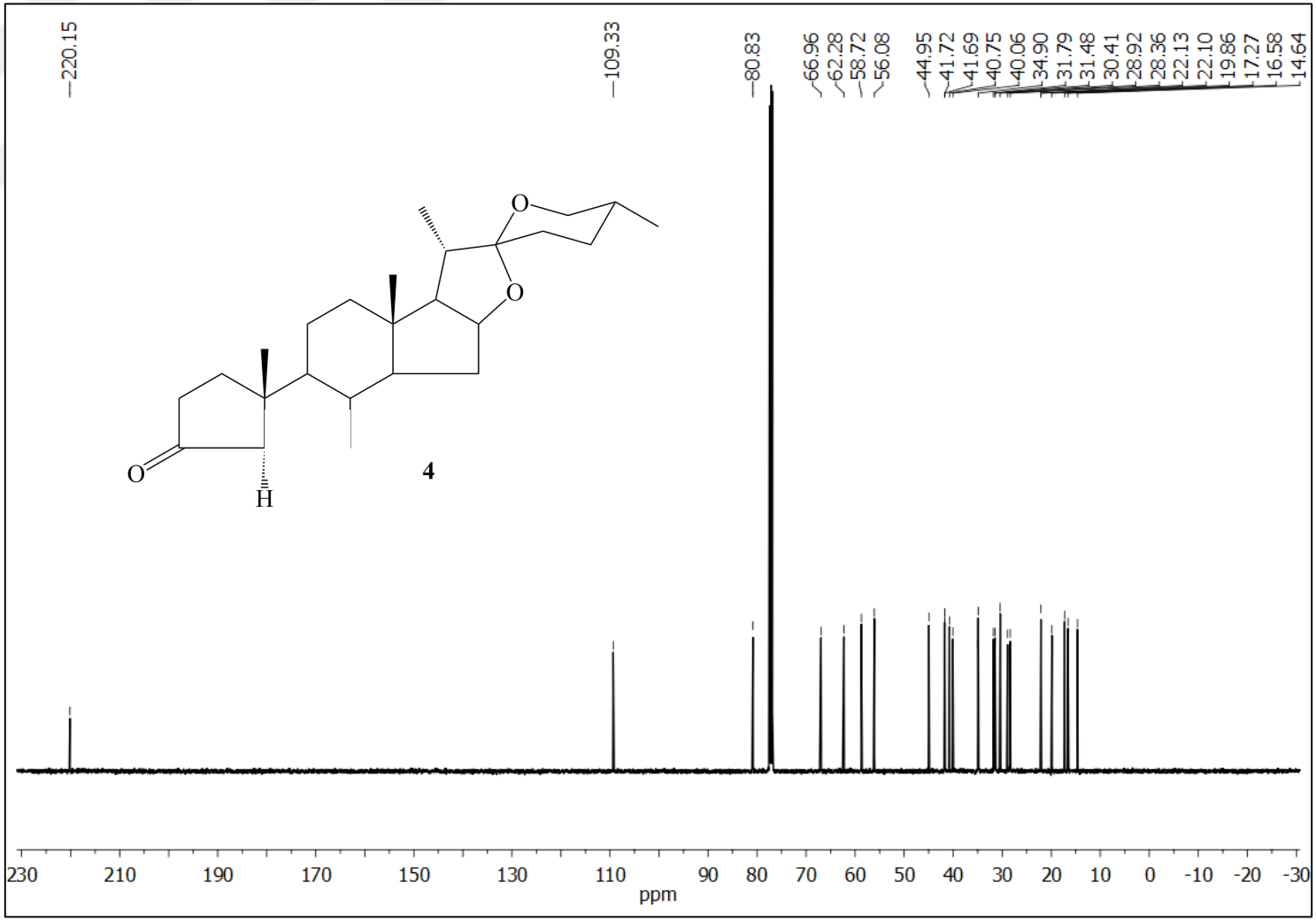

Şekil C.1. Diosgenin $^{13}$C-NMR spektrumu



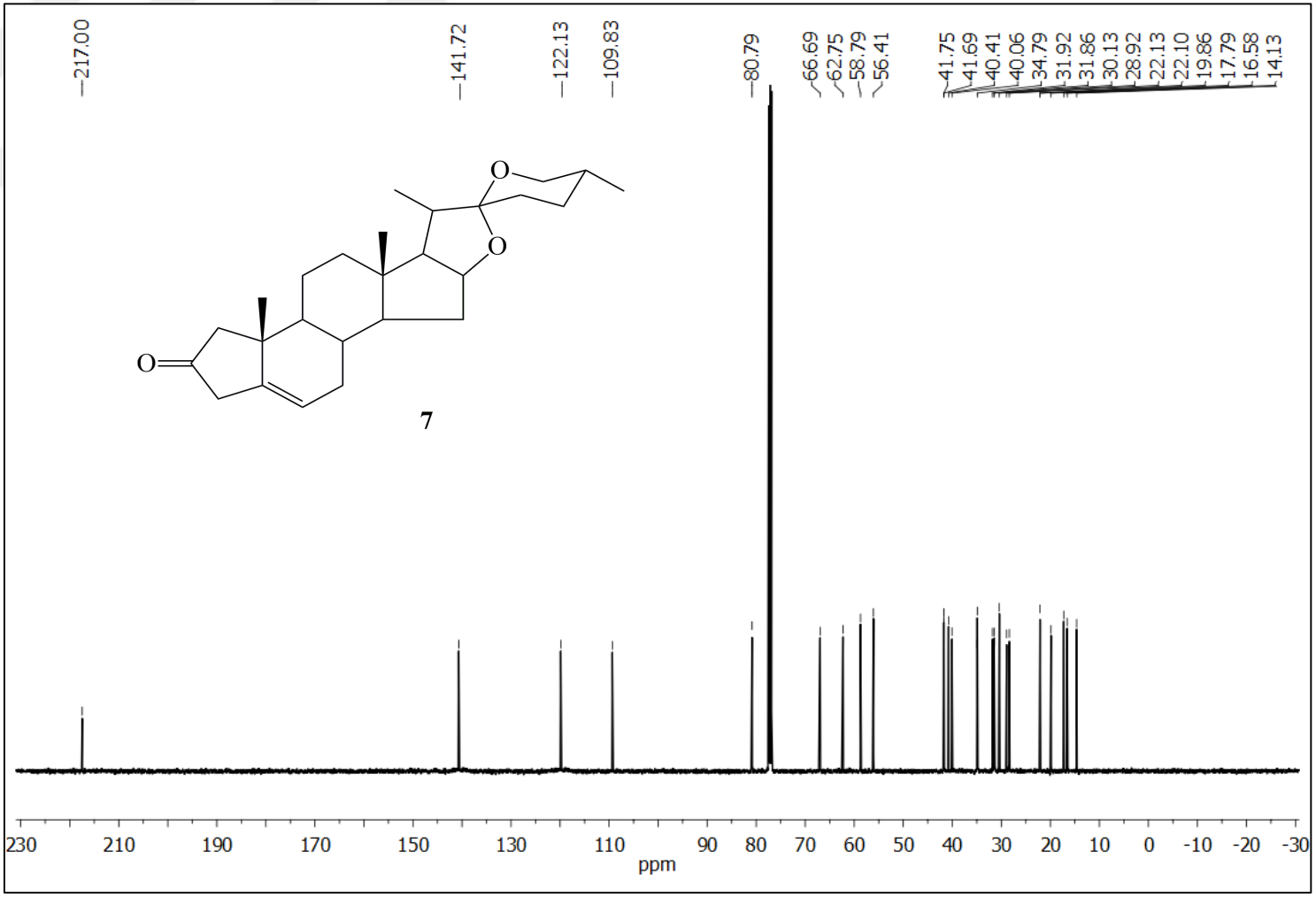

Şekil C.2. Bileşik 2'ye ait $^{13}$C-NMR spektrumu



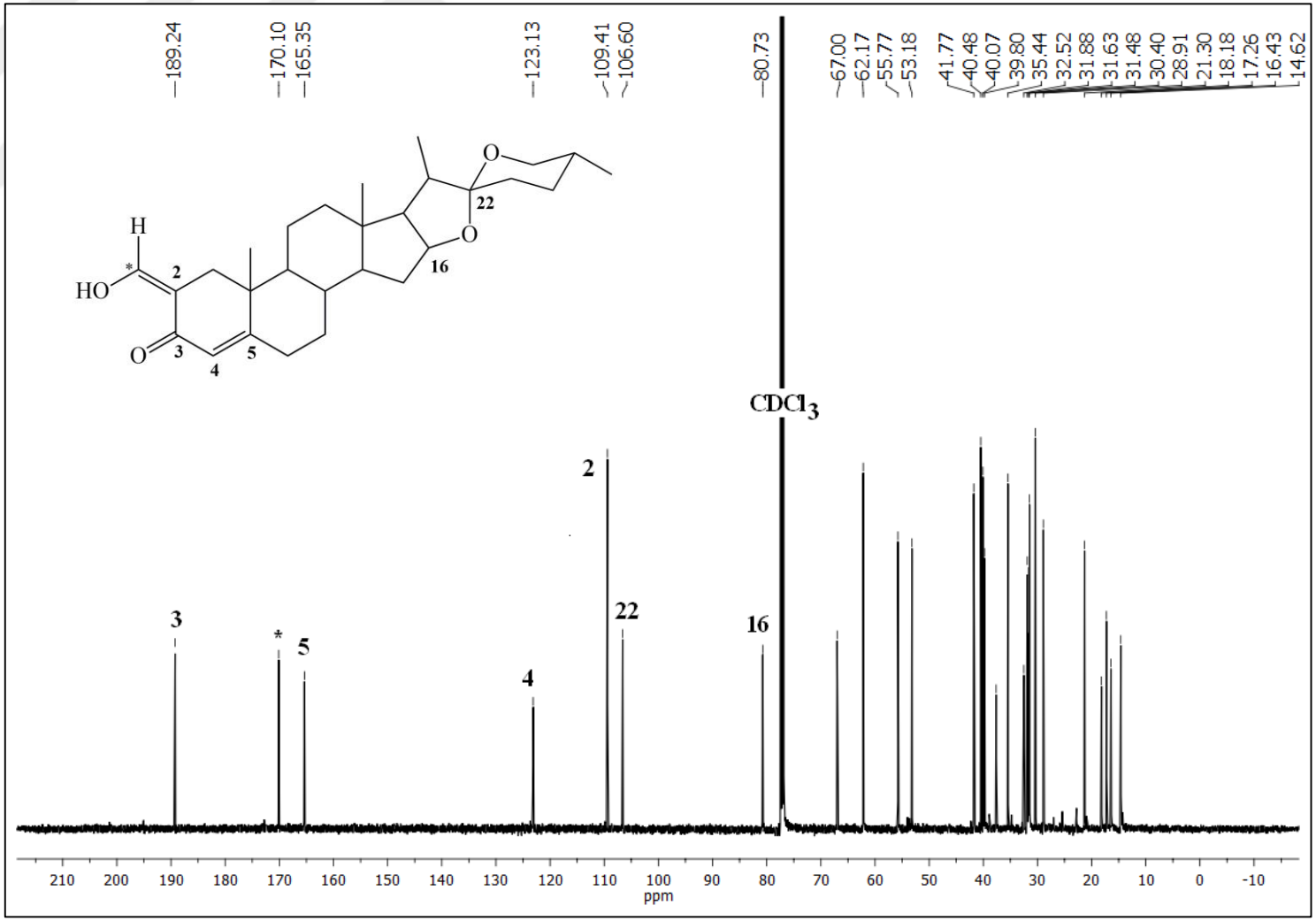

Şekil C.3. Bileşik 3'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



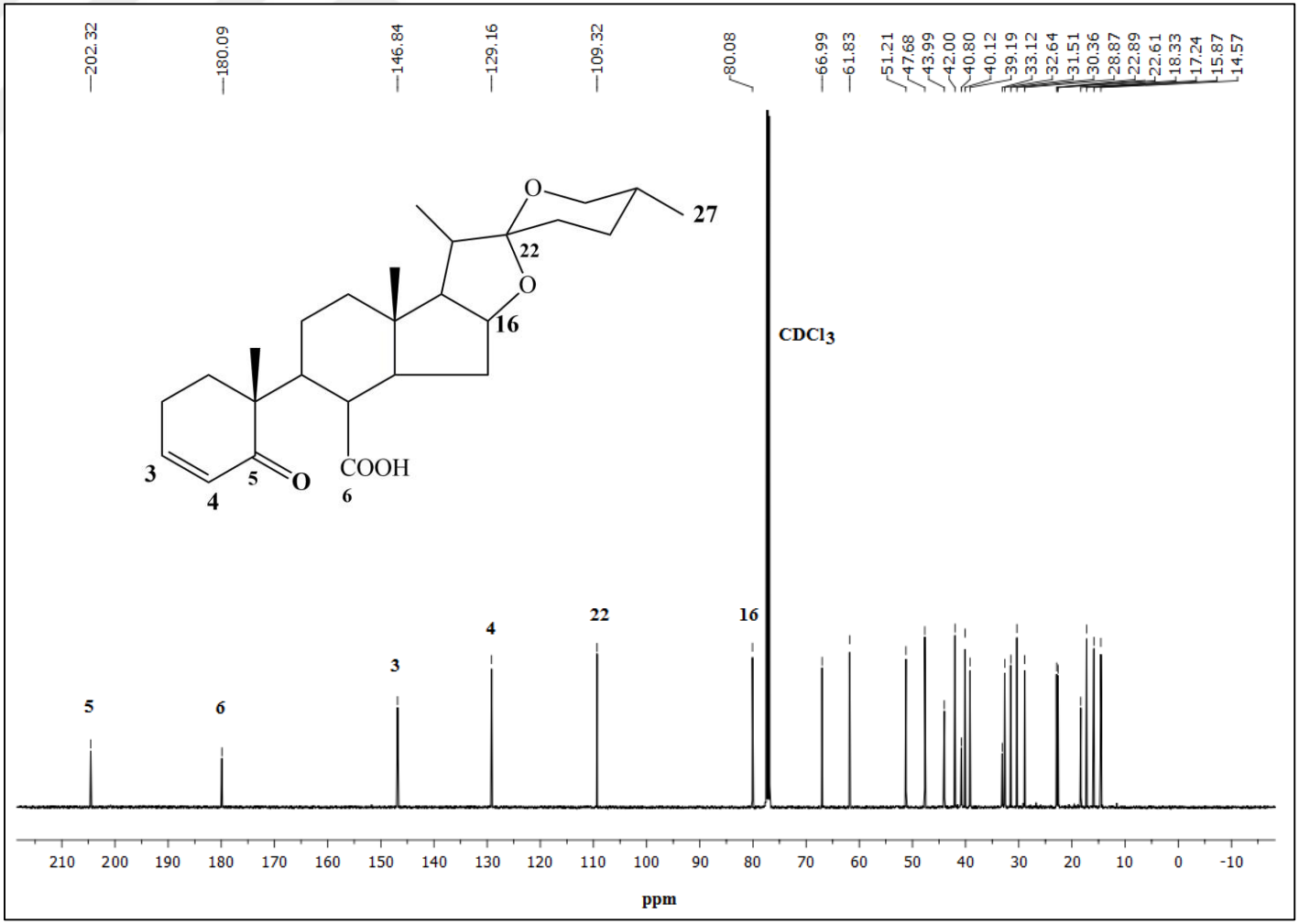

Şekil C.4. Bileşik 4'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



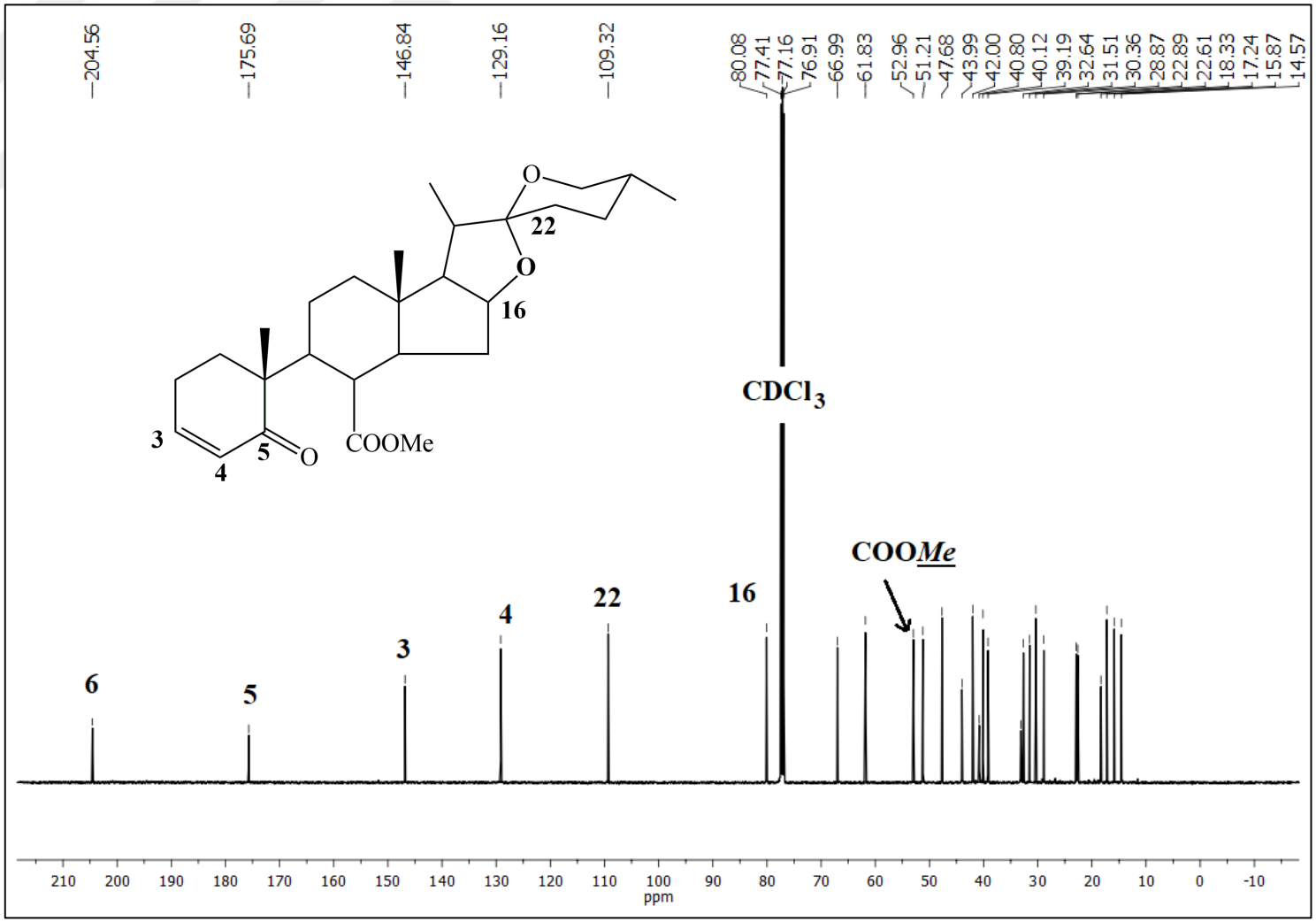

Şekil C.5. Bileşik 7'ye ait $^{13}$C-NMR spektrumu



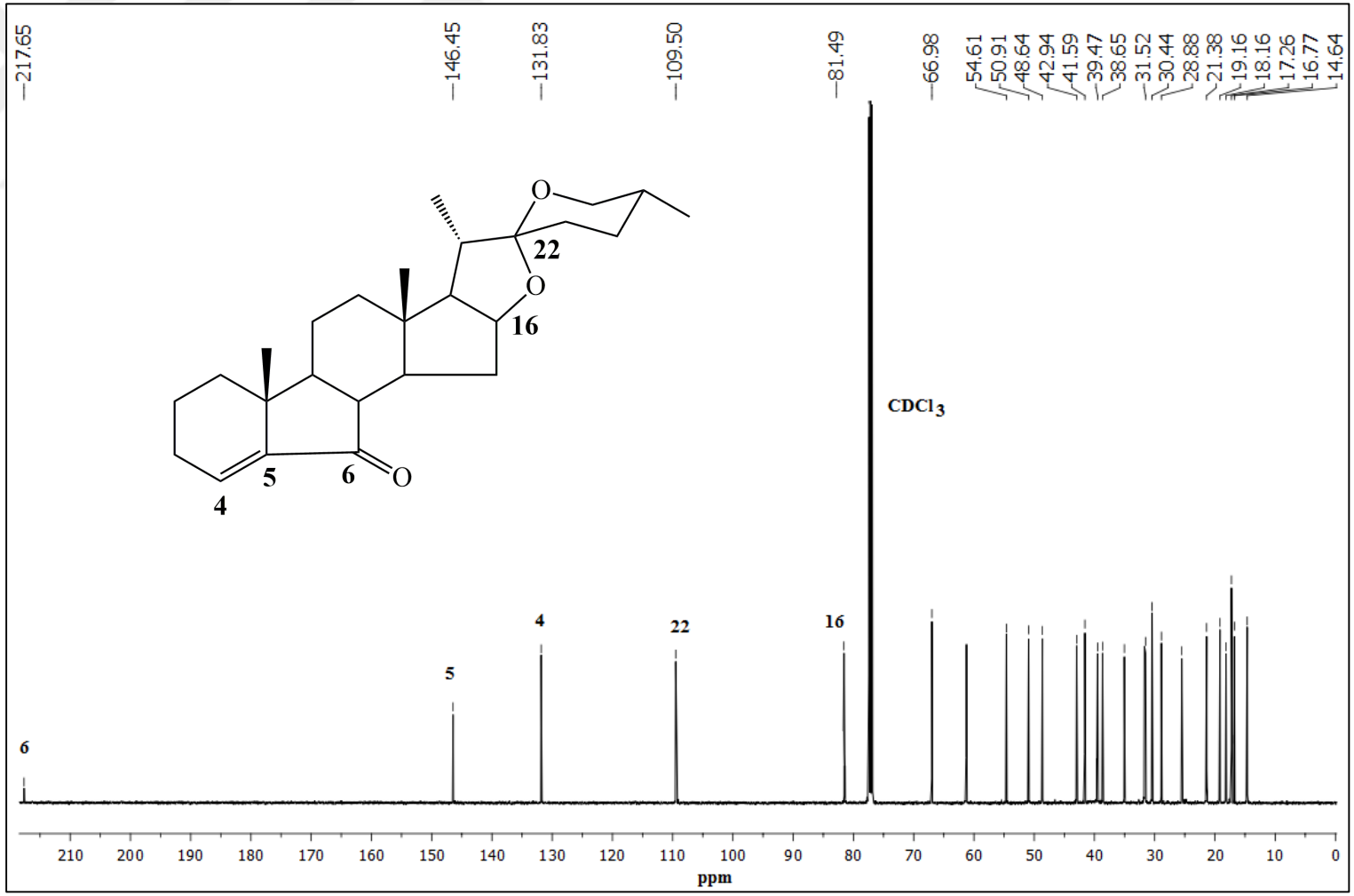

Şekil C.6. Bileşik 8'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



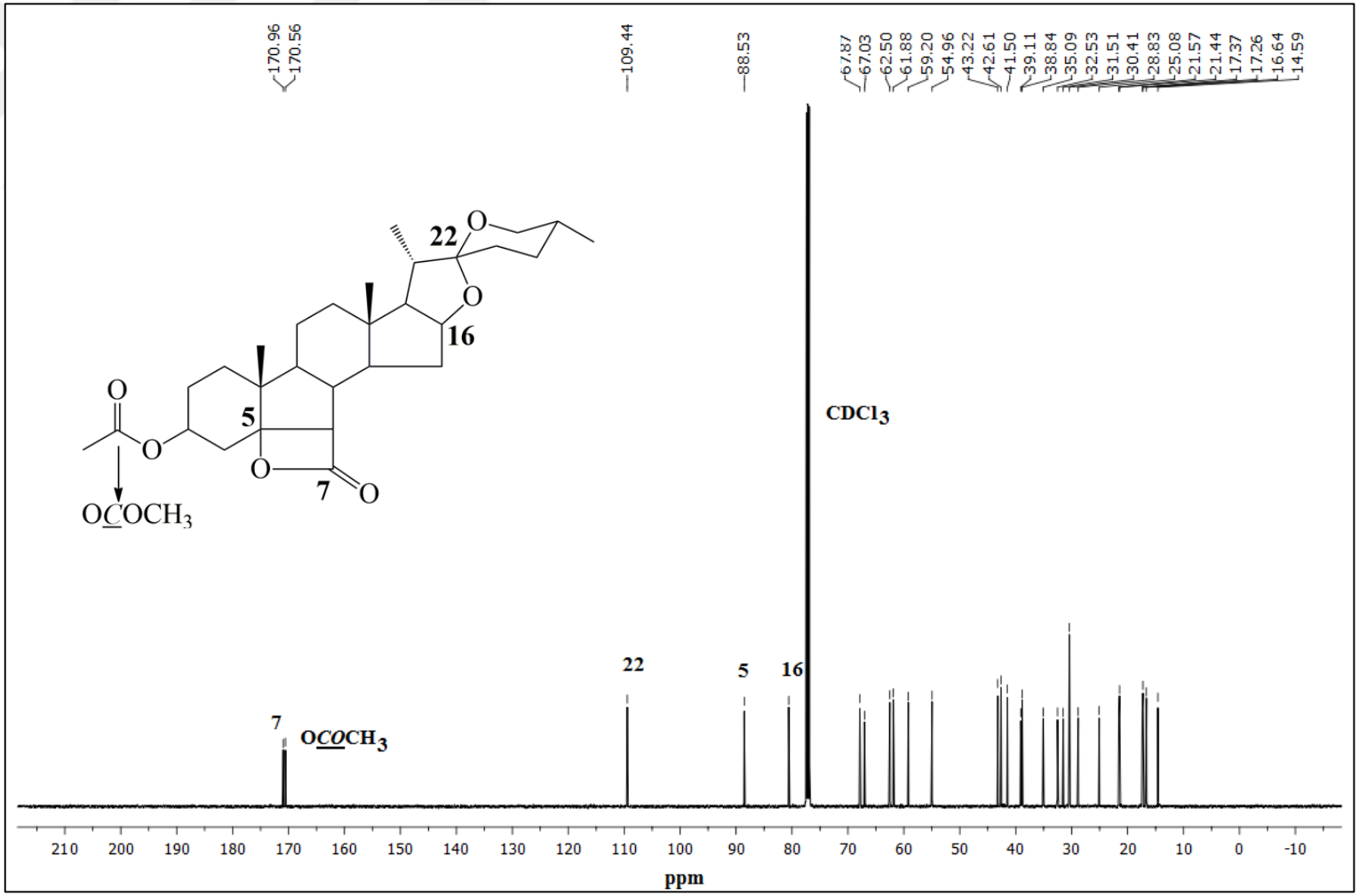

Şekil C.7. Bileşik 12'ye ait $^{13}$C-NMR spektrumu



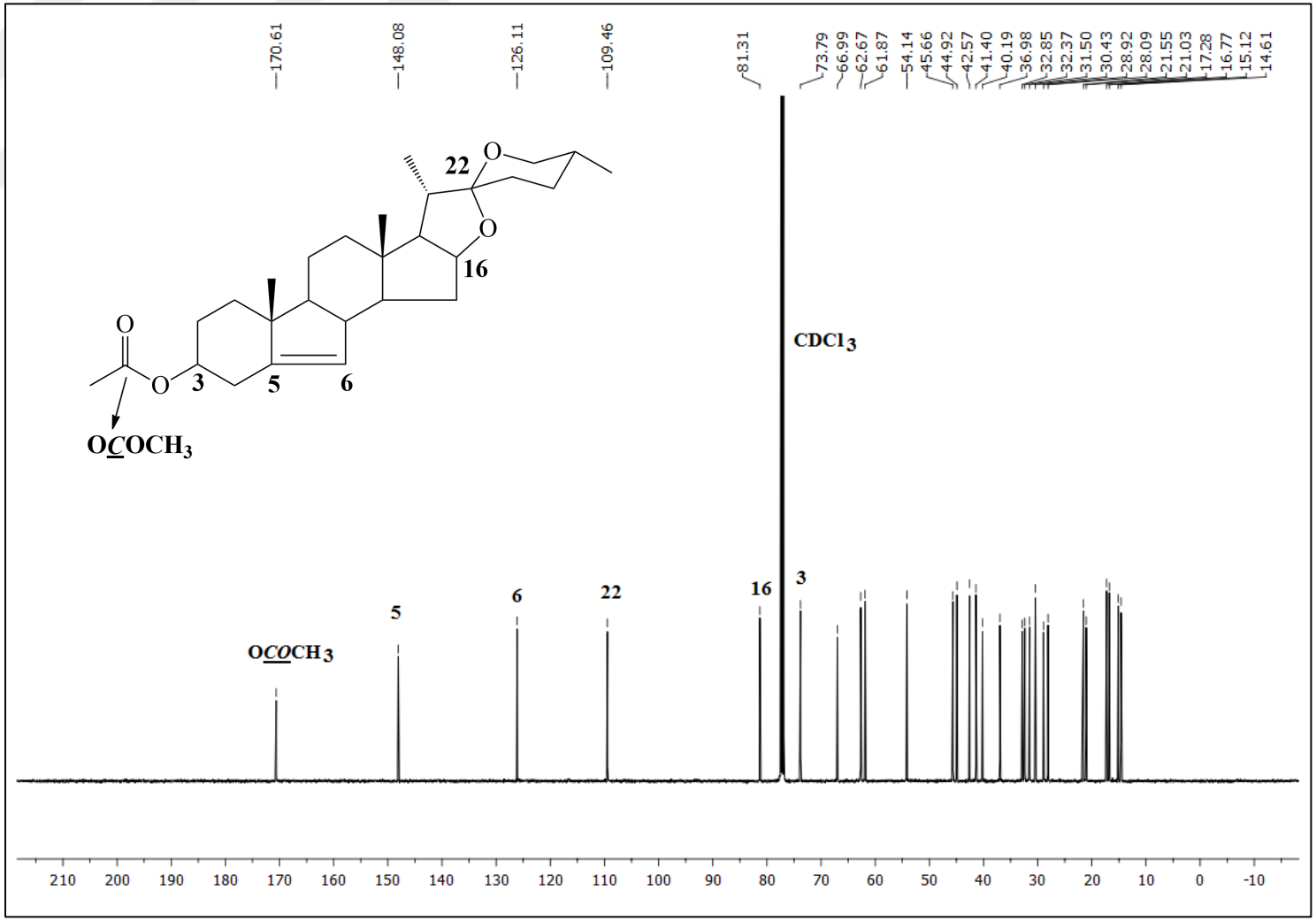

Şekil C.8. Bileşik 13'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



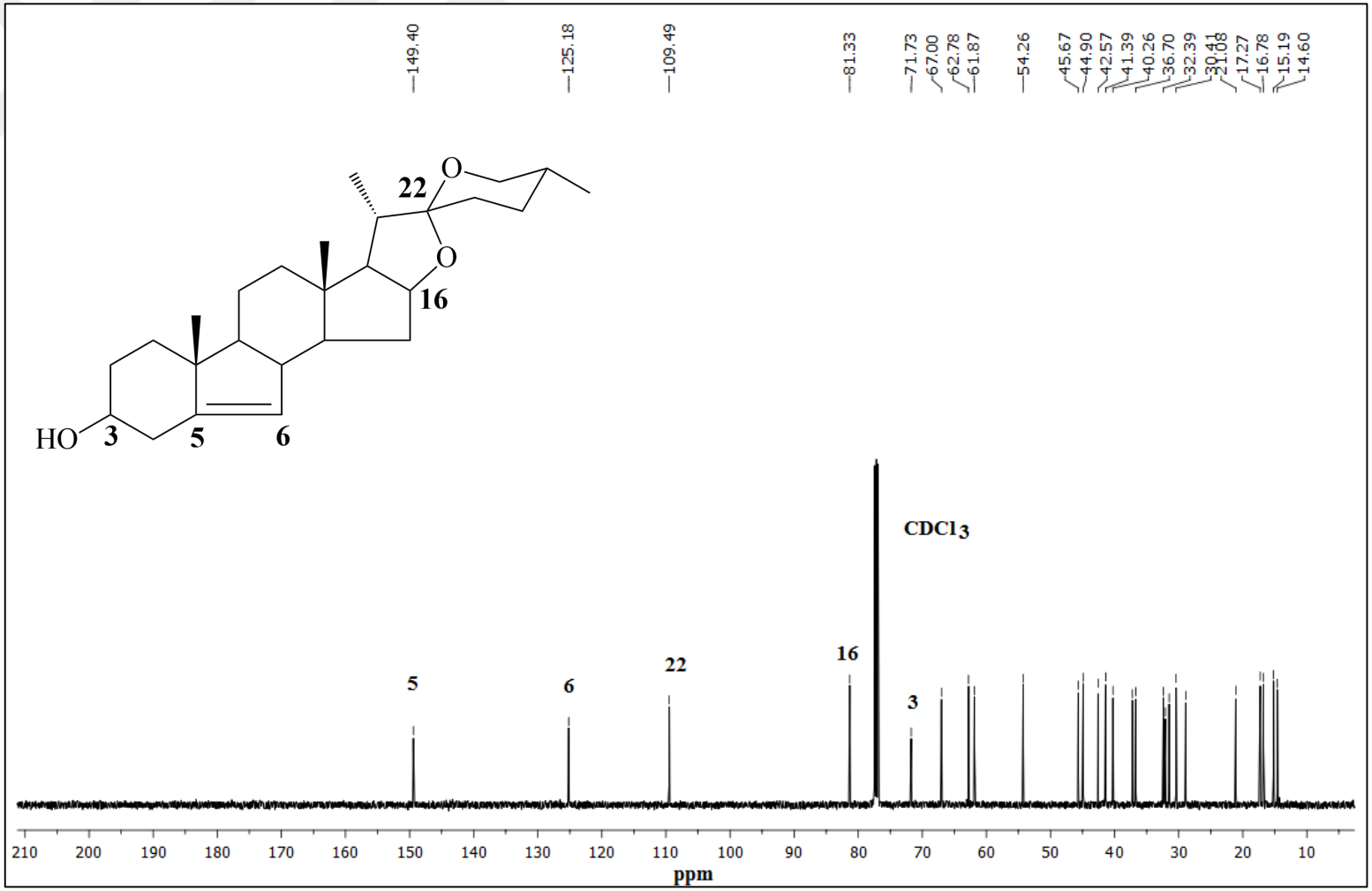

Şekil C.9. Bileşik 14'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



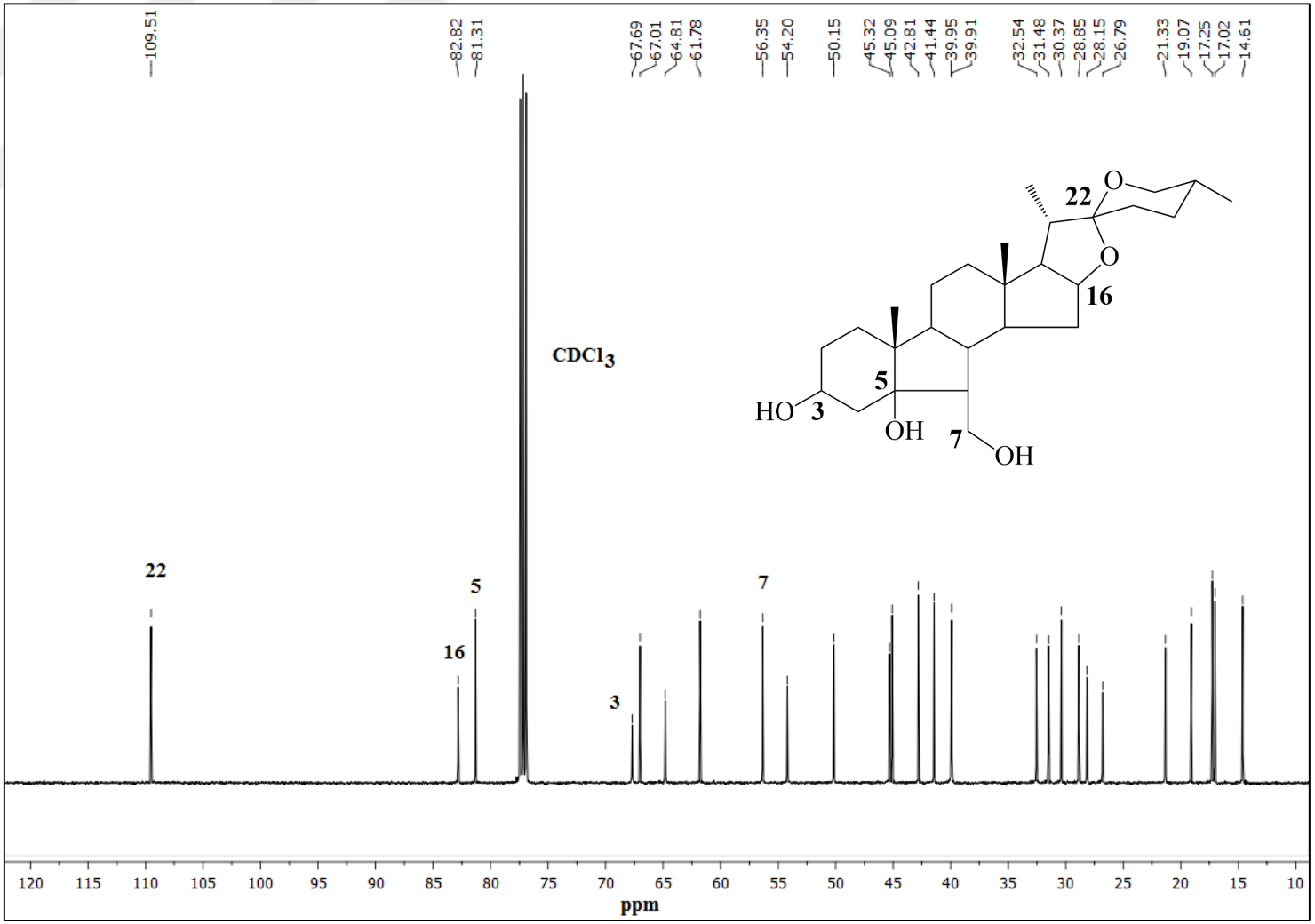

Şekil C.10. Bileşik 18'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



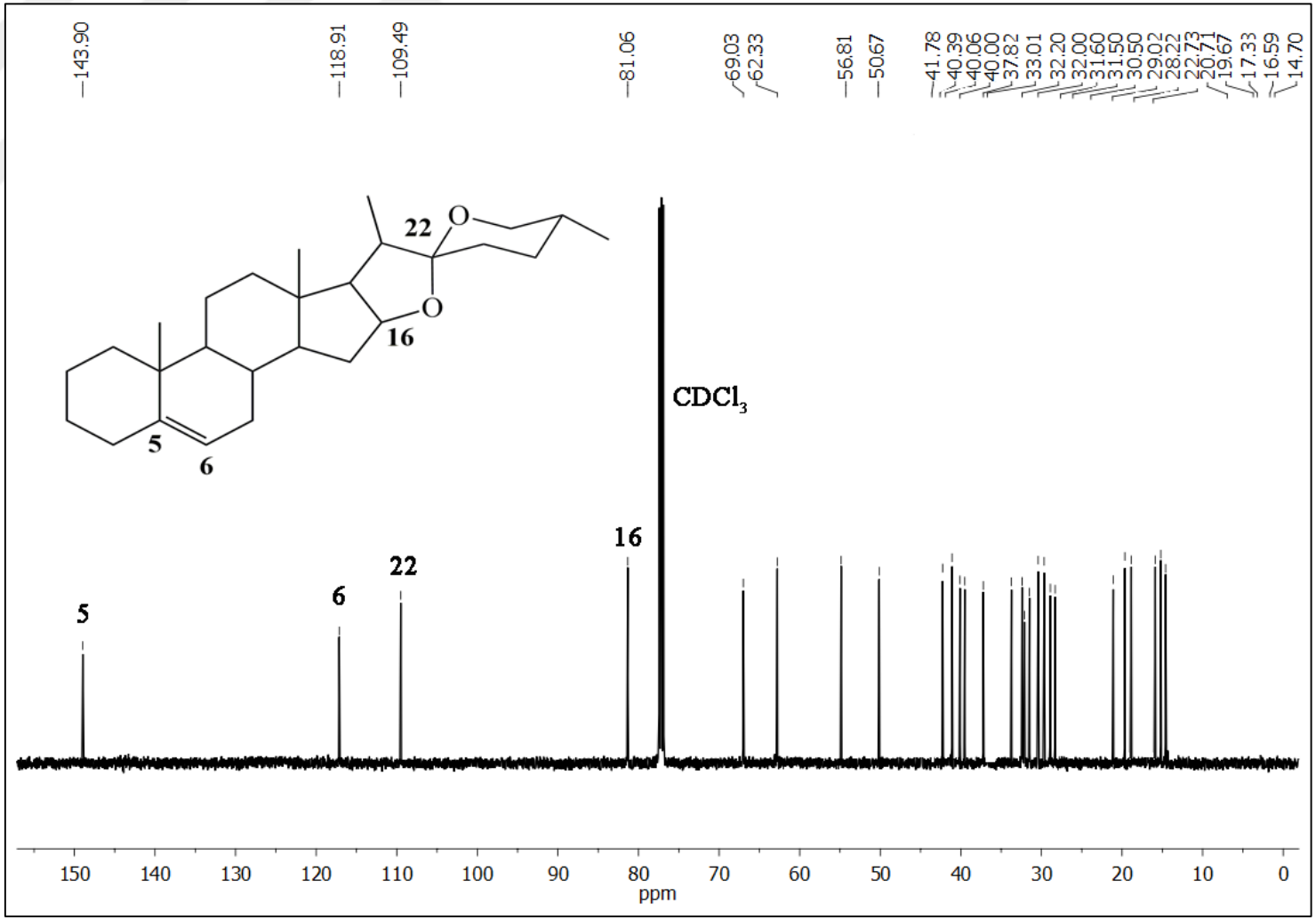

Şekil C.11. Bileşik 19'a ait $^{13}$C-NMR spektrumu



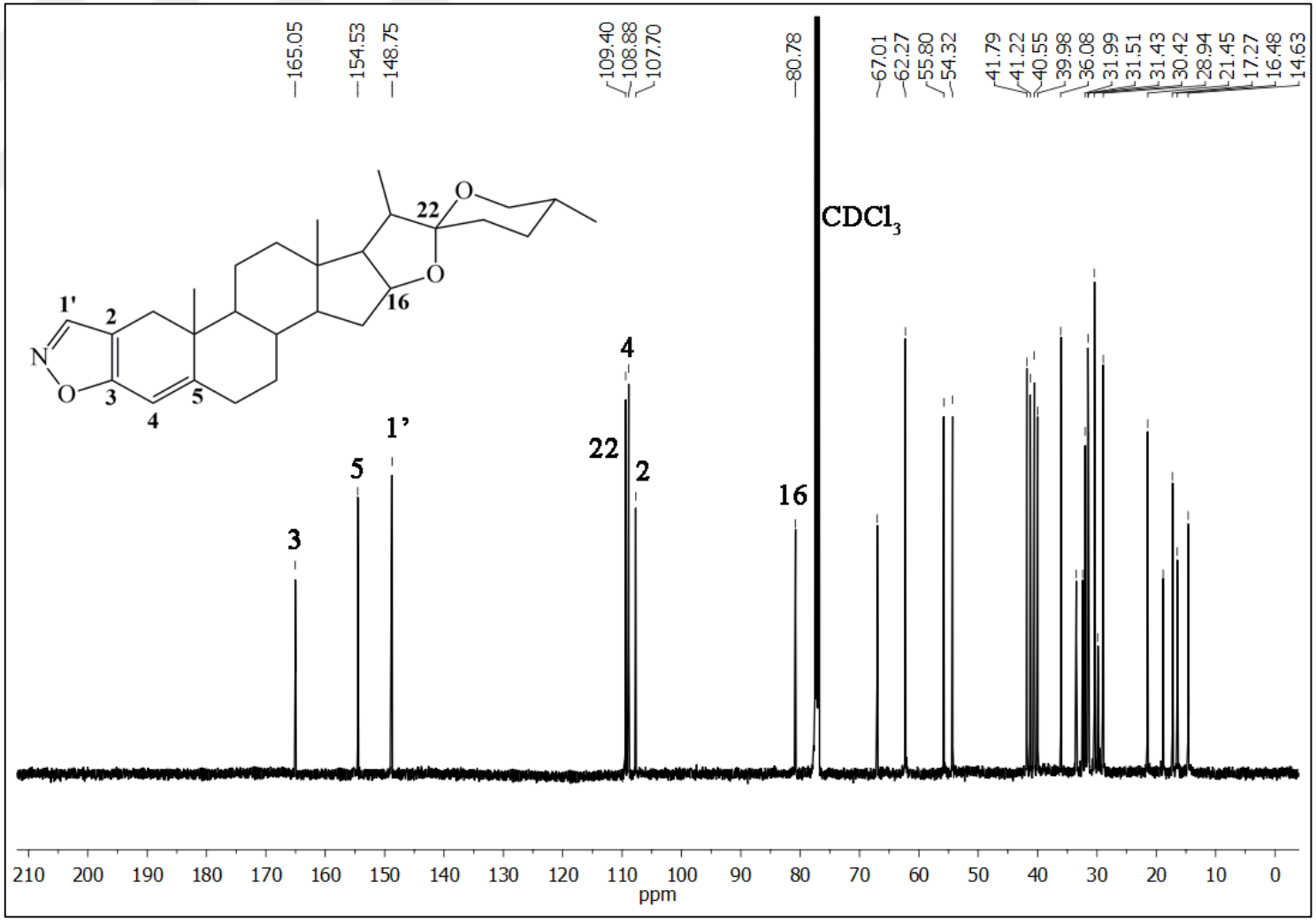

Şekil C.12. Bileşik 20'ye ait $^{13}$C-NMR spektrumu



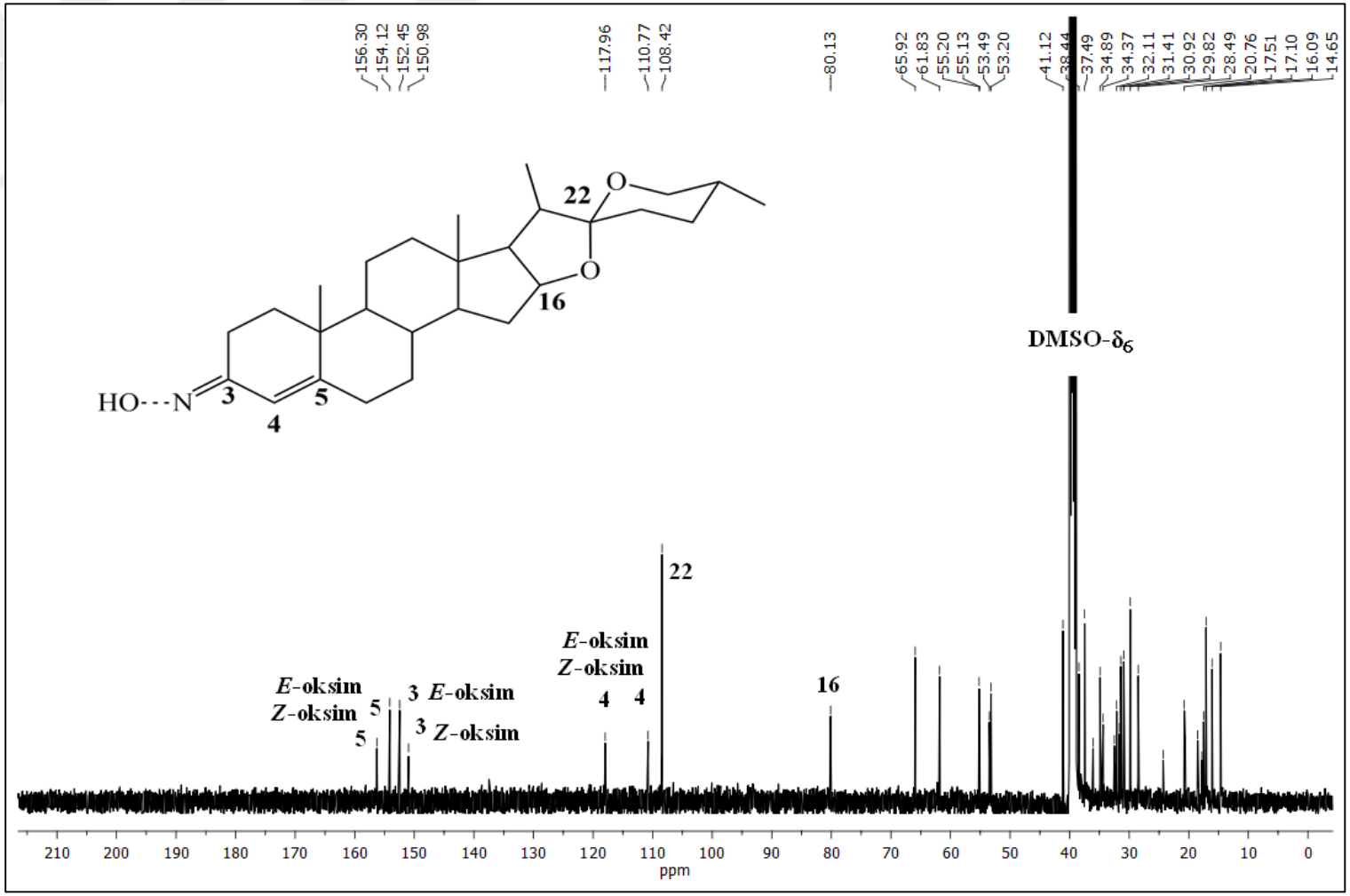

Şekil C.13. Bileşik 21'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu




Şekil C.14. Bileşik 25'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



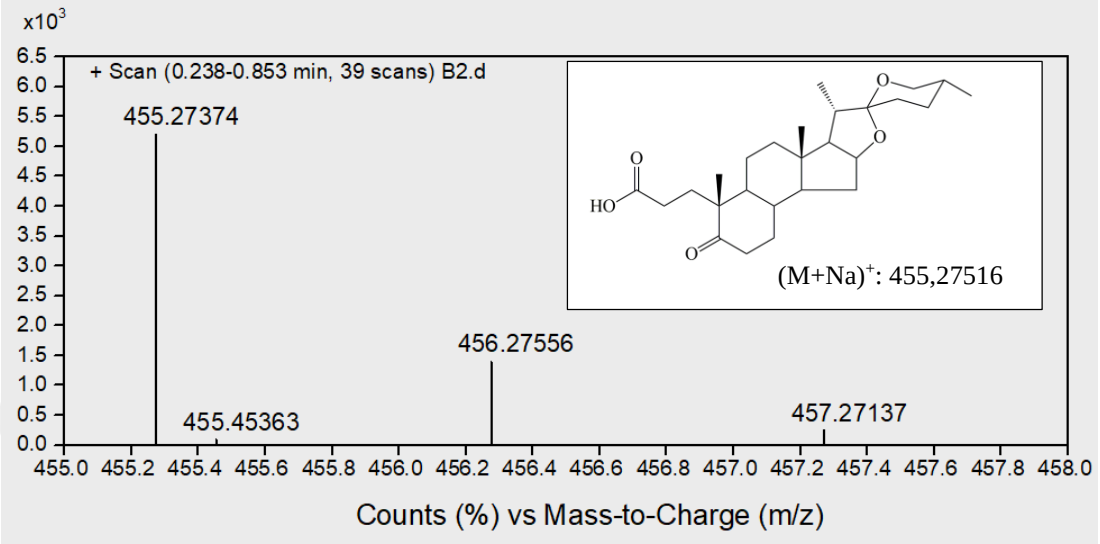

Şekil C.15. Bileşik 33'e ait $^{13}$C-NMR spektrumu



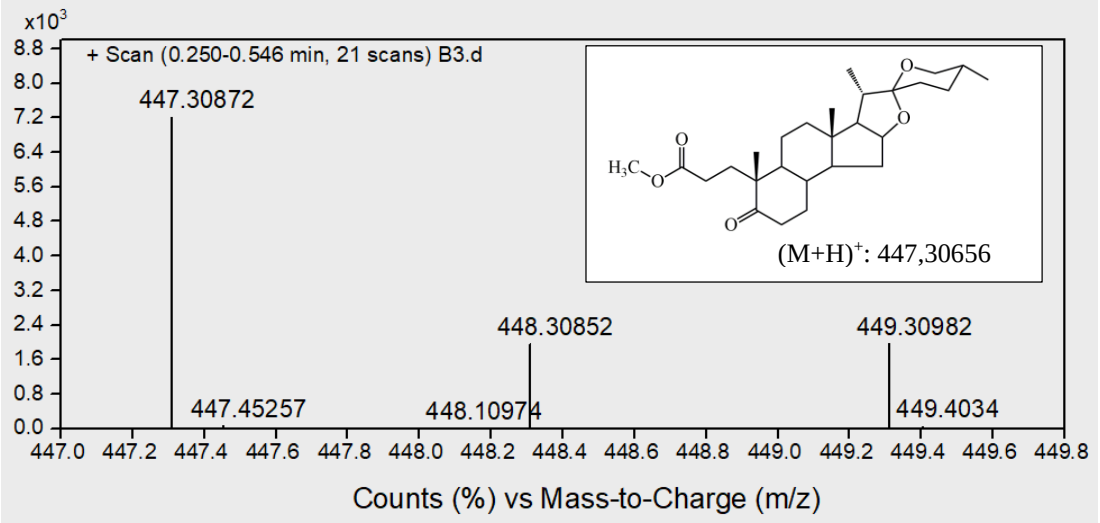

Şekil C.16. Bileşik 36'ya ait $^{13}$C-NMR spektrumu

**Ek-D**

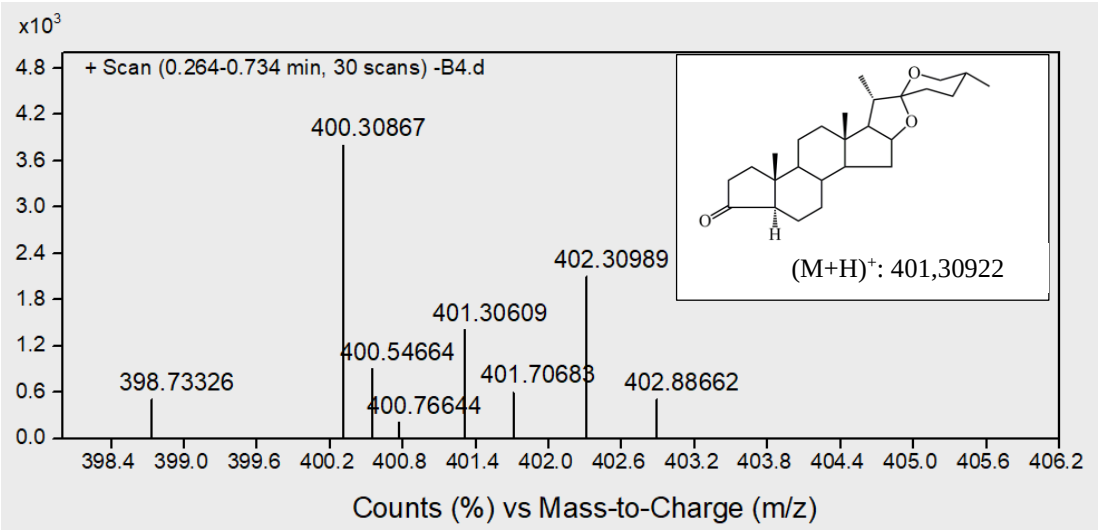
**HRMS Spektrumları**



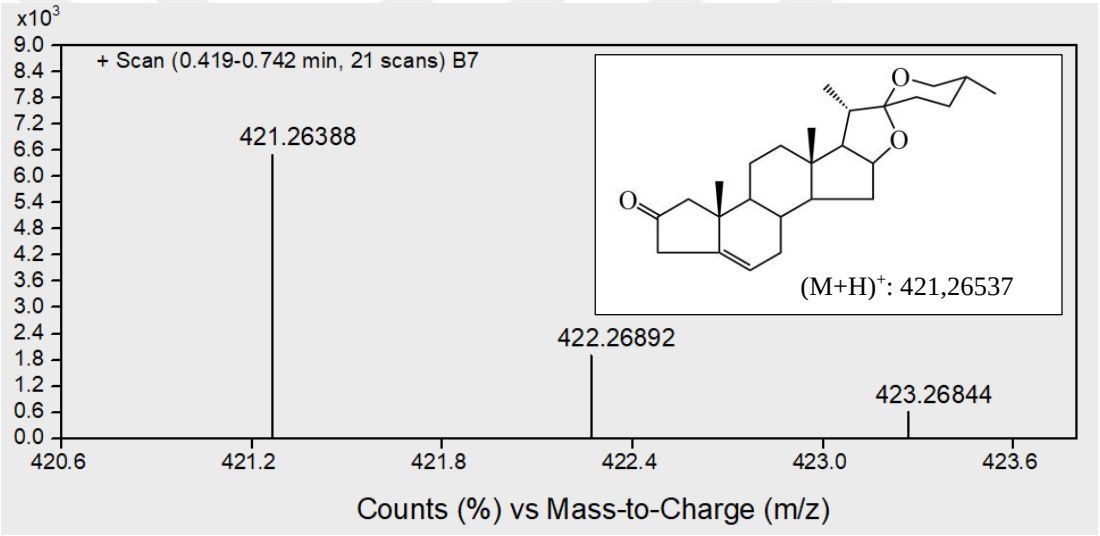

Şekil D.1. Bileşik 2 (5-okso-3,5-seko-4-Norspirostan-3-karbosiklik asit)



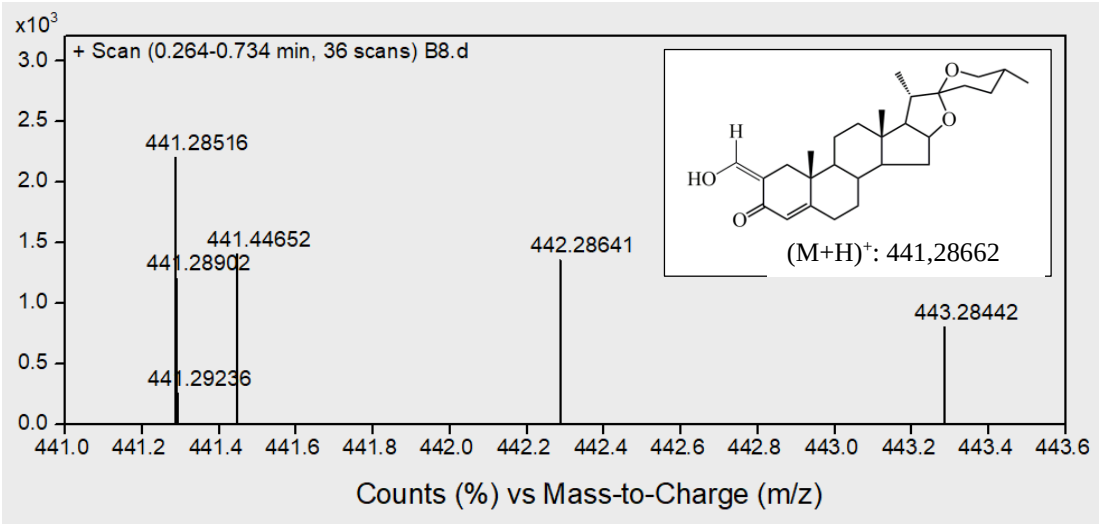

Şekil D.2.Bileşik 3 (Metil 5-okso-3,5-seko-4-Norspirostan-3-karboksilat)



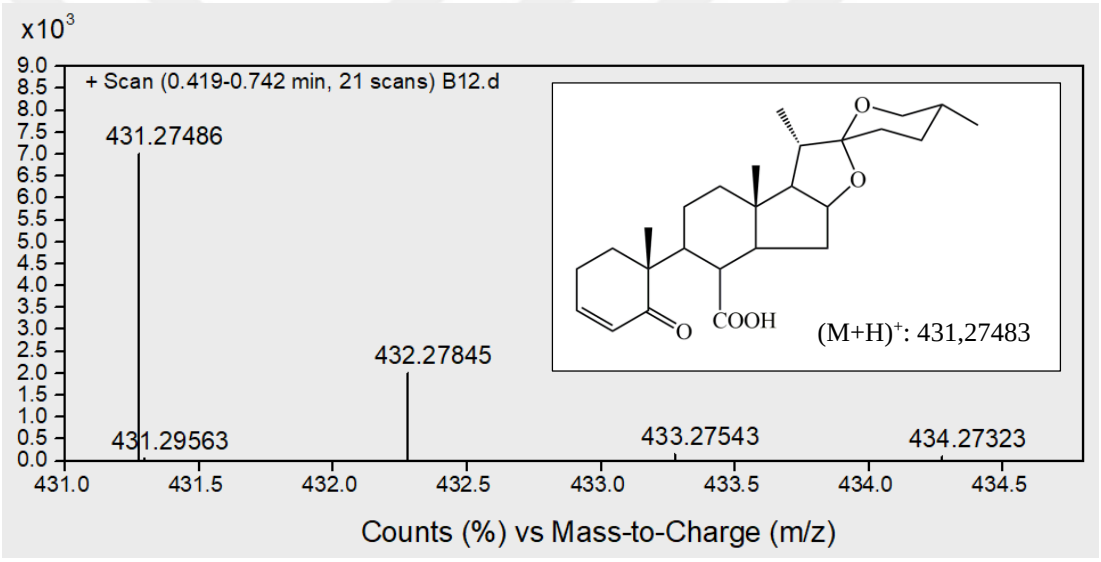

Şekil D.3. Bileşik 4 (A-Nor-5β-Spirostan-3-on at)



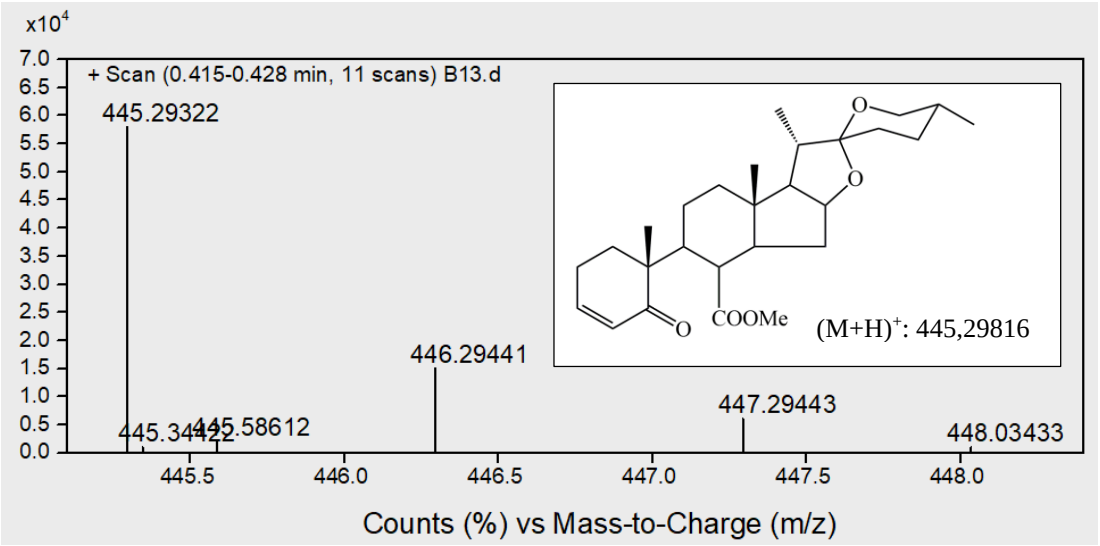

Şekil D.4. Bileşik 7 (A-Nor-5α-spirostan-2-on)



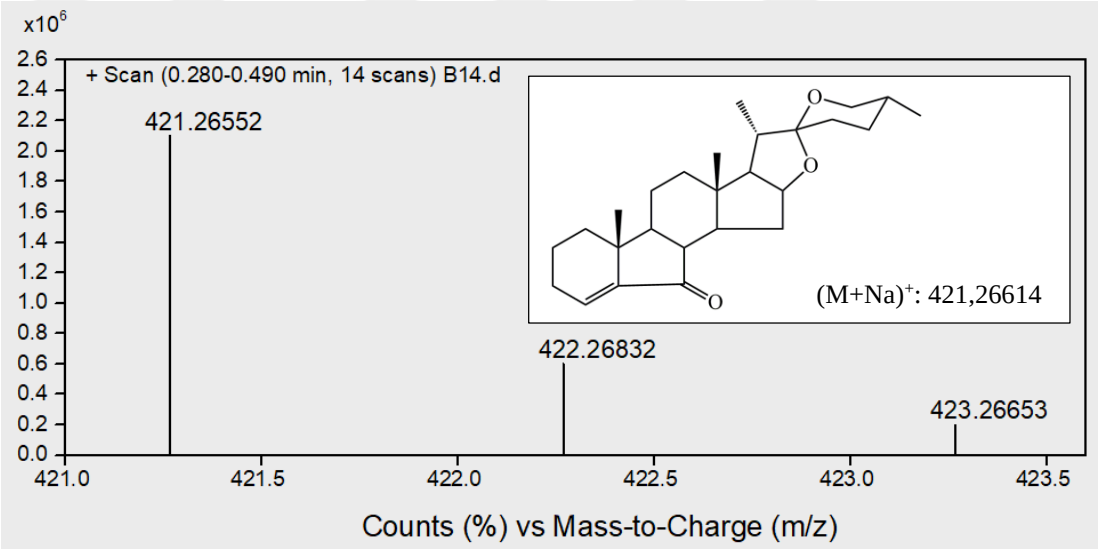

Şekil D.5. Bileşik 8 (2-hidroksimetilen-spiros-4-en-3-on)



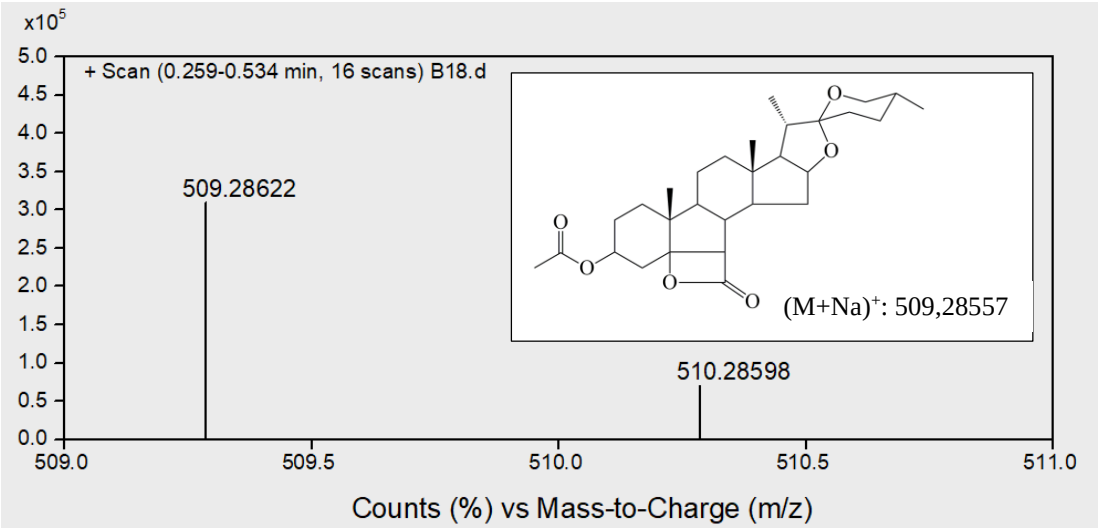

Şekil D.6. Bileşik 12 (5-okso-5,7-seko-6-Norspirost-3-en-7-karboksilik asit)



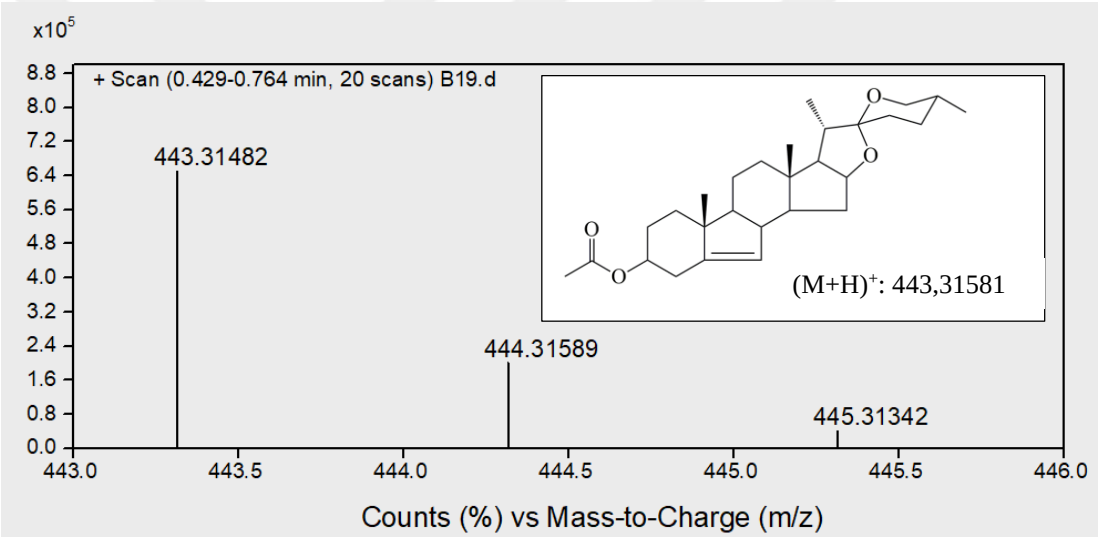

Şekil D.7. Bileşik 13 (Metil-5-okso-5,7-seko-6-Norspirost-3-en-7-karboksilat)



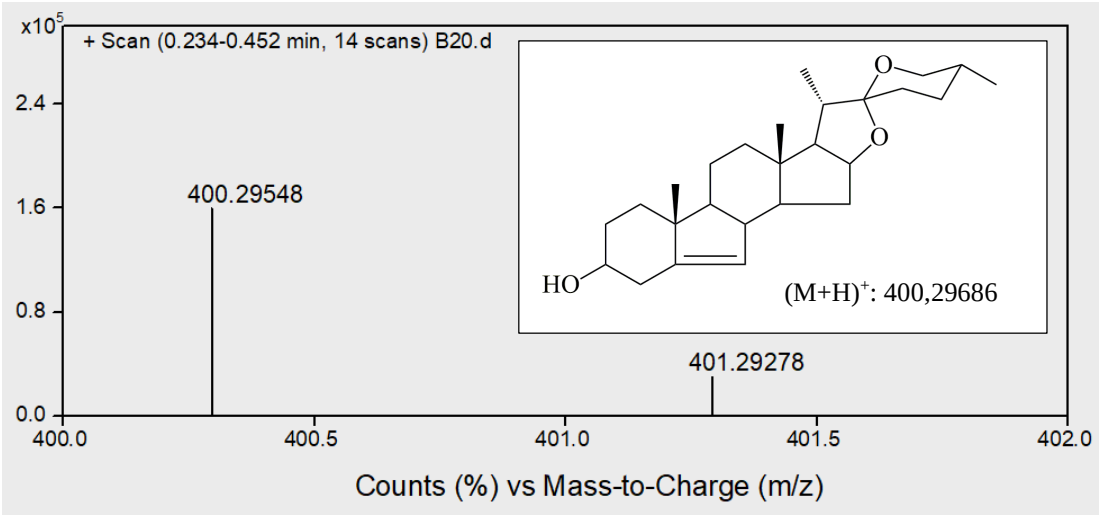

Şekil D.8. Bileşik 14 (B-Nor-5β-spirost-3-en-6-on)



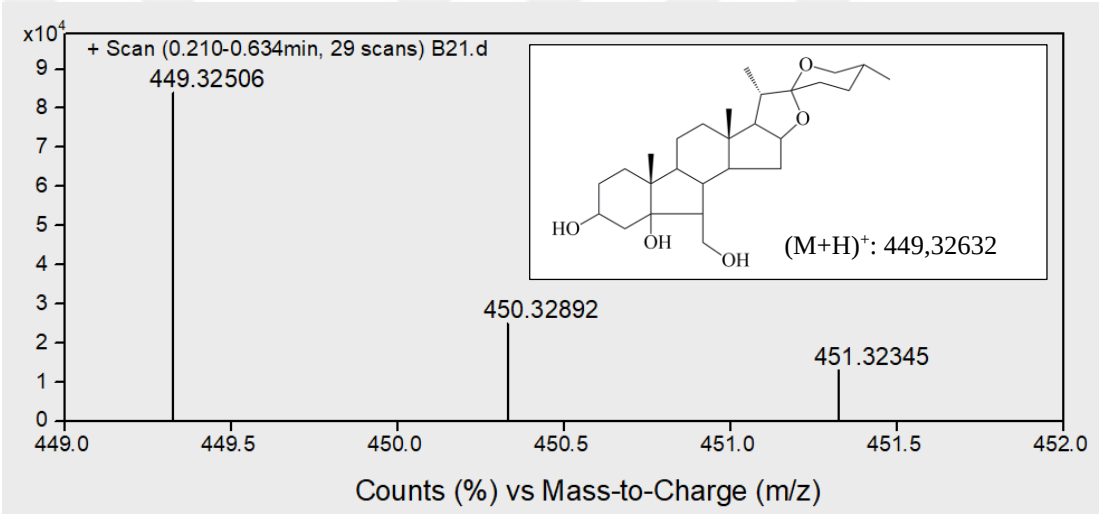

Şekil D.9. Bileşik 18 (3β-Asetoksi-5β-hidroksi-B-norsiprostan-6β-oik asit-5,6-lakton)



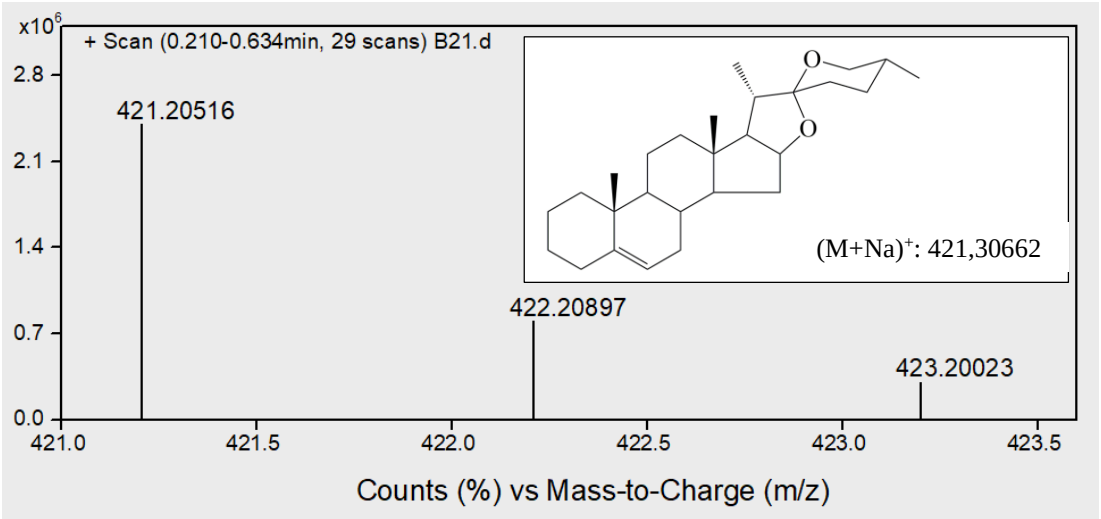

Şekil D.10 Bileşik 19 (3β-asetoksi-B-Norspirost-5en)



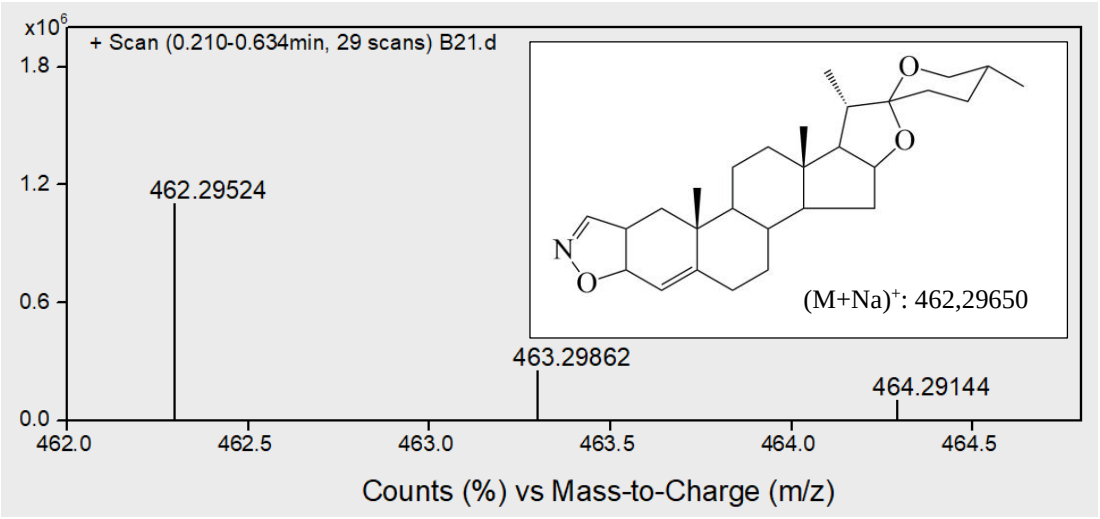

Şekil D.11. Bileşik 20 (3β-Hidroksi-B-Norspirost-5en)




Şekil D.12. Bileşik 21 (3β, 5β-Dihidroksi-6β-hidroksimetil-B-Norspirostan)



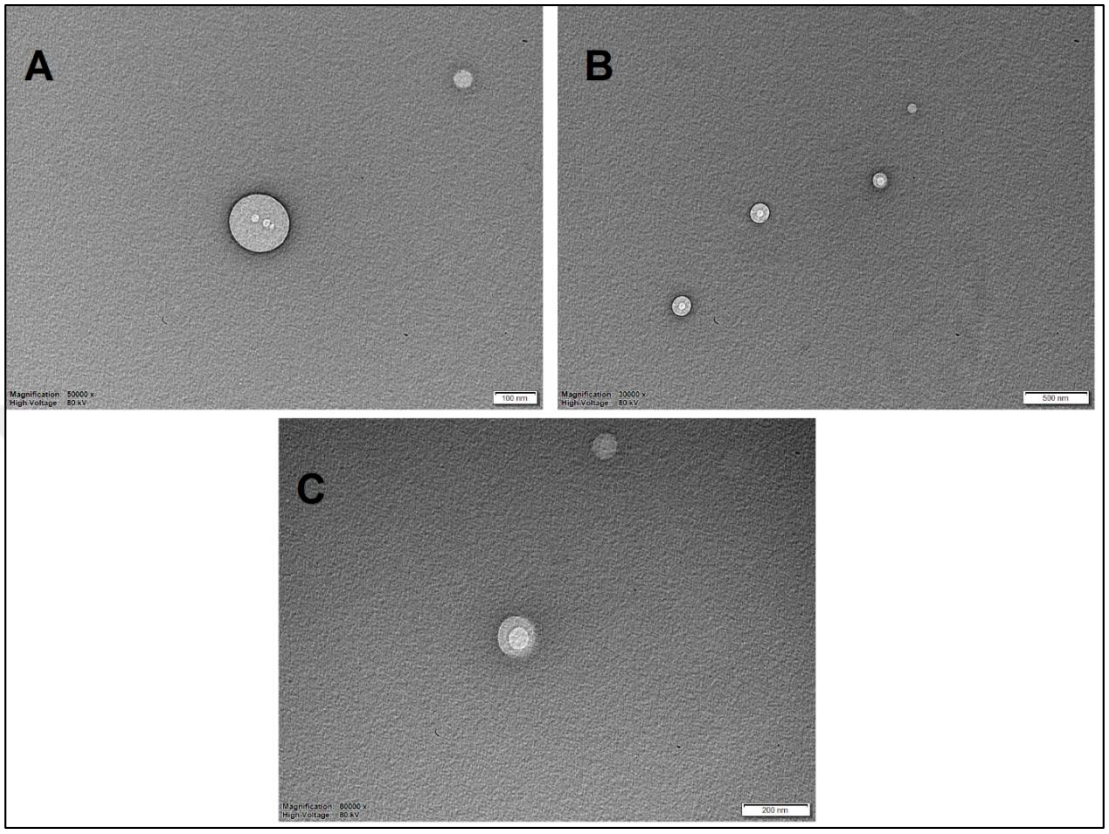

Şekil D.13. Bileşik 25 (3β, 5β-Dihidroksi-6β-hidroksimetil-B-Norspirostan)




Şekil D.14. Bileşik 33 (Spirost-4-en-[3,2-d] izoksazol)

**Ek-E**

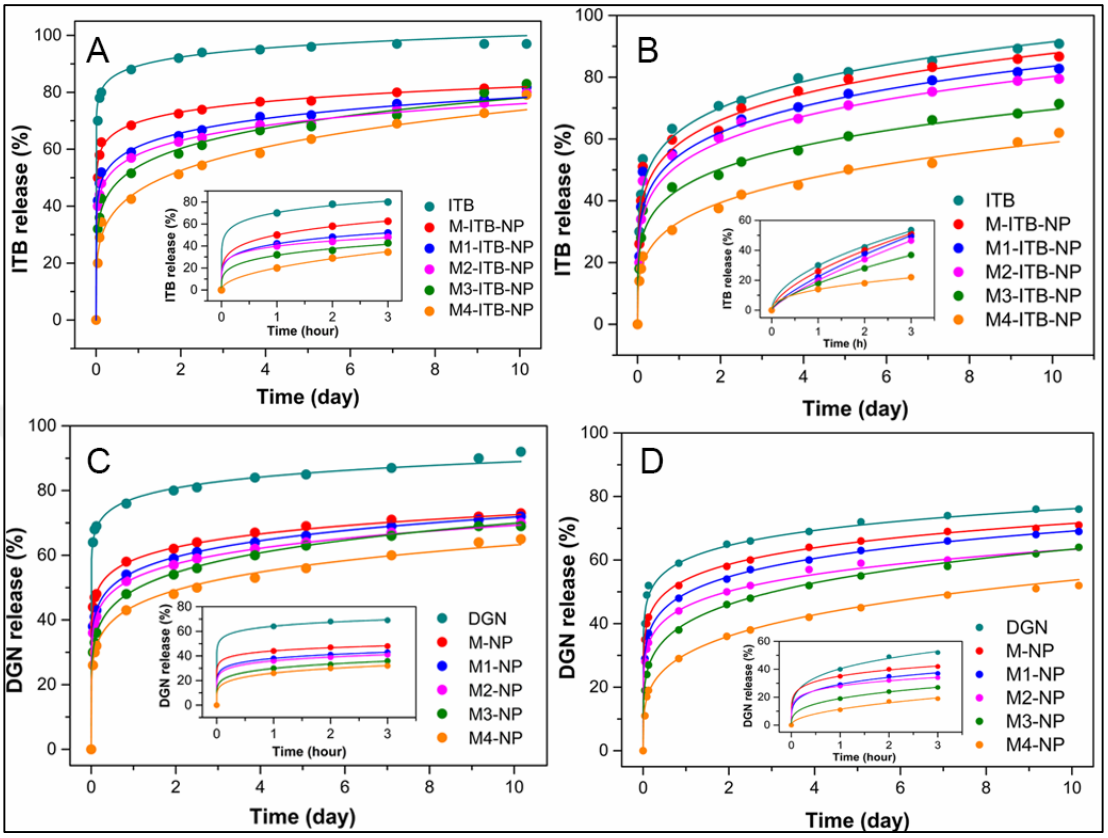
**TEM Görüntüleri**




Şekil E.1. a) M1-ITB-NP b) M2-ITB-NP c) M3-ITB-NP için TEM görüntüleri

**Ek-F**

## İn vitro ilaç salım davranışları




Şekil F.1. NP'ler ve ITB-yüklü NP'lerden ilaç salım davranışları (A: ITB pH: 3.5, B: ITB pH: 7.4, C: DGN pH: 3.5, and DGN pH: 7.4).

**Ek-G**

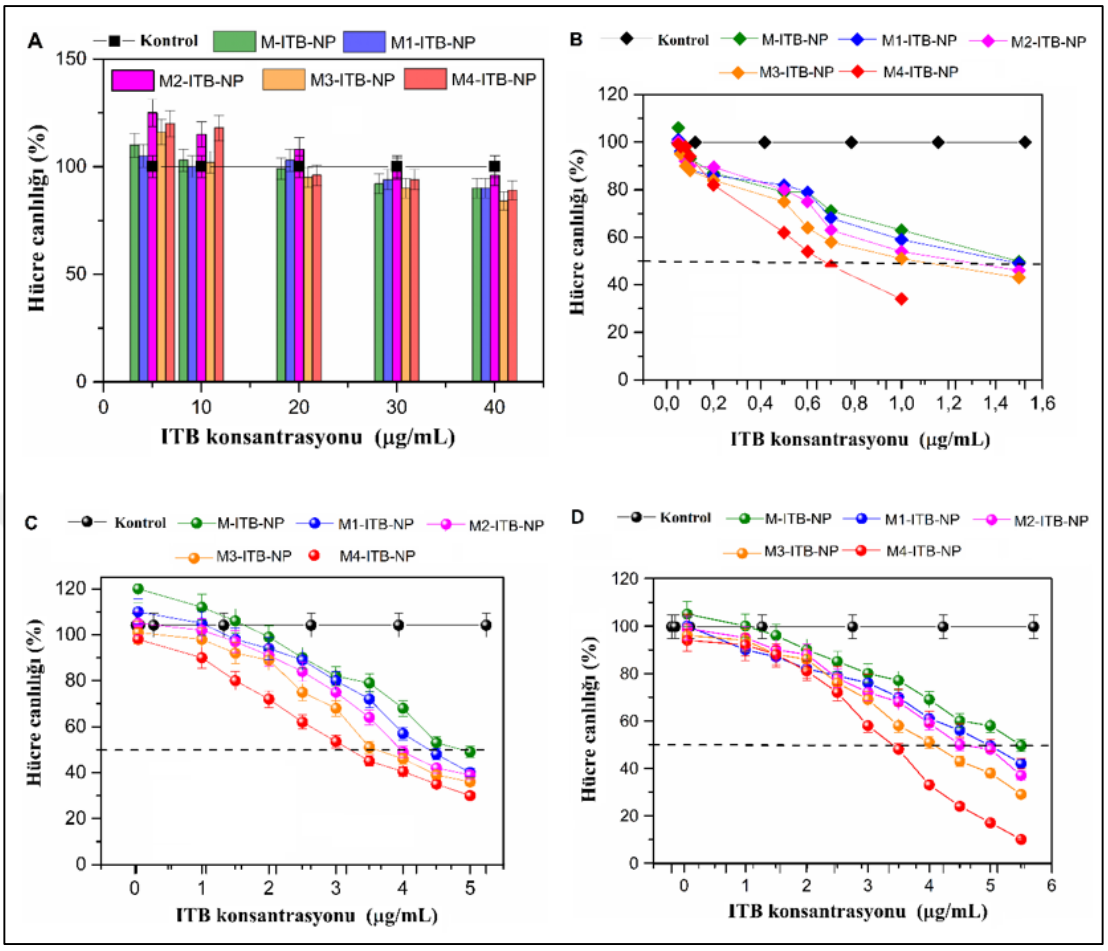
## ANOVA Analizi Sonuçları

Tablo G.1. Hücre canlılığı üzerine formülasyonların etkisinin ANOVA değerlendirilmesi

| Hücre Tipi | Formülasyon | ANOVA sonuçları | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Sum of Squares | Mean Square | F değeri | P-değeri* | Adj. R-Squared |
| MCF-7 | ITB | 1973,80 | 493,45 | 1788,64 | <0,0001 | 0,996 |
| | DGN | 7513,82 | 1878,45 | 20208,96 | <0,0001 | 0,998 |
| | M4-NP | 5598,53 | 1399,63 | 9537,75 | 0 | 0,998 |
| | M4-ITB-NP | 5499,21 | 1374,80 | 136,40 | <0,0001 | 0,939 |
| SAOS-2 | ITB | 3596,13 | 899,03 | 1163,46 | <0,0001 | 0,991 |
| | DGN | 3598,22 | 899,55 | 2535,43 | <0,0001 | 0,988 |
| | M4-NP | 4799,26 | 1199,81 | 13070,05 | <0,0001 | 0,998 |
| | M4-ITB-NP | 4799,41 | 1199,85 | 16433,99 | <0,0001 | 0,998 |
| K562 | ITB | 3996,06 | 999,01 | 1524,33 | <0,0001 | 0,995 |
| | DGN | 3999,78 | 999,94 | 27817,71 | <0,0001 | 0,999 |
| | M4-NP | 5199,23 | 1299,80 | 15212,21 | 0 | 0,997 |
| | M4-ITB-NP | 5195,34 | 1298,83 | 2508,73 | <0,0001 | 0,997 |

* P değerleri < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Ek-H. İn vitro sitotoksisite sonuçları




Şekil H.1. ITB yüklü NP'lerin hücre canlılığı (A: L929, B: MCF-7, C: SAOS-2 ve D: K562)

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

[1] **Ilkar Erdagi S.**, Yildiz U., Diosgenin-Conjugated PCL–MPEG Polymeric Nanoparticles for the co-Delivery of Anticancer Drugs: Design, Optimization, in Vitro Drug Release and Evaluation of Anticancer Activity, *New Journal of Chemistry*, 2019, **43**, 6622-6635.

[2] Fahanwi A. N., **Ilkar Erdagi S.**, Yildiz U., Pickering Emulsions Stabilized Nanocellulosic-Based Nanoparticles for Coumarin and Curcumin Nanoencapsulations: in Vitro Release, Anticancer and Antimicrobial Activities, *Carbohydrate Polymers*, 2018, **201**, 317-328.

[3] **Ilkar Erdagi S.**, Uyanik C., Biological Evaluation of Bioavailable Amphiphilic Polymeric Conjugate Based-on Natural Products: Diosgenin and Curcumin, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2018, DOI: 10.1080/00914037.2018.1539989.

[4] **Ilkar Erdagi S.**, Doganci E., Uyanik C., Yilmaz F., Heterobifunctional Poly(E-Caprolactone): Synthesis of α-Cholesterol-Ω-Pyrene PCL Via Combination of Ring-Opening Polymerization and "Click" Chemistry, *Reactive and Functional Polymers*, 2016, **99**, 49–58.

[5] **Ilkar Erdagi S.**, Boztaş F.G., Uyanik C., The Formation of Sobrelol Ethers by the Alcoholysis of Pinene Epoxides, *Journal of Chemical Research*, 2016, **40**, 318-319.

[6] **Ilkar Erdagi S.**, Yildiz U., Sevinc Ilkar Erdagi, Synthesis of Diosgenin Containing MPEG-PCL Nanoparticles, Anticancer, Antimicrobial and Drug Delivery Studies, *4th International Conference on Polymer Chemistry*, Stockholm, Sweeden, 25-27 June 2018.

[7] **Ilkar Erdagi S.**, Studies on the Absorption and Fluorescence Properties of Cholesterol-Curcumin and Cholesterol-Coumarin Conjugates, *International Congress on Chemistry and Materials Science*, Ankara, Türkiye, 4-7 Ekim 2017.

[8] **Ilkar Erdagi S.**, Synthesis, Characterization and Flourescence Studies of Poly (ethylene glycol)-Diosgenin-Curcumin Conjugates, *European Polymer Congress EPF*, Lyon, France, 2-7 July 2017.

[9] Isik S., **Ilkar Erdagi S.**, Synthesis and Characterization of Some Steroidal Polymers Containing Coumarin Derivative, *European Polymer Congress EPF*, Lyon, France, 2-7 July 2017.

[10] **Ilkar Erdagi S.**, Uyanik C., Preparation of Biological Active Steroids, *European Chemistry Congress*, Rome, Italy, 4-6 July 2016.

[11] **Ilkar Erdagi S.**, Doganci E., Uyanik C., Yilmaz F., Chemical Preparation and Characterization of New Biodegradable Poly (ε-Caprolactone) Formed from Diosgenin and Cholesterol, 4*6th IUPAC Word Polymer Congress*, İstanbul, Türkiye, 17-21 Temmuz 2016.

[12] **Ilkar Erdagi S.**, Doganci E., Uyanik C., Yilmaz F., Synthesis of Pyrene-Functionalized Cholesterol Derivatives via Copper (I) Catalyzed "Click" Reaction, *Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis IUPAC International Symposium*, Sitges, Spain, 28 June- 2 July 2015.

[13] **Ilkar Erdagi S.**, Uyanik C., β-Sitosterolden Başlayarak Mcmurry Reaksiyonu ile β-Norsteroid Sentezi, *27. Ulusal Kimya Kongresi*, Çanakkale, Türkiye, 23-28 Ağustos 2015.

[14] **Ilkar Erdagi S.**, Uyanik C., Studies on Kaurene Chemistry, *44th World Chemistry Congress*, İstanbul, Türkiye, 11-16 Ağustos 2013.

[15] **Ilkar Erdagi S.**, Doganci E., Uyanik C., Yilmaz F., Synthesis and Characterization of α-Cholesterol and ω-Pyrene Functionalized Poly(ε-Caprolactone Polymer by a Combination of Ring Opening Polymerization and "Click" Chemistry Techniques, *10th IUPAC International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering*, Durham, United Kingdom, 18-22 August 2013.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Ardahan'da doğan Sevinç İLKAR ERDAĞI, ilk ve ortaöğrenimini Gebze'de tamamladı. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl, İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve 2012 yılında Roma La Sapienza Üniversitesinde Prof. Dr. Rinaldo Marini BETTOLO'nun laboratuvarında altı ay laboratuvar çalışmalarına katıldı. Kocaeli Üniversitesi Kimya Bölümünde Prof. Dr. Cavit UYANIK danışmanlığında 2013 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013-2016 yılları arasında Prof. Dr. Cavit UYANIK danışmanlığında spirostan bileşiklerinin sentezi ve 2018 yılından bu yana Prof. Dr. Ufuk YILDIZ danışmanlığında spirostan içeren polimerik malzemeler üzerine çalışmalar yaptı. Halen bu üniversitede araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.