



T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

PAKLİTAKSEL YÜKLÜ HİPOKSİ DUYARLI KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Nur Sena SUSAMCI

Çorum – 2025

**PAKLİTAKSEL YÜKLÜ HİPOKSİ DUYARLI KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nur Sena SUSAMCI

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı**

Yüksek Lisans Tezi

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZÇELİK**

Çorum-2025



T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

ÖĞRENCİNİN

Adı ve Soyadı : Nur Sena Susamcı

Numarası : 210447005

Ana Bilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı : Tezli Yüksek Lisans

Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Burçin Özçelik

Tez Savunma Tarihi : 20.05.2025 **Saati**: 11:00

Tez Başlığı : Paklitaksel Yüklü Hipoksi Duyarlı Kitosan Nanopartiküllerin Meme Kanseri Hücre Hattında Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği'nin **9. maddesi** uyarınca, yapılmış olan tez savunma sınavı sonunda adayın tezinin **KABULÜNE OY BİRLİĞİ** ile karar verilmiştir.

TEZ SAVUNMA SINAV JÜRİSİ		KARAR	
Ünvanı Adı ve Soyadı	Görevi	Kabul	Ret
Dr. Öğr. Üyesi Aslı Kara	Jüri Başkanı	☒	☐
Dr. Öğr. Üyesi Burçin Özçelik	Tez Danışmanı	☒	☐
Dr. Öğr. Üyesi Açelya Erikçi	Üye	☒	☐

Prof. Dr. Osman ÇUBUK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

(İmza)

Nur Sena SUSAMCI

PAKLİTAKSEL YÜKLÜ HİPOKSİ DUYARLI KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nur Sena SUSAMCI

ORCID: 0009-0008-0630-7974

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2025

ÖZET

Bu tez çalışmasında, kemoterapötik ajanlardan paklitakselin kontrollü ve hedefe yönelik salımını sağlayacak hipoksiye duyarlı bir ilaç taşıma sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimer olan kitosan, nitroimidazol ile modifiye edilerek hipoksik tümör mikroçevresine duyarlı nanopartikül sistemleri sentezlenmiştir. Nitroimidazol modifikasyonu ile elde edilen kitosan türevleri, iyonik jelasyon yöntemiyle sodyum tripolifosfat (TPP) kullanılarak nanopartikül formuna dönüştürülmüş ve çeşitli paklitaksel konsantrasyonlarıyla yüklenerek ilaç taşıma sistemleri oluşturulmuştur.

Nanopartiküller karakterizasyon çalışmaları kapsamında dinamik ışık saçılımı (DLS), zeta potansiyel analizi, SEM/TEM görüntüleme ve ilaç yükleme/verim testlerine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, modifikasyon ve paklitaksel yüklemesine bağlı olarak partikül boyutu ve polidispersite indeksinde artış gözlemlendiğini ortaya koymuş, zeta potansiyel değerlerinin ise sistemin elektrostatik stabilite açısından uygun olduğunu göstermiştir. Özellikle %0.1 (w/v) kitosan konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin, dar boyut dağılımı ve uygun yüzey yükü ile optimum özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

İn vitro sitotoksikite değerlendirmeleri, MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılarak hem normoksik hem de hipoksik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Boş nanopartiküller, serbest paklitaksel ve paklitaksel yüklü nanopartiküller farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmış ve 24-48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT testi ile hücre canlılıkları analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, üç formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p > 0.05$). Bu bulgular, nitroimidazol

modifikasyonunun hipoksik koşullarda beklenen etkinliği göstermediğini ve nanopartiköl sisteminin kontrollü salım avantajlarının mevcut parametreler altında yeterince belirginleşmediğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında geliştirilen kitosan-nitroimidazol tabanlı nanopartiköl sistemi; biyoyumluluğu, stabilitesi ve yükleme kapasitesi açısından umut verici olsa da, hücre düzeyinde anlamlı terapötik fark yaratmamış ve in vitro etkinliğinin artırılması için sistem parametrelerinin yeniden optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kavramlar: Meme kanseri, hipoksiye duyarlı nanopartiküller, kitosan, paklitaksel, hedeflendirilmiş ila taşınması, MCF-7, sitotoksite

Bilim Kodu: 20610

EVALUATION OF THE EFFICACY OF PACLITAXEL-LOADED HYPOXIA-SENSITIVE CHITOSAN NANOPARTICLES IN A BREAST CANCER CELL LINE

Nur Sena SUSAMCI

ORCID: 0009-0008-0630-7974

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL

Master of Science Thesis

June 2025

ABSTRACT

In this thesis study, it was aimed to develop a hypoxia-sensitive drug delivery system capable of providing controlled and targeted release of the chemotherapeutic agent paclitaxel. For this purpose, the biocompatible and biodegradable polymer chitosan was modified with nitroimidazole to obtain nanoparticle systems responsive to hypoxic tumor microenvironments. The chitosan derivatives obtained via nitroimidazole modification were converted into nanoparticles using the ionic gelation method with sodium tripolyphosphate (TPP), and drug-loaded delivery systems were prepared by encapsulating paclitaxel at varying concentrations.

The nanoparticles were characterized using dynamic light scattering (DLS), zeta potential analysis, SEM/TEM imaging, and drug loading/encapsulation efficiency tests. The results showed that both the modification and the paclitaxel loading led to increases in particle size and polydispersity index, while zeta potential measurements indicated suitable electrostatic stability. Notably, nanoparticles prepared with 0.1% (w/v) chitosan concentration exhibited optimal properties in terms of narrow size distribution and positive surface charge.

In vitro cytotoxicity evaluations were conducted under normoxic and hypoxic conditions using the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. Blank nanoparticles, free paclitaxel, and paclitaxel-loaded nanoparticles were applied at different concentrations to the cells, and after 24 and 48 hours of incubation, cell viability was assessed using the MTT assay. The obtained data revealed no statistically significant differences in cell viability between the three

formulations ($p > 0.05$). These findings indicate that the hypoxia-sensitive modification with nitroimidazole did not yield the expected therapeutic enhancement under hypoxic conditions, and the advantages of controlled release were not prominent under the tested conditions.

While the chitosan-nitroimidazole-based nanoparticle system developed in this thesis demonstrated promising characteristics in terms of biocompatibility, stability, and drug loading capacity, it did not show a significant therapeutic advantage in vitro. It is therefore suggested that system parameters such as cell type, incubation duration, and concentration ranges be re-optimized to enhance the cytotoxic performance of the delivery system.

Key Terms: Breast cancer, hypoxia-responsive nanoparticles, chitosan, paclitaxel, targeted drug delivery, controlled release, MCF-7, cytotoxicity

Science Code: 20610

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezini tamamlamamda bana destek olan ve yol gösteren herkese içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Öncelikle, tez danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Burçin ÖZÇELİK'e rehberliği, anlayışlı tavsiyeleri ve sürekli ulaşılabilirliği için içtenlikle teşekkür ederim .

Tez savunma sınavımda yer alan sayın jüri üyelerine de ilgili geri bildirimleri ve bu çalışmayı değerlendirmek için ayırdıkları zaman için minnettarım.

Moleküler Biyoloji ve Genetik programının hocalarına da zenginleştirici öğretileri ve destekleri için teşekkür ederim.

Ayrıca, yoldaşlıkları ve verimli fikir alışverişlerimiz için öğrenci arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Manevi destekleri ve sarsılmaz cesaretlendirmeleri için başta annem ve babam olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma da çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu tezin tamamlanmasına herhangi bir şekilde katkıda bulunan, tanıdığım veya tanımadığım herkese teşekkür etmek istiyorum. Yardımlarınız paha biçilmezdi.

Nur Sena SUSAMCI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Tümör mikroçevresi ve metabolik adaptasyonlar	4
1.2. Moleküler farklılıklar ve genetik bozukluklar	4
1.3. Epigenetik düzenlemeler	5
1.4. Kanseri kök hücreleri ve terapötik direnç	5
1.5. Çevresel risk faktörleri	5
1.6. Kanseri mikroçevresi	5
1.7. Meme kanseri	7
1.8. Meme kanserinin epidemiyolojisi	9
1.9. Meme kanseri tedavi seçenekleri	9
1.10. Nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemleri	12
1.11. Kitosan nanopartikülleri	15
1.12. Kanseri kök hücreleri ve terapötik direnç	16

2. BÖLÜM

MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal	18
2.2. Method	18
2.1.1. Hipoksi duyarlı kitosan nanopartiküllerin sentezi	18
2.1.2. Karakterizasyon analizleri	21
2.1.3. <i>İn vitro</i> salım deneyleri	23
2.1.4. Sitotoksosite analizi	24
2.1.5. <i>İn vitro</i> çalışmalar	25
2.1.6. İstatistiksel analizler	29

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Nitroimidazol modifikasyonunun FTIR analizi ile doğrulanması	30
3.2. Boş nanopartiküllerin hazırlanması	31
3.3. Paklitaksel yüklü nanopartiküllerin hazırlanması	34
3.4. Yüzey morfolojisi analizi	36
3.5. Kitosan nitroimidazol nanaopartiküllerin yükleme kapasitesi	37
3.6. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları	39
3.7. <i>İn vitro</i> çalışmaları	40
3.7.1. Normoksik koşullarda hücre canlılığı.....	40
3.7.2. Hipoksik koşullarda hücre canlılığı	41

SONUÇ VE ÖNERİLER	42
--------------------------------	-----------

KAYNAKÇA	45
-----------------------	-----------

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1. Boş kitosan-nitroimidazole nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri	32
Tablo 3.2. Paklitaksel yüklü kitosan nitroimidazole nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri.....	35



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Kitosan nitroimidazole nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu histogramı	31
Şekil 3.2. Kitosan nitroimidazole nanopartiküllerden paklitaksel salımı	31
Şekil 3.3 Kitosan nanopartiküllerden paklitaksel salımı	29
Şekil 3.4. Kitosan ve kitosan- nitroimidazole nanopartiküllerden hipoksik ve normoksik koşullarda paklitaksel salımı	31



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	nanometre
mV	milivolt

Kısaltmalar

IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
TP53	Tumor Protein 53
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition (Epitel-Mezenkimal Geçiş)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid) (Poli(laktik-ko-glikolik asit))
PEG	Polyethylene Glycol (Polietilen Glikol)
MSI	Microsatellite Instability (Mikrosatellit İstabilitesi)
HPV	Human Papillomavirus (İnsan Papilloma Virüsü)
HDAC	Histone Deacetylase (Histon Deasetilaz)
miRNA	microRNA
KKH	Kanser Kök Hücreleri
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
IDC	Invasive Ductal Carcinoma (İnvaziv Duktal Karsinom)
ILC	Invasive Lobular Carcinoma (İnvaziv Lobüler Karsinom)
ER	Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
PR	Progesterone Receptor (Progesteron Reseptörü)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

TNBC	Triple Negative Breast Cancer (Üçlü Negatif Meme Kanseri)
BRCA1	Breast Cancer Gene 1 (Meme Kanseri Gen 1)



GİRİŞ

Kadınlar arasında en yaygın görülen malignite olan meme kanseri erkeklerde nadiren görülse de klinik açıdan önem arz eden bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan 2025 yılı raporuna göre, 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş ve 670.000'den fazla ölüm bu hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Elde edilen epidemiyolojik bulgular, meme kanserinin kadınlarda en yaygın görülen malign neoplazm olmaya devam ettiğini ve global sağlık yükü açısından öncelikli hastalıklar arasında yer aldığını ortaya koymaktadır.

Meme kanseri, yalnızca yüksek insidans oranı ile değil, aynı zamanda histolojik ve moleküler düzeyde sergilediği heterojen yapı ile de dikkat çekmektedir. Farklı alt tiplerin klinik seyir, tedavi yanıtı ve prognoz üzerinde belirgin etkileri bulunmakta; bu durum hem tedavi süreçlerinin karmaşıklığını artırmakta hem de bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını zorunlu kılmaktadır. Hastalığın yönetimi, lokal müdahaleleri (cerrahi, radyoterapi) ve sistemik yaklaşımları (kemoterapi, hormonal tedavi, hedefe yönelik tedaviler) içeren çok yönlü bir yaklaşımı zorunlu kılmaktadır. Özellikle erken evrelerde cerrahi ve radyoterapiyle yüksek başarı oranları elde edilebilirken, ileri evre veya metastatik vakalarda sistemik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, mevcut konvansiyonel tedavi yöntemleri genellikle ilaca direnç gelişimi, tedavi başarısızlığı ve yüksek nüks oranları gibi önemli sınırlılıklar barındırmakta olup, bu durum tedavi etkinliğini azaltmaktadır. Bu bağlamda, daha etkili, seçici ve düşük toksisiteye sahip yeni nesil tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olan gereksinim açıkça ortaya çıkmaktadır.

Son yıllarda geliştirilen hedefe yönelik akıllı ilaçlar, özellikle HER2 pozitif meme kanseri gibi alt tiplerde önemli başarılar elde edilmesini sağlamıştır. Ancak, tümör hücrelerinin biyolojik esneklik ve adaptif plastisite göstermesi nedeniyle bu ajanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Bu doğrultuda, daha etkili, seçici ve düşük toksisiteye sahip yeni nesil tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, günümüzde büyük bir öncelik haline gelmiştir. Bu sistemler arasında nanoteknolojiye dayalı ilaç taşıyıcı yapılar, özellikle dikkat çekici bir potansiyel sunmaktadır.

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, konvansiyonel kemoterapötiklerin çözünürlük ve biyoyararlanım sorunlarını aşmak, ilacı hedef bölgeye yönlendirmek ve sistemik toksisiteyi azaltmak amacıyla tasarlanmaktadır. Bu sistemler lipit bazlı yapılar (liposomlar, katı lipid nanopartiküller), polimerik nanopartiküller, dendrimerler, metal bazlı yapılar ve biyopolimerler (kitosan, jelatin, hiyaluronik asit) gibi çok çeşitli materyaller kullanılarak üretilmektedir. Nanopartiküller, hedef dokuya yönlendirilmiş ilaç salımı ile tümör bölgesinde ilacın kalış süresini artırmakta ve sağlıklı dokular üzerindeki yan etkileri minimuma indirmektedir. Ayrıca, biyoyumlu ve biyobozunur yapıları sayesinde klinik uygulamalarda güvenilirlik düzeylerini artırmaktadır.

Kitosan gibi doğal polimerler, hem biyouyumlulukları hem de yüzey modifikasyonuna uygunlukları nedeniyle kontrollü ilaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu polimerler, ilaçların tümör mikroçevresine özgü biyokimyasal değişkenliklere yanıt verecek şekilde tasarlanmasına imkân tanır. Benzer şekilde, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(kaprolakton) gibi sentetik polimerler de ilaç salım hızını ve stabilitesini kontrol edebilme kapasiteleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal ve sentetik polimerlerin akıllı kombinasyonları sayesinde çift etkili hedefleme ve mikroçevresel koşullara duyarlı sistemlerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır.

Tümör mikroçevresi, normal dokulardan farklı olarak düşük pH, hipoksi, yüksek reaktif oksijen türleri (ROS) ve glutatyon seviyeleri gibi özellikler sergilemektedir. Tümör mikroçevresinde gözlenen bu farklılıklar, duyarlı nanopartikül sistemlerinin hedefli ve kontrollü ilaç salımı için stratejik bir avantaj sunmaktadır. pH duyarlı sistemler, tümörün asidik mikroçevresinde aktive olurken, hipoksiye duyarlı sistemler düşük oksijen seviyelerinde etkinlik göstererek terapötik etkiyi artırmaktadır. Bu özellikler sayesinde, ilaç salımı sadece hedef bölgede gerçekleşmekte, sağlıklı dokular üzerindeki zarar minimize edilmektedir.

Hipoksi, özellikle hızlı proliferasyon gösteren ve yetersiz vaskülarizasyona sahip katı tümörlerde sıkça görülmekte olup, bu hipoksik fenotipin solid tümörlerin yaklaşık %50'sinde saptandığı bildirilmektedir. Hipoksik mikroçevre, hipoksi-indüklenmiş faktörler aracılığıyla tümör hücrelerinin hayatta kalma, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yeteneklerini artırmakta; aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gelişimine zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle, hipoksik alanlara özgü ilaç salımı sağlayan akıllı nanopartikül sistemleri, tedavi etkinliğini artırmak ve direnç mekanizmalarını aşmak açısından oldukça önem teşkil etmektedir.

Bununla birlikte, tümör mikroçevresindeki pH değişimleri de hedefe yönelik ilaç salımı için bir diğer fırsat alanı sunmaktadır. Normal fizyolojik pH ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında bu değer sıklıkla 6.5–6.8'e kadar düşmekte; lizozomal ve endozomal ortamlarda ise pH 5.0–5.5 seviyelerine gerilemektedir. pH duyarlı nanopartiküller bu farklılıklardan yararlanarak tümör bölgesinde aktif hale gelmekte ve ilacı yalnızca bu bölgelerde serbest bırakmaktadır. Böylece, yan etkiler azalırken terapötik indeks önemli ölçüde yükselmektedir.

Bu tez kapsamında, hipoksiye ve pH'ya duyarlı özelliklere sahip çift etkili bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi ve bu sistemin meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, hipoksiye duyarlı nitroimidazol türevleriyle modifiye edilmiş kitosan polimeri kullanılarak nanopartiküller sentezlenmiş, bu yapılar paklitaksel ile yüklenerek meme kanseri hücrelerine karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen sistemin, hem hipoksik hem de düşük pH'a sahip tümör mikroçevresine duyarlılığı sayesinde daha kontrollü ve hedefe yönelik ilaç salımını amaçlanmıştır. Bu çift duyarlı taşıyıcı sistemin, özellikle kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* olarak

gösterdiği terapötik etkinlik, klasik kemoterapilere kıyasla daha düşük yan etki profiliyle birlikte umut vadetmektedir.



1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Kanser, genetik ve epigenetik değişimlerin çevresel faktörlerle etkileşimi sonucu gelişen, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve invazyon yeteneği ile karakterize, karmaşık bir hastalık grubudur (Hanahan & Weinberg, 2011). Dünya genelinde ölüm nedenleri arasında üst sıralarda yer alan kanser, halk sağlığı açısından önemli bir küresel tehdit oluşturmaktadır (Bray et al., 2018). Normal hücreler, organizmanın homeostatik dengesi doğrultusunda sınırlı sayıda bölünerek, yaşlanma veya DNA hasarı durumlarında programlı hücre ölümü (apoptoz) yoluyla elimine edilmektedir (Elmore, 2007). Ancak kanser hücrelerinde bu düzen bozulmakta; hücre döngüsünün düzenleyici mekanizmalarının işlevsiz hale gelmesi sınırsız proliferasyona ve tümör oluşumuna yol açmaktadır (Evan & Vousden, 2001).

Bu kontrolsüz büyümenin temelinde, başta tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler olmak üzere çeşitli genlerde meydana gelen yapısal veya fonksiyonel bozukluklar yer almaktadır (Vogelstein & Kinzler, 2004). Malign hücreler yalnızca yerel dokuları istila etmekle kalmayıp, lenfatik veya hematolojik yollarla uzak organlara yayılmakta ve bu süreç metastaz olarak tanımlanmaktadır. Metastatik yayılım, kanserin yüksek mortalite oranlarına yol açmasında başlıca etkenlerden biri olarak değerlendirilmektedir. (Lambert et al., 2017).

1.1. Tümör mikroçevresi ve metabolik adaptasyonlar

Tümör mikroçevresi, kanser gelişimi ve progresyonunda belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu mikroçevre, stromal hücreler, bağışıklık sistemi bileşenleri, vasküler yapılar ve ekstraselüler matriks gibi çeşitli hücre ve hücre dışı bileşenlerden oluşan dinamik bir sistemdir (Quail & Joyce, 2013). Tümör hücreleri bu çevresel unsurlarla etkileşerek büyüme sinyalleri oluşturmakta ve bağışıklık baskılayıcı bir ortam inşa etmektedir. Ayrıca, kanser hücreleri enerji metabolizmalarını değiştirerek *Warburg etkisi* adı verilen bir adaptasyon süreci ile oksijen varlığında dahi anaerobik glikolize yönelmekte ve yüksek miktarda laktat üretmektedir (Warburg, 1956). Bu durum, tümör dokusunda asidik bir ortam oluşturarak hem bağışıklık hücrelerinin aktivitesini baskılamakta hem de ilaç duyarlılığını azaltmaktadır (Vander Heiden et al., 2009).

1.2. Moleküler farklılıklar ve genetik bozulmalar

Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında hücre döngüsü, adezyon, apoptoz ve invazyon gibi birçok biyolojik süreçte belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Özellikle *E-kadherin* gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma, epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) kolaylaştırmakta ve metastatik potansiyeli artırmaktadır (Cavallaro & Christofori, 2000; Thiery et al., 2009). Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, hücre proliferasyonunu artırmakta; tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, apoptoza yönelik sinyal yollarının bozulması neden olmaktadır (Downward, 2003; Vousden & Lane, 2007). Ayrıca, DNA tamir genlerinde meydana

gelen mutasyonlar genomik instabiliteyi artırmakta ve kanser progresyonunu hızlandırmaktadır (Boland & Goel, 2010).

1.3. Epigenetik düzenlemeler

Genetik bozuklukların yanı sıra epigenetik değişiklikler de kanserin oluşumunda kritik rol oynamaktadır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA ekspresyon profillerindeki değişiklikler, gen ekspresyonunun düzensiz hale gelmesine yol açmaktadır (Esteller, 2008). Özellikle tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyon yoluyla susturulması veya DNA hipometilasyonu ile onkogen aktivasyonunun artması, malign dönüşümü desteklemektedir (Jones & Baylin, 2007; Baylin & Jones, 2016). Histon deasetilazların (HDAC) aşırı aktivitesi de tümör baskılayıcı genleri inaktive edebilmekte ve bu durum HDAC inhibitörlerinin kanser tedavisinde potansiyel hedefler olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır (Glozak & Seto, 2007; Li & Seto, 2016). Ayrıca, miR-200 ailesi gibi mikroRNA'ların ekspresyonundaki azalma *EMT* sürecini kolaylaştırmakta ve metastazı hızlandırmaktadır (Calin & Croce, 2006; Iorio & Croce, 2012).

1.4. Kanser kök hücreleri ve terapötik direnç

Kanser kök hücreleri (KKH), tümörlerin nüks etmesi ve tedaviye dirençli hale gelmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kendini yenileme kapasitesine ve çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahip bu hücreler, tümör içindeki heterojeniteyi korumakta ve özellikle radyoterapi ile kemoterapiye karşı direnç göstermektedir (Batlle & Clevers, 2017; Phi et al., 2018). *Wnt/β-katenin*, *Notch* ve *Hedgehog* gibi sinyal yolları KKH'lerin aktivitesini kontrol etmekte ve bu yolları hedefleyen yeni nesil tedaviler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır (Takebe et al., 2015).

1.5. Çevresel risk faktörleri

Kanser gelişiminde genetik yatkınlık kadar çevresel ve yaşam tarzına bağlı risk faktörleri de etkilidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tütün kullanımı, alkol tüketimi, obezite, fiziksel hareketsizlik ve sağlıksız beslenmenin önlenmesiyle kanser vakalarının üçte birinin engellenebileceğini bildirmektedir (WHO, 2020). Tütün dumanında bulunan poliaromatik hidrokarbonlar ve nitrozaminler gibi mutajenik maddeler DNA hasarına neden olmaktadır (Hecht, 2012). Alkolün metaboliti olan asetaldehit, doğrudan genotoksik etki göstermekte; özellikle karaciğer, meme ve üst gastrointestinal sistem kanserlerinin riskini artırmaktadır (Baan et al., 2007). Ayrıca, enfeksiyöz etkenler – örneğin HPV, HBV ve HCV – kanser gelişiminde doğrudan rol oynamaktadır (Bosch et al., 2002; de Martel et al., 2020).

1.6. Kanser mikroçevresi

Kanser mikroçevresi, tümör hücrelerinin içinde bulunduğu ve yoğun etkileşimde bulunduğu hücresel ve hücre dışı bileşenlerden oluşan dinamik ve karmaşık bir ekosistemi temsil etmektedir. Bu mikroçevre; stromal hücreler, bağ dokusu elemanları, damar ağı, immün

hücreler ve çözünmüş moleküller gibi çeşitli komponentlerden oluşmakta olup, tümör gelişimi, invazyon, metastaz ve tedaviye verilen yanıtlar üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011). Kanseri mikroçevresinin karakteristik özellikleri arasında düşük pH, hipoksi, artmış glutatyon seviyeleri, yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) ve bozulmuş stromal-damar yapısı yer almaktadır.

- **pH farklılığı**

Tümör mikroçevresinin en ayırt edici özelliklerinden biri, normal dokuya göre daha düşük ekstraselüler pH seviyesine sahip olmasıdır. Fizyolojik koşullarda normal dokuların pH değeri yaklaşık 7.4 iken, malign dokularda bu değer genellikle 6.5–6.9 aralığına kadar düşmektedir (Webb et al., 2011). Bu asidifikasyonun başlıca nedenleri arasında artmış glikolitik aktiviteye bağlı olarak laktat üretiminin yükselmesi ve proton pompalarının aktif hale gelmesi yer almaktadır. Asidik mikroçevre, tümör hücrelerinin ilaçlara karşı direnç geliştirmesini kolaylaştırmakta ve invazif kapasitelerini artırmaktadır (Estrella et al., 2013). Bu bağlamda, pH-duyarlı akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, hedefe yönelik salım mekanizmaları sayesinde tedavi etkinliğini artırmak adına önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

- **Hipoksi**

Tümör mikroçevresinde sıklıkla gözlenen bir diğer patofizyolojik durum hipoksidir. Solid tümörlerin yaklaşık %50'sinde oksijen seviyelerinin düşüklüğü gözlemlenmekte ve bu durum, hem tümör hücrelerinin fenotipik adaptasyonlarını tetiklemekte hem de tedaviye direnç gelişimini hızlandırmaktadır (Harris, 2002). Hipoksik ortam, Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 alfa (HIF-1 α) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile anjiyogenez, metabolik yeniden programlama ve metastatik yayılım gibi olayları indüklemektedir (Semenza, 2003). Hipoksiye duyarlı ilaç taşıma sistemleri, yalnızca oksijenin yetersiz olduğu bölgelerde aktive olarak ilaç salımını gerçekleştirmekte ve böylece sistemik yan etkilerin azaltılması sağlanmaktadır.

- **Yüksek glutatyon seviyeleri**

Oksidatif stresin baskın olduğu tümör mikroçevresine adaptasyon sağlamak amacıyla, kanser hücrelerinde glutatyon düzeyleri fizyolojik hücrelere kıyasla anlamlı biçimde artış göstermektedir. (Traverso et al., 2013). Hücrel antioksidan savunma sisteminin bir bileşeni olan glutatyon, reaktif oksijen türlerini nötralize etmekte ve böylece hücrel redoks dengesini sürdürmektedir. Ancak bu durum, kemoterapi ajanlarının etkinliğini azaltmakta ve ilaç direnç mekanizmalarının gelişmesine katkı sunmaktadır (Franco & Cidlowski, 2012). Bu nedenle, glutatyon-duyarlı nanotaşıyıcı sistemlerin kullanımı, redoks dengesine müdahale ederek terapötik etkinliği artırma potansiyeli taşımaktadır.

- **Reaktif oksijen türleri (ROS)**

Tümör mikroçevresinde reaktif oksijen türlerinin düzeyi genellikle artmış olup, bu durum DNA hasarı, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu gibi hücresel stres mekanizmalarını tetiklemektedir (Trachootham et al., 2009). ROS'un kontrollü artışı tümör progresyonunu teşvik ederken, aşırı düzeyleri ise tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesine neden olabilmektedir. Bu çift yönlü etki göz önüne alındığında, ROS-duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler, tümör dokusunda lokal olarak aktive olan ilaç salım mekanizmaları ile tedavi etkinliğini artırmaktadır.

- **Stromal ve damar yapısı**

Tümör stroması; fibroblastlar, ekstraselüler matriks komponentleri, bağ dokusu elemanları ve immün hücrelerden oluşmakta ve tümör hücrelerine hem yapısal destek sağlamakta hem de büyüme, migrasyon ve anjiyogenez gibi süreçleri desteklemektedir (Lu et al., 2012). Tümör damarları ise genellikle düzensiz, geçirgenliği yüksek ve fonksiyonel olarak yetersiz bir yapıya sahiptir (Jain, 2005). Bu yapısal bozukluklar, ilaçların tümör içindeki dağılımını zorlaştırmakta; ancak aynı zamanda Gelişmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisi sayesinde nanopartiküllerin pasif olarak birikmesini kolaylaştırmaktadır. Bu durum, hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinin etkisini artırmaktadır.

1.7. Meme kanseri

Meme kanseri, meme dokusunda yer alan hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla karakterize edilen ve oldukça heterojen bir biyolojik yapıya sahip olan malign bir hastalık grubudur. Bu heterojenite, tanı ve tedavi süreçlerinin karmaşıklığını artırmakta olup, hastalığın alt tiplerine yönelik farklılaşan klinik yaklaşımları zorunlu kılmaktadır. Geleneksel olarak histopatolojik sınıflandırmalar tanı sürecinde önemli rol oynasa da, günümüzde moleküler alt tiplerin belirlenmesi, tedavi süreçlerinin belirlenmesinde yönlendirici bir unsur haline gelmiştir (Perou et al., 2000). Bu moleküler alt tipler, tümörlerin biyolojik davranışlarını, tedavi yanıtlarını ve prognozlarını anlamada kritik öneme sahiptir.

Histolojik alt tipler

Histolojik sınıflandırma, tümörün mikroskopik yapısına dayalı olarak yapılan bir alt gruplamadır. En sık karşılaşılan histolojik alt tipler arasında invaziv duktal karsinom (IDC) ve invaziv lobüler karsinom (ILC) yer almaktadır. IDC, süt kanallarından köken almakta olup, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %70-80'ini oluşturarak en yaygın alt tip olarak öne çıkmaktadır. Buna karşılık ILC, süt bezlerine yakın lobüler yapılardan kaynaklanmakta ve daha infiltratif bir yayılım paterni sergilemektedir. Bu iki ana alt tipe ek olarak; medüller karsinom, müsinöz karsinom, tübüler karsinom ve papiller karsinom gibi daha nadir görülen histolojik varyantlar da literatürde tanımlanmıştır (Lakhani et al., 2012).

Moleküler alt tipler

Meme kanserinin moleküler düzeyde sınıflandırılması, tümör dokularındaki gen ekspresyon profillerine dayalı olarak yapılmakta ve klinik açıdan daha isabetli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Perou ve arkadaşlarının (2000) öncülüğünü yaptığı çalışmalar sonucunda meme kanseri, genel olarak dört ana moleküler alt tipe ayrılmaktadır:

- **Luminal A alt tipi**, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, ancak HER2 negatif olan tümörleri kapsamaktadır. Bu tümörler genellikle düşük proliferasyon indeksine sahiptir ve hormonal tedavilere iyi yanıt vererek daha iyi bir prognoz sunmaktadır (Sorlie et al., 2001).
- **Luminal B alt tipi**, ER ve/veya PR pozitif özellikler taşımakla birlikte, daha yüksek proliferatif aktivite göstermekte ve HER2 pozitiflik oranı da daha fazladır. Bu alt grup, hem hormonal tedaviye hem de kemoterapiye daha fazla ihtiyaç duyan, daha agresif seyirli tümörleri kapsamaktadır (Cheang et al., 2009).
- **HER2 pozitif** tümörler, hücre membranında yüksek düzeyde HER2/neu proteini ekspresyonu veya ERBB2 gen amplifikasyonu göstermektedir. Klinik olarak hızlı büyüme eğilimi gösteren bu tümörler, hedefe yönelik tedavi ajanları (örneğin trastuzumab, pertuzumab) sayesinde tedaviye duyarlılık kazanmıştır (Slamon et al., 2001).
- **Üçlü negatif meme kanseri (TNBC)** ise, ER, PR ve HER2 ekspresyonu olmayan tümörlerden oluşmaktadır. Bu alt tip, sıklıkla genç kadınlarda ve BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında görülmekte olup, kötü prognoz, yüksek nüks riski ve sınırlı tedavi seçenekleri ile karakterizedir (Foulkes et al., 2010).
- **Diğer Moleküler Alt Tipler ve Belirteçler**

Bunlara ek olarak, daha nadir gözlenen bazı moleküler alt tipler de tanımlanmıştır. Claudin-düşük tümörler, hücreler arası bağlantı proteinlerinin düşük ekspresyonu ve mezenkimal özelliklerin baskın olduğu bir fenotip sergilemektedir (Prat et al., 2010). Ayrıca, meme kanserinin immünojenik profili üzerine yapılan çalışmalar, tümör mikrosimül ortamındaki immün hücre infiltrasyonunun da prognostik ve prediktif değer taşıdığını ortaya koymuştur.

Moleküler alt sınıflandırma, hastaya özgü hedefe yönelik tedavi protokollerinin geliştirilmesini mümkün kılmakta ve bu yönüyle kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının temelini oluşturmaktadır. Luminal alt tiplerde endokrin tedavi etkili olurken, HER2 pozitif tümörlerde monoklonal antikor temelli tedaviler devreye girmektedir. Buna karşılık TNBC alt grubunda, etkin hedefe yönelik ajanların bulunmaması, bu hastalar için yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyacı daha da artırmaktadır (Dent et al., 2007).

1.8. Meme kanserinin epidemiyolojisi

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen malign neoplazm olup, kansere bağlı mortalite nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Bray et al., 2018). IARC ve iş birlikçileri tarafından yayınlanan 2025 tarihli rapora göre, 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası tespit edilmiş ve bu vakalara bağlı yaklaşık 670.000 ölüm gerçekleşmiştir. Bu veriler, meme kanserinin kadınlarda en sık teşhis edilen malign neoplazm olmaya devam ettiğini ve küresel sağlık yükündeki yüksek payını koruduğunu göstermektedir (IARC, 2021). Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %24'ünü oluşturan meme kanseri, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını sürdürmektedir (Sung et al., 2021).

Meme kanseri kadınlarda büyük oranda görülmekle birlikte, erkeklerde de nadiren tanı konulmaktadır. Erkek meme kanseri, toplam meme kanseri vakalarının %1'inden daha azını oluşturmaktadır (Giordano, 2018). Bununla birlikte, erkeklerde genellikle daha geç evrede tanı konulması nedeniyle prognoz, kadınlara kıyasla daha olumsuz seyretmektedir (Fentiman, Fourquet, & Hortobagyi, 2006). Erkek meme kanseri gelişimi, hormonal dengesizlikler, Klinefelter sendromu, BRCA2 gen mutasyonları ve iyonizan radyasyona maruziyet gibi çeşitli etmenlerle ilişkilendirilmektedir.

Meme kanseri insidansı ve mortalitesi coğrafi bölgelere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansı daha yüksek olmasına rağmen, etkili tarama programları ve ileri tedavi olanakları sayesinde sağkalım oranları da yüksektir. Buna karşın, gelişmekte olan ülkelerde hastalık genellikle ileri evrede tespit edilmekte ve bu durum mortalite oranlarının artmasına neden olmaktadır (Bray et al., 2018). Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da yüksek insidans oranlarına karşın sağkalım oranları da yüksektir. Ancak Sahra Altı Afrika ve Güney Asya gibi bölgelerde, erken teşhis olanaklarının yetersizliği nedeniyle mortalite oranları daha yüksektir (Sung et al., 2021).

Meme kanseri etiyolojisinde genetik, hormonal, çevresel ve yaşam tarzına bağlı birçok risk faktörü rol oynamaktadır. Genetik faktörler arasında en önemlileri BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarıdır. BRCA1 mutasyonu taşıyan bireylerde yaşam boyu meme kanseri riski %60–80'e kadar çıkabilirken, BRCA2 mutasyonlarında bu oran %45–70 arasında değişmektedir (Antoniou et al., 2003). Ayrıca TP53, PTEN ve PALB2 gibi diğer tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar da meme kanseri riskini artıran önemli faktörler arasındadır.

Hormonal faktörler de hastalık riskini doğrudan etkilemektedir. Yüksek düzeyde östrojen ve progesteron maruziyeti, meme epitel hücrelerinin proliferasyonunu artırarak malign dönüşüme zemin hazırlamaktadır (Key, Verkasalo, & Banks, 2001). Bu nedenle, erken menarş (<12 yaş), geç menopoz (>55 yaş) ve ilk doğumun ileri yaşta gerçekleşmesi (>30 yaş) gibi uzun süreli hormonal uyarımı artıran durumlar, meme kanseri riskini belirgin şekilde yükseltmektedir (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012).

Çevresel ve yaşam tarzına bağlı etkenler de hastalık gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Postmenopozal obezite, östrojen üretiminin artmasına neden olarak hormon reseptör pozitif meme kanseri riskini artırmaktadır (Renehan et al., 2008). Ayrıca, obeziteye bağlı gelişen hiperinsülinemi ve kronik inflamasyon, tümör mikroçevresinin oluşumunu destekleyerek kanser gelişimini kolaylaştırabilmektedir.

Alkol tüketimi, özellikle östrojen reseptör pozitif meme kanseri riskini artıran çevresel faktörlerden biridir. Günde birden fazla alkollü içecek tüketimi, meme kanseri gelişme olasılığını anlamlı düzeyde yükseltmektedir (Allen et al., 2009). Benzer şekilde, sigara kullanımı, özellikle genç yaşta başladığında, meme kanseri insidansını artırıcı yönde etkide bulunmaktadır.

Radyasyon maruziyeti, özellikle çocukluk veya ergenlik döneminde yüksek doz radyoterapi alan bireylerde meme kanseri gelişme riskini artırmaktadır. Örneğin, Hodgkin lenfoması tedavisi kapsamında göğüs bölgesine radyoterapi uygulanan bireylerde ilerleyen yıllarda meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır (Travis et al., 2003).

Son olarak, yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları da meme kanseri gelişimi üzerinde etkilidir. Yüksek yağ içeriğine sahip diyetler, düşük fiziksel aktivite düzeyi ve sedanter yaşam tarzı, hastalık riskini artırmaktadır. Buna karşın, düzenli fiziksel aktivite, özellikle postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskini azaltıcı bir etki göstermektedir (Lahmann et al., 2007).

1.9. Meme kanseri tedavi seçenekleri

Meme kanseri tedavisi; tümörün evresi, histolojik ve moleküler alt tipi, hastanın genel sağlık durumu ve hormon reseptör durumu gibi çok sayıda klinik parametreye bağlı olarak şekillendirilmektedir. Bu bağlamda, tedavi yaklaşımları sıklıkla cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavi ve hedefe yönelik ajanları içeren multidisipliner kombinasyonlardan oluşmaktadır (Harbeck et al., 2019). Söz konusu bütüncül stratejiler, hastalık prognozunun iyileştirilmesi ve nüks riskinin azaltılması amacıyla uygulanmaktadır.

Cerrahi yaklaşım

Cerrahi müdahale, özellikle erken evre meme kanserlerinde primer tedavi yöntemlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Cerrahi tedavide temel olarak iki yöntem uygulanmaktadır: meme koruyucu cerrahi (lumpektomi) ve mastektomi. Lumpektomi, tümörün etrafındaki sağlam doku ile birlikte eksize edilmesini kapsarken; mastektomi, tüm meme dokusunun çıkarılmasını içermektedir (McGuire et al., 2015). Meme koruyucu cerrahiye takiben genellikle radyoterapi uygulanarak lokal kontrolün sağlanması ve kozmetik sonuçların iyileştirilmesi hedeflenmektedir (Fisher et al., 2002). Ayrıca, sentinel lenf nodu biyopsisi, aksiller metastazların saptanmasında ve gereksiz lenf nodu diseksiyonunun önlenmesinde önemli bir tanı aracıdır.

Radyoterapi

Radyoterapi, lokal kontrolü artırmak ve rekürrens riskini azaltmak amacıyla cerrahi tedaviyi tamamlayıcı bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Özellikle meme koruyucu cerrahi sonrası adjuvan radyoterapi, sağkalım oranlarını anlamlı ölçüde artırmaktadır (Clarke et al., 2005). IMRT ve 3D konformal radyoterapi gibi gelişmiş radyoterapi teknikleri hedef dokuya spesifik ışınlamayı mümkün kılmakta ve sağlıklı çevre dokuların zarar görme olasılığını en aza indirmektedir (Bartelink et al., 2001).

Kemoterapi

Kemoterapi, sistemik yayılım potansiyeli taşıyan veya metastatik hastalıkta standart tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Uygulanan rejimler sıklıkla antrasiklin ve taksan temellidir. Ayrıca alkilleyici ajanlar, antimetabolitler ve platin türevi bileşikler de tedavi protokollerinde yer almaktadır (Harbeck et al., 2019).

- **Antrasiklinler**, topoizomera II inhibisyonu yoluyla DNA kırıkları oluşturarak apoptozu indüklemektedir (Pommier et al., 2010). Ancak kardiyotoksisite potansiyeli nedeniyle dikkatli kullanılmaları gerekmektedir (Swain et al., 2003).
- **Taksanlar**, mikrotübül stabilizasyonu sağlayarak mitozun durmasına ve programlı hücre ölümüne yol açmaktadır (Rowinsky & Donehower, 1995).
- **Antimetabolitler**, DNA sentezine müdahale ederek proliferasyonu baskılamaktadır (Longley et al., 2003).
- **Platin bileşikler**, DNA'ya çapraz bağlar oluşturarak hücre ölümünü tetiklemektedir. Özellikle triple negatif alt tiplerde tercih edilmektedir (Lehmann et al., 2011).

Hormon (endokrin) tedavisi

Östrojen ve/veya progesteron reseptör pozitif (ER+/PR+) tümörlerde endokrin tedavi, hastalık kontrolünde etkili bir strateji sunmaktadır. Selektif östrojen reseptör modülatörleri ve aromataz inhibitörleri, hormon sinyallemesini engelleyerek tümör proliferasyonunu baskılamaktadır (Cuzick et al., 2010). Adjuvan endokrin tedavi, özellikle postmenopozal kadınlarda nüks riskini %40-50 oranında azaltmaktadır (Dowsett et al., 2010).

Hedefe yönelik tedaviler

Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerinin spesifik biyolojik özelliklerine karşı geliştirilen ajanları kapsamaktadır. HER2 pozitif meme kanseri vakalarında, HER2 reseptörüne karşı geliştirilen trastuzumab, tedavide standart hale gelmiştir (Slamon et al., 2001). Trastuzumab'a ek olarak pertuzumab ve lapatinib gibi diğer HER2 hedefli ajanlar da etkinlik göstermektedir. Triple negatif meme kanseri (TNBC) gibi moleküler olarak hedeflenmesi zor tümörlerde ise immün kontrol noktası inhibitörleri gibi yeni nesil tedavi seçenekleri araştırılmaktadır (Schmid et al., 2018).

İmmünoterapi

İmmünoterapi, özellikle triple negatif meme kanseri gibi immünojenik tümör alt tiplerinde umut vadeden bir yaklaşımdır. Programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) inhibitörleri, tümör mikroçevresinde immün yanıtı güçlendirerek tümör hücrelerinin immün kaçışını engellemektedir. Atezolizumab ve pembrolizumab gibi ajanlar, TNBC’de klinik kullanım onayı almış ve tedavi seçeneklerini genişletmiştir (Emens et al., 2019).

1.10. Nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemleri

Nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri, terapötik ajanların hedeflenen dokulara kontrollü ve etkili bir biçimde ulaştırılmasını amaçlayan ileri düzey nanoteknolojik platformlardır. Bu sistemler, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini iyileştirerek sistemik dolaşımda daha uzun süre kalmalarını sağlamakta ve hedef dokularda optimal terapötik konsantrasyonlara ulaşmalarına olanak tanımaktadır (Peer et al., 2007). Ayrıca bu sistemler, ilacın biyoçözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırarak, konvansiyonel ilaç formlarına kıyasla daha etkin ve güvenli bir ilaç salım mekanizması sunmaktadır.

Nanopartiküller genellikle 1–100 nanometre çapında olup, sahip oldukları fiziksel ve kimyasal yüzey özellikleri sayesinde yüksek ilaç taşıma kapasitesi, biyoyumluluk ve hedefleme potansiyeli göstermektedir. Lipid bazlı yapılar, polimerik taşıyıcılar ve metalik nanopartiküller gibi farklı kompozisyonlara sahip sistemler geliştirilmiştir (Bae et al., 2011).

- **Lipozomlar**, fosfolipid çift tabakadan oluşan ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaç moleküllerini taşıyabilen yapılar olup, sistemik toksisiteyi azaltmakta ve hedefe yönelik etkili dağılım sağlamaktadır (Torchilin, 2005). Aktif hedefleme için yüzeylerine ligand veya antikor eklenebilen bu yapılar, spesifik tümör hücrelerine seçici bağlanma kabiliyetine sahiptir.
- **Solid lipid nanopartiküller (SLN’ler)**, biyoyumlu lipidlerden oluşur ve uzun süreli ilaç salımı sağlayarak plazma ilaç konsantrasyonunu sabit tutar. Lipozomlara kıyasla daha stabil olmaları, onları özellikle kanser tedavisinde cazip kılmaktadır (Müller et al., 2002).
- **Polimerik nanopartiküller**, biyoyumluluk, biyobozunurluk, kontrollü ilaç salımı ve yüzey modifikasyon kabiliyeti gibi avantajlar sunarak kanser tedavisinde yaygın olarak tercih edilen ilaç taşıma sistemleridir. Bu nanopartiküller, doğal ya da sentetik polimerlerden sentezlenmekte olup, ilaçların hem sistemik hem de lokal hedeflenmiş salımına olanak tanımaktadır.

Doğal kaynaklı biyopolimerler, toksisite riskinin düşük olması ve biyobozunur yapıları sayesinde özellikle tercih edilmektedir. Kitosan, pozitif yüzey yüküne sahip olması sayesinde hücre membranlarıyla güçlü etkileşim kurabilmekte ve bu özelliği ile hücre içine ilaç taşınmasında avantaj sağlamaktadır. Ayrıca pH duyarlılığı, tümör

mikroçevresindeki asidik ortamda kontrollü ilaç salımı yapmasına olanak tanır; bu sayede hedefe yönelik etkinlik artırılırken sistemik yan etkiler azaltılmaktadır (Agnihotri et al., 2004). Alginat, kahverengi deniz yosunlarından elde edilen bir biyopolimer olup, jelleşme kapasitesi sayesinde özellikle hidrofilik ilaçların yavaş ve kontrollü salımında etkilidir. Yumuşak yapısı ve biyouyumluluğu, alginat bazlı sistemleri doku mühendisliği ve ilaç taşıma uygulamalarında ideal kılmaktadır. Jelatin, doğal bir protein olup biyobozunurluğu ve esnekliği ile öne çıkar. İlaç yükleme esnekliği sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınmasında kullanılabilir.

Sentetik polimerler, yapısal kontrol edilebilirlikleri ve daha geniş fonksiyonel modifikasyon kapasiteleri nedeniyle ilaç taşıma sistemlerinin tasarımında sıkça kullanılmaktadır. PLGA (poli-laktik-ko-glikolik asit), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir biyobozunur polimer olup, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinden oluşur. Bozunma hızı, bu monomerlerin oranına göre ayarlanabildiğinden, PLGA tabanlı nanopartiküller ilaçların uzun süreli ve kontrollü salımı için uygun bir taşıyıcı sistemdir (Makadia & Siegel, 2011). PEG (polietilen glikol), suyla yüksek derecede etkileşime giren ve immün sistem tarafından tanınmayı önleyen hidrofilik bir polimerdir. Nanopartikül yüzeyine PEG kaplanması, dolaşım süresini uzatarak ilacın hedef dokuya ulaşmasını kolaylaştırır ve "stealth" (gizli) taşıyıcı görevi görmesini sağlar (Blanco et al., 2015). PCL (polikaprolakton), yarı kristalin ve yavaş bozulan bir polimerdir. Bu özelliği sayesinde uzun süreli ilaç salımı gerektiren tedavi protokollerinde tercih edilmektedir. Özellikle hidrofobik ilaçların stabilitesini koruyarak hedef dokuya yönlendirilmesini sağlar (Dash & Konkimalla, 2012). PMMA (polimetil metakrilat) ise yüksek mekanik stabiliteye ve yüzey modifikasyon kapasitesine sahip olup, nanopartikül formunda ilaçları kapsülleyerek hedef dokuya salım sağlayabilir. Hidrofobik yapısı, özellikle hidrofobik anti-kanser ilaçların daha uzun süre stabil kalmasına olanak tanır (Kim et al., 2010). Sentetik polimerlerin kontrollü üretim süreçleri, partikül boyutu, yüzey yükü ve ilaç salım profili gibi parametrelerin hassas biçimde ayarlanmasına imkân tanıyarak tedavi etkinliğini artırmaktadır.

Nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemleri, tümör mikroçevresine özgü biyokimyasal parametreler göz önünde bulundurularak tasarlanmakta ve bu sayede kontrollü ilaç salımı hedeflenmektedir. Tümör mikroçevresinde yaygın olarak gözlemlenen asidik pH ve hipoksik koşullar, bu tür sistemlerin etkinliği açısından önemli tetikleyici faktörler olarak değerlendirilmektedir (Bae et al., 2011). Bu çevresel farklılıkların ilaç taşıyıcı sistemlerde hedefli ve kontrollü salım mekanizmalarıyla entegre edilmesi, tedavi etkinliğini artırmakta ve sistemik toksisiteyi azaltmaktadır.

- **pH duyarlı nanopartikül sistemleri**

Tümör dokularında genellikle pH değerinin 6,5–6,9 arasında değişmesi, normal dokulara kıyasla anlamlı bir asidik ortam oluşturmaktadır (Webb et al., 2011). Bu farklılık, pH duyarlı nanopartikül sistemlerinin yalnızca tümör bölgesinde aktifleşmesine olanak tanımaktadır. Bu amaçla geliştirilen sistemler genellikle zayıf asidik veya bazik gruplar içeren polimerler kullanılarak tasarlanmaktadır. Bu polimerik yapılar, asidik ortamda protonlanma veya deprotonlanma yoluyla konformasyonel değişikliğe uğrayarak ilaç salımını tetiklemektedir. Örneğin, kitosan bazlı nanopartiküller düşük pH seviyelerinde çözünerek ilacın salımını başlatmaktadır (Agnihotri et al., 2004). Benzer şekilde, alginat ve PLGA gibi biyobozunur polimerler, kontrollü bozunma özellikleri sayesinde lokalize ilaç iletimi sağlamaktadır.

Bu sistemlerde kontrollü salım, genellikle nanopartikül matrisinin düşük pH'ta genleşmesi veya çözünmesiyle gerçekleşmektedir. Böylece, ilacın yalnızca hedeflenen tümör dokusunda serbest kalması sağlanmakta, sistemik yan etkiler minimize edilmektedir. Kitosan ve alginat gibi mukoadesif özellik taşıyan biyopolimerler, nanopartiküllerin hedef bölgede daha uzun süre tutunmasına olanak tanımakta ve bu sayede terapötik etkinlik artırılmaktadır (Makadia & Siegel, 2011).

- **Hipoksiye duyarlı nanopartikül sistemleri**

Solid tümörlerin yaklaşık %50'sinde görülen hipoksik mikroçevre, tedaviye direnç ve agresif tümör fenotiplerinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Semenza, 2003). Bu nedenle, hipoksiye duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, hedefli kanser tedavileri için umut vadetmektedir. Hipoksiye duyarlılık, çoğunlukla nitroimidazol gibi fonksiyonel grupların kullanımıyla sağlanmaktadır. Bu gruplar, hipoksik ortamlarda redüktaz enzimleri tarafından indirgenerek aktif hale gelmekte ve böylece taşıyıcı sistem içerisindeki ilacın yalnızca oksijen düzeyinin düşük olduğu bölgelerde serbest bırakılmasını mümkün kılmaktadır (Brown & Wilson, 2004).

- **Çift duyarlı sistemler**

Son yıllarda geliştirilen çift etkili (pH ve hipoksiye duyarlı) nanopartikül sistemleri, tümör mikroçevresinin iki temel patofizyolojik özelliğini hedef alarak tedavi etkinliğini daha da artırmaktadır. Bu sistemlerde, nanopartiküller hem asidik ortamda çözünmekte hem de hipoksik koşullarda aktifleşerek ilacın yalnızca tümör dokusunda salımını gerçekleştirmektedir. Böylece, sağlıklı dokuların zarar görme riski azaltılmakta ve ilacın terapötik konsantrasyonu hedef bölgeye daha etkin bir şekilde ulaştırılmaktadır (Gillies et al., 2012). Bu çift tetiklemeli sistemlerin, hem farmakokinetik profili iyileştirme hem de ilaca direnç gelişimini engelleme potansiyeli, onları yenilikçi ve umut verici tedavi yaklaşımları haline getirmektedir.

- **Manyetik alanla yönlendirilebilen nanopartiküller,** özellikle süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPIONs) kullanılarak geliştirilmektedir. Harici bir manyetik alan uygulandığında, bu partiküller hedef tümör bölgesine yönlendirilmekte ve burada birikerek lokal ilaç salımı gerçekleştirmektedir (Laurent et al., 2008). Ayrıca manyetik hipertermi yöntemiyle bu sistemler, belirli bir sıcaklıkta aktive olarak tedaviye ek fayda sağlamaktadır. Böylece hem tanı hem de tedavi süreçlerinde çok yönlü bir etki elde edilmektedir.

1.11. Kitosan nanopartikülleri ve modifikasyon yöntemleri

Kitosan, kitin'in deasetilasyonu sonucu elde edilen, pozitif yüzey yüküne sahip doğal bir polisakkarittir. Sahip olduğu amino gruplar sayesinde kimyasal olarak modifiye edilebilir yapıda olup; biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük toksisite gibi özellikleriyle ideal bir biyomateryal niteliği taşımaktadır (Agnihotri et al., 2004; Rinaudo, 2006). Kitosan, enzimatik degradasyona uğrayarak toksik olmayan yan ürünlere ayrışmakta ve bu özelliği sayesinde klinik uygulamalarda güvenli kullanım imkânı sunmaktadır (Patrula et al., 2015). Ayrıca, biyolojik sıvılarda gösterdiği stabilite ve çevre dostu yapısı, onu ilaç taşıyıcı sistemlerde önemli bir aday haline getirmektedir.

Kitosan, enzimatik yollarla kolaylıkla parçalanabilmekte ve metabolitleri organizma tarafından tolere edilebilmektedir. Bozunma ürünlerinin biyolojik sistemler için toksik olmaması, kitosani uzun süreli biyomedikal uygulamalarda avantajlı kılmaktadır (Patrula et al., 2015). Ayrıca, kitosanın pozitif yüklü yapısı bakteriyel zarlarla elektrostatik etkileşim kurarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Rinaudo, 2006). Bu antimikrobiyal özellik, yara enfeksiyonlarının önlenmesi ve kollajen sentezini teşvik ederek yara iyileşmesini hızlandırması açısından da önemlidir.

Kitosan, farklı sentez yöntemleriyle nanopartikül yapısına dönüştürülebilmekte ve bu sayede kontrollü ilaç taşıma sistemleri geliştirilebilmektedir.

- **İyonik jelasyon:** Kitosan, negatif yüklü çapraz bağlayıcılar ile etkileşime girerek jel yapıya dönüşmektedir. Bu yöntem, biyolojik moleküller için uygun, hafif koşullarda gerçekleştiği için biyolojik aktivitenin korunmasına olanak tanımaktadır (Calvo et al., 1997).
- **Emülsiyon temelli teknikler:** Kitosan, yağ-su veya su-yağ-su tipinde emülsiyon ortamlarında nanopartikül haline getirilmektedir. Bu teknik, özellikle hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için uygundur ve stabiliteyi arttırmak amacıyla çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılmaktadır (Makadia & Siegel, 2011).
- **Koaservasyon:** Biyopolimer faz ayrışmasına dayanan bu teknikte, kitosan damlacıkları uygun pH ve iyonik koşullar altında yoğunlaşmakta ve çapraz bağlanarak stabil nanopartiküller oluşturmaktadır (Rinaudo, 2006).

- **Sprey kurutma:** Bu yöntemde kitosan çözeltisi atomize edilerek sıcak hava akımı altında kurutulmakta ve homojen, küçük boyutlu nanopartiküller elde edilmektedir. Sprey kurutma, özellikle endüstriyel ölçekli üretimler için tercih edilmektedir (Patrulea et al., 2015).

Bu yöntemlerin tümü, ilaçların hedefe yönelik taşınması, mukoadeziflik, stabilite ve kontrollü salım gibi farmasötik avantajlar sağlamaktadır (Agnihotri et al., 2004).

Kitosan, fiziksel ve kimyasal modifikasyonlara uygun yapısı sayesinde çeşitli çevresel faktörlere duyarlı ve hedefe özgü tedavi sistemleri geliştirmek amacıyla fonksiyonelleştirilebilmektedir:

- **Hipoksiye duyarlı modifikasyon: nitroimidazol bağlanması**

Nitroimidazol grupları, hipoksik ortamlarda indirgenebilir kimyasal yapıları nedeniyle hipoksiye duyarlı sistemlerde kullanılmaktadır. Kitosan zincirine nitroimidazol bağlanması, hipoksik mikroçevrede aktifleşen ve ilaç salımını tetikleyen bir yapı oluşturmaktadır (Brown & Wilson, 2004). Bu sistemler, HIF-1 α 'nın yoğun olarak ekspresse edildiği bölgelerde selektif olarak aktifleşmekte, böylece tümör bölgesinde terapötik etkiyi artırırken sağlıklı dokularda toksisiteyi en aza indirmektedir (Gillies et al., 2012).

- **pH duyarlılığı ve ligand temelli modifikasyonlar**

Kitosanın asidik ortamlarda protonlanabilen yapısı, onu pH-duyarlı ilaç salımı için uygun hale getirmektedir. Özellikle tümör mikroçevresinin düşük pH değerlerinden faydalanılarak, sadece tümör bölgesinde ilaç salımı sağlanmaktadır (Webb et al., 2011). Bunun yanı sıra, folik asit ve transferrin gibi hücre yüzeyi reseptörlerine özgü ligandlarla fonksiyonelleştirme, kitosan nanopartiküllerinin hedefleme kapasitesini önemli ölçüde artırmaktadır (Kumar et al., 2004). Bu ligandlarla modifiye edilen sistemler, kanser hücrelerine spesifik bağlanarak etkinlik sağlamak ve sistemik yan etkileri azaltmaktadır.

1.12. Paklitaksel ve meme kanseri tedavisindeki önemi

Paklitaksel, mitotik bölünmenin düzenlenmesinde görev alan mikrotübül yapısına etkisi nedeniyle solid tümörlerin kemoterapisinde sıklıkla tercih edilen etkili bir ajan olarak öne çıkmaktadır. Özellikle meme kanseri tedavisinde geniş klinik kullanım alanı bulmakta ve etkinliği çok sayıda klinik çalışma ile desteklenmektedir (Rowinsky & Donehower, 1995).

Paklitaksel, hücre döngüsünün G2/M fazında etkili olarak mikrotübül polimerizasyonunu stabilize etmekte ve bu yapıların normalde olması gereken dinamik yapısını bozarak mitotik iğ oluşumunu engellemektedir. Mikrotübüllerin aşırı stabilizasyonu, depolimerizasyonu önlemekte, bu durum ise kromozomların düzgün ayrılmasını imkânsız hale getirmektedir (Schiff et al., 1979). Böylece mitoz, metafaz-anafaz geçişinde durmakta ve hücre, apoptotik

yıkıma sürüklenmektedir (Jordan & Wilson, 2004). Bu mekanizma, hızlı bölünen tümör hücrelerinde hedefe yönelik bir etki oluşturmaktadır.

Paklitaksel tedavisine karşı gelişen en önemli sınırlayıcı faktörlerden biri, zamanla ortaya çıkan ilaca karşı hücreSEL direnç mekanizmalarıdır. Bu bağlamda, çoklu ilaç direnci (MDR) olarak tanımlanan durum ve P-glikoprotein (P-gp) aracılığıyla gerçekleşen ilaç dışı atım mekanizması ön plana çıkmaktadır (Gottesman et al., 2002). P-gp, ATP'ye bağlı bir taşıyıcı protein olarak paklitakselin hücre içine girişini engellemekte ve ilacın dış ortama aktif transportunu gerçekleştirmektedir (Fletcher et al., 2010). Bu durum, paklitakselin mikrotübüllere erişimini azaltmakta ve tedavi yanıtını düşürmektedir. Direnci aşmak amacıyla, P-gp inhibitörleri ve nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin kombinasyonu gibi yenilikçi stratejiler geliştirilmektedir.

Paklitakselin hidrofobik yapısı, suda çözünürlüğünü sınırlandırmakta ve sistemik biyoyararlanımını düşürmektedir. Bu problemi aşmak amacıyla, nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiş ve paklitakselin daha etkili formülasyonları klinik kullanım potansiyeline kavuşmuştur (Singla et al., 2002).

- Lipit bazlı nanotaşıyıcılar, polimerik nanopartiküller (PLGA, PEG gibi biyobozunur polimerler) ve misel sistemleri kullanılarak paklitaksel çözünür hale getirilmekte ve hedefe daha etkin taşınmaktadır (Mu & Feng, 2003).
- Nanopartikül sistemleri sayesinde kontrollü ilaç salımı sağlanmakta, böylece sistemik toksisite azaltılmakta ve tümör dokusunda daha yüksek konsantrasyon elde edilmektedir.
- EPR etkisinden yararlanılarak, nanopartiküllerin pasif hedefleme ile tümör dokusunda birikmesi mümkün olmaktadır (Maeda et al., 2000).
- Paklitaksel yüklü liposomlar gibi taşıyıcılar, ilacın hedef dokuya yönlendirilmiş salımını sağlayarak tedavi etkinliğini artırmakta ve sağlıklı dokuların zarar görmesini en aza indirmektedir (Immordino et al., 2006).

2. BÖLÜM

MATERYAL ve METHOD

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, kitosan bazlı hipoksiye ve pH'a duyarlı nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu için gerekli olan tüm kimyasal maddeler, hücre hatları ve deney cihazları titizlikle seçilmiştir. Nanopartikül sentezinde kullanılacak kitosan (Orta moleküler ağırlık, Sigma-Aldrich, ABD), çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan sodyum tripolifosfat (TPP) (Merck, Almanya) ve hipoksiye duyarlılığı sağlamak üzere modifikasyonda kullanılan nitroimidazol (Alfa Aesar, ABD) bu süreçte temel reaktifler arasında yer almıştır. Paklitaksel (Sigma-Aldrich, ABD) ise aktif ilaç olarak nanopartiküllere yüklenmiştir. Ayrıca, fosfat tamponlu çözelti (PBS, pH 7.4) (Gibco, ABD) ve farklı pH koşullarında hazırlanan tampon çözeltileri, *in vitro* salım deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Çalışma boyunca, hücre kültürü deneyleri için MCF-7 (meme adenokarsinom) ve MDA-MB-231 (triple negatif meme kanseri) hücre hatları kullanılmıştır (ATCC, ABD). Hücreler, %10 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, ABD) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin karışımı, Gibco, ABD) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir.

Deneylerin uygulanmasında ve karakterizasyon analizlerinde kullanılacak cihazlar da önem taşımaktadır. Nanopartikül sentezinde ultrasonikasyon cihazı (Bandelin Sonopuls HD 3200, Almanya) ve manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya) kullanılmıştır. Nanopartikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) analiz cihazı (Malvern Zetasizer Nano ZS, Birleşik Krallık) ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve yapısal özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss EVO LS 10, Almanya) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM, JEOL JEM-2100, Japonya) ile analiz edilmiştir. Kimyasal modifikasyonların doğrulanması için FTIR spektroskopisi (Bruker Tensor II, Almanya) ve kristal yapı analizleri için X-ışını kırınım cihazı (XRD, Rigaku MiniFlex, Japonya) kullanılmıştır.

2.2. Method

2.2.1. Kitosan ve hipoksi-duyarlı kitosan nanopartiküllerinin sentezi

Bu tez çalışmasında, hipoksi-duyarlı kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesi 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kitosan polimeri hipoksiye duyarlı nitroimidazol grupları ile kimyasal modifikasyon yöntemi ile fonksiyonelleştirilmiştir. Ardından iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak boş ve paklitaksel yüklü nitroimidazol-kitosan nanopartiküller sentezlenmiştir.

2.2.1.1. Nitroimidazol modifikasyonu

Nitroimidazol gruplarının kitosan polimerine bağlanması, literatürde tanımlanmış kimyasal modifikasyon protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Hu et al., 2015). İlk olarak, %0,1 (w/v) oranında kitosan çözeltisi hazırlanmış ve bu amaçla düşük molekül ağırlıklı kitosan, %1 (v/v) asetik asit içinde çözündürülmüştür.

Bağlanma reaksiyonu öncesinde nitroimidazol grupları, karbodiimid temelli çapraz bağlayıcı sistem kullanılarak kimyasal olarak aktive edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 20 mg/ml konsantrasyonda nitroimidazol çözeltisi hazırlanmıştır. EDC [N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid] ve NHS [N-hidroksisüksinimid], nitroimidazol çözeltisine ilave edilerek karışım 1:1.2:1.2 molar oranında hazırlanmıştır. Karışım, oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika boyunca aktivasyonun tamamlanması için manyetik karıştırıcı altında karıştırılmıştır.

Aktivasyon sürecinin tamamlanmasının ardından hazırlanan kitosan çözeltisi damla damla reaktif karışımına eklenmiştir. Sistem manyetik karıştırıcı altında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan kitosan-nitroimidazol kompleksleri, 10.000 rpm'de 20 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilerek saflaştırılmış ve oluşan çökelti serbest reaktiflerin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez deiyonize su ile yıkanmıştır.

Modifikasyonunun doğrulanması FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Spektrumda, nitroimidazolün karakteristik pikleri ve kitosan yapısında meydana gelen değişiklikler analiz edilerek kimyasal bağ oluşumu teyit edilmiştir.

2.2.1.2. Boş kitosan ve boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin iyonik jelasyon tekniği ile hazırlanması

Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir (Gutiérrez-Ruiz, Cortes, González-Torres, et al., 2024). Bu yöntem kapsamında, ilk olarak kitosan veya kitosan-nitroimidazol polimer %1 (v/v) asetik asit içerisinde çözündürülmüş ve çözeltinin pH değeri 5,5'e ayarlanmıştır. Elde edilen kitosan veya kitosan-nitroimidazol çözeltileri, manyetik karıştırıcı altında 600 rpm hızında 1 saat süreyle karıştırılarak homojen bir yapı elde edilmiştir. Bu aşamada kitosan nanopartiküllerin ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde polimer konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla %0,3, %0,4 ve 0,5 (w/v) olmak üzere 3 farklı konsantrasyon denenmiştir.

Nanopartikül oluşumu, elektrostatik çapraz bağlanmaya dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, 5 mL %0,1 (w/v) sodyum tripolifosfat (TPP) çözeltisi, kitosan-nitroimidazol çözeltisine kontrollü bir şekilde, damla damla ilave edilmiştir. Karışım, 30 °C sıcaklıkta ve 60 dakika süreyle manyetik karıştırıcı ile sürekli olarak karıştırılmıştır. Böylece, kitosan zincirleri

üzerindeki protonlanmış amin grupları ile TPP'nin anyonik fosfat grupları arasında iyonik etkileşimlerle çapraz bağlar oluşturularak kitosan-nitroimidazol nanopartikül yapıları meydana getirilmiştir. Partikül oluşumu sonrası, süspansiyonun stabilitesini artırmak için prob tipi ultrasonikasyon uygulanmıştır (%40 güç, 45 sn × 2 döngü, buz banyosunda).

Sentezlenen nanopartiküller, 14.000 rpm'de 30 dakika süreyle soğuk santrifüj (4 °C) işlemine tabi tutularak çözelti fazından ayrılmıştır. Takiben, deiyonize su ile birkaç kez yıkama işlemi uygulanarak sistemdeki serbest reaktifler ve olası kontaminantlar uzaklaştırılmıştır. Safılaştırma adımı, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin yüzeyinde kalabilecek artan reaktif maddelerin uzaklaştırılması ve sistemin biyouyumluluğunu koruyacak şekilde toksisiteyi azaltmak amacıyla uygulanmıştır.

Safılaştırılan nanopartiküller, -80°C'de ön dondurma işlemini takiben liyofilizatöre yerleştirilerek liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuştur. Bu işlem, partiküllerin uzun süreli stabilitesini korumak ve sonraki karakterizasyon analizlerinde yapısal bozulmaları önlemek amacıyla tercih edilmiştir. Kurutulmuş nanopartiküller, ileri analizler ve formülasyon çalışmaları için ışık ve nemden korunacak şekilde saklanmıştır.

Fizikokimyasal karakterizasyon kapsamında, nanopartiküllerin hidrodinamik çapı, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli, dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen karakterizasyon verileri, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı, yüzey yükü ve kolloidal stabilitesi hakkında ayrıntılı bilgi sunmuştur.

2.2.1.3. Paklitaksel yüklü kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin iyonik jelasyon tekniği ile hazırlanması

Kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllere paklitaksel yükleme işlemi, Kısım 2.2.1.2'de detaylandırılmış olan iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem kapsamında, paklitaksel çözeltisi, nanopartikül oluşumunda çapraz bağlayıcı ajan olarak görev yapan TPP çözeltisinin ilavesinden önce, hazırlanmış olan kitosan-nitroimidazol çözeltisine eklenmiş ve bu şekilde homojen bir ön karışım elde edilmiştir. Formülasyon çalışmalarında kullanılan kitosan ve kitosan-nitroimidazol çözeltisi, Kısım 2.2.1.2'de belirtilen yöntem doğrultusunda optimize edilen konsantrasyonda (%0,3; w/v) hazırlanmış olup, bu konsantrasyon paklitaksel yükleme çalışmalarında olarak kullanılmıştır.

Ayrı olarak, paklitakselin çözünürlüğü sınırlı olduğu için, farklı konsantrasyonlarda (1 mg/mL, 2 mg/mL ve 3 mg/mL) etanol çözeltisi içerisinde çözündürülerek ilaç çözeltisi hazırlanmıştır. Belirlenen paklitaksel çözeltisi, kitosan çözeltisi içerisine hacimce 1:2 oranında yavaşça ilave edilerek karışım 800 rpm'de 30 dakika boyunca karıştırılmış ve ön-emülsiyon elde edilmiştir.

İlaç ve polimer çözeltisinin tam bir homojenlik sağlayacak şekilde karıştırılmasının ardından, ilaç yüklü nanopartiküllerin sentezine Kısım 2.2.1.2’de ayrıntılı olarak açıklanan protokol izlenerek devam edilmiştir. Partikül oluşumu sonrası, süspansiyonun stabilitesini artırmak için prob tipi ultrasonikasyon uygulanmıştır (%40 güç, 45 sn × 2 döngü, buz banyosunda). Daha sonra partiküller, 14.000 rpm’de, 30 dakika süreyle, 4°C’de santrifüjlenmiş, üst faz uzaklaştırılmış ve çökelti üç kez saf su ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiştir.

Son adımda, nanopartiküllerin uzun süreli stabilitesini sağlamak amacıyla süspansiyon içerisine %5 (w/v) mannitol eklenmiş ve karışım -80°C’de 24 saat dondurulduktan sonra, -55°C’de ve 0.05 mbar basınç altında 48 saat boyunca liyofilize edilerek kuru toz nanopartiküller elde edilmiştir.

2.2.2. Karakterizasyon analizleri

Bu çalışmada, kitosan bazlı nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, gelişmiş karakterizasyon teknikleri kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu analizler, nanopartiküllerin partikül boyutu, yüzey yükü, morfolojisi ve modifikasyonların etkinliğini belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri

Nanopartiküllerin boyut dağılımı ve yüzey yükü, dinamik ışık saçılımı (DLS) analiz cihazı (Malvern Zetasizer Nano ZS, Birleşik Krallık) ile belirlenmiştir. Nanopartikül süspansiyonu, analiz öncesinde deiyonize su ile seyreltilmiş ve ultrasonikasyon cihazı (Bandelin Sonopuls HD 3200, Almanya) ile homojenize edilmiştir. Cihazda, partikül boyut dağılımı nanometre ölçeğinde belirlenmiş ve her bir ölçüm üç kez tekrarlanarak ortalama değer hesaplanmıştır. Yüzey yükü analizi (zeta potansiyel ölçümü) de aynı cihaz ile gerçekleştirilmiş ve yüzeydeki pozitif veya negatif yüklerin elektrokimyasal etkisi incelenmiştir. Zeta potansiyel sonuçları, nanopartiküllerin stabilitesini ve elektrostatik etkileşimlerini ortaya koymuştur.

2.2.2.2. Yüzey morfolojisi (SEM/TEM) analizi

Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak analiz edilmiştir. SEM analizi için nanopartikül süspansiyonları, temiz ve iletken kaplama yapılmış alüminyum örnek taşıyıcılara yerleştirilmiş ve kurutulmuştur. Yüzey morfolojisi, yüksek çözünürlükte görüntülenerek nanopartiküllerin şekli, yüzey düzgünlüğü ve birikim durumu incelenmiştir. TEM analizi ile iç yapının daha detaylı görüntüleri elde edilmiş ve partiküllerin çekirdek-yüzey yapısı gözlemlenmiştir. TEM

numuneleri, karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılarak hazırlık yapılmış ve 80 kV gerilim altında görüntülenmiştir.

2.2.2.3. Yüzey modifikasyonunun doğrulanması

Nanopartiküllerin kimyasal modifikasyonu, FTIR (Fourier Transform Infrared) spektroskopisi (Bruker Tensor II, Almanya) ile doğrulanmıştır. FTIR analizinde, modifikasyona özgü karakteristik pikler gözlemlenmiş ve nitroimidazol gruplarının kitosan zincirine başarıyla bağlandığı doğrulanmıştır. Nanopartiküller, potasyum bromür (KBr) tablet yöntemiyle hazırlanmış ve $4000-500\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında spektrum alınmıştır.

Kristal yapının belirlenmesi için X-ışını kırınım analizi (XRD) (Rigaku MiniFlex, Japonya) gerçekleştirilmiştir. XRD analizinde, nanopartiküllerin amorf veya kristalin yapısı belirlenmiş ve modifikasyon sonrası yapısal değişiklikler incelenmiştir. Bu analizler sonucunda, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin yüzey özellikleri ve kimyasal yapısı hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir.

2.2.2.4. Paklitaksel yükleme kapasitesi ve ilaç enkapsülasyon etkinliğinin tayini

Paklitakselin kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerine yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği, dolaylı (indirekt) yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Yükleme işlemi sonrasında elde edilen nanopartikül süspansiyonu, 14.000 rpm'de 30 dakika boyunca 4°C 'de santrifüjlenerek çöktürülmüş ve üst fazda kalan serbest paklitaksel miktarı, süpernatanttan alınan örneklerde analiz edilmiştir. Serbest paklitakselin kantitatif tayini, ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi (UV-Vis, Shimadzu UV-1800, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler kapsamında, öncelikle paklitakselin kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla $0,5-100\text{ }\mu\text{g/mL}$ aralığında standart çözeltiler hazırlanmış ve $\lambda = 227\text{ nm}$ dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek doğrusal regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak süpernatanttaki serbest ilaç miktarı hesaplanmış ve bu değerden yola çıkarak yükleme kapasitesi (%YK) ile enkapsülasyon etkinliği (%EE) hesaplanmıştır.

Yükleme kapasitesi, başlangıçtaki toplam paklitaksel miktarına kıyasla nanopartiküller içine yüklenen paklitaksel miktarı göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon verimi ise, nanopartiküller içine kapsüle edilen paklitaksel miktarının, başlangıçtaki paklitaksel miktarına oranlanması ile belirlenmiştir. %YK ve %EE aşağıdaki formüller doğrultusunda hesaplanmıştır:

$$\text{Yükleme Kapasitesi (\%YK)} = (\text{Yüklenen ilaç miktarı} / \text{Nanopartikül miktarı}) \times 100$$

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%EE)} = [(\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}) / \text{Toplam ilaç miktarı}] \times 100$$

2.2.3. *In vitro* salım deneyleri

Bu tez çalışması kapsamında, kitosan bazlı nanopartiküller aracılığıyla taşınan paklitakselin kontrollü salım özellikleri, farklı çevresel koşullar altında sistematik olarak incelenmiştir. İlaç salım deneyleri, hem fizyolojik hem de tümör mikroçevresini taklit eden farklı pH koşulları (pH 7,4, 6,5 ve 5,5) altında gerçekleştirilmiş ve sistemin pH-duyarlılığı değerlendirilmiştir. Bu pH değerleri sırasıyla; sağlıklı dokulara karşılık gelen nötr ortam (pH 7.4), tümör çevresi için tipik olarak gözlemlenen hafif asidik ortam (pH 6,5) ve lizozomal/endozomal mikrositoplazmik ortamı temsil eden daha asidik koşullar (pH 5,5) olarak seçilmiştir.

Bununla birlikte, tümör dokularının karakteristik özelliklerinden biri olan hipoksik mikroçevre de deneysel olarak simüle edilmiştir. Hipoksik koşulların oluşturulmasında, hücrel oksijen seviyesini düşüren ve hipoksiye yanıt genlerini aktive eden kobalt (II) klorür (CoCl_2) kullanılmıştır. CoCl_2 , hücre içi HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha) stabilizasyonunu sağlayarak *in vitro* ortamda hipoksi benzeri bir stres durumu yaratmaktadır. Bu bağlamda, hipoksik koşullar altında nanopartikül bazlı ilaç salım kinetiği değerlendirilmiş ve pH ile oksijen düzeyine duyarlı salım davranışları gözlemlenmiştir.

2.2.3.1. Farklı pH ortamlarında ilaç salımı

Salım testleri, tümör mikroçevresini ve fizyolojik ortamı temsil eden üç farklı pH değerinde hazırlanmış fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltileri (pH 5,5; 6,5 ve 7.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül süspansiyonları, her bir pH ortamında belirli bir ilaç konsantrasyonuna eşdeğer olacak şekilde hazırlanmış ve $37 \pm 0,5$ °C sıcaklıkta, 100 rpm hızda çalışan orbital çalkalayıcı eşliğinde inkübasyona alınmıştır. Salım ortamından belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 24, 48 ve 72 saat) alınan süpernatant örnekleri, santrifüjasyon (14.000 rpm, 30 dakika, 4 °C) ile partiküllerden ayrılmış ve ardından paklitakselin salım kinetiğini belirlemek üzere UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak $\lambda = 227$ nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Her bir pH koşulu altında gerçekleştirilen bu analizler ile salım profilleri zamana bağlı olarak kantitatif şekilde izlenmiş, paklitakselin ortam pH'sına bağlı olarak farklı salım davranışları sergilediği ortaya konmuştur.

Analizlerde, salım ortamındaki ilaç konsantrasyonunun doyumluk sınırının altında kalmasını sağlamak amacıyla sink koşullar sağlanmıştır. Bu bağlamda, alınan her örnek sonrası ortam

eşdeğer hacimde taze tampon çözelti ile tamamlanmış, böylece ilacın çözünürlük limiti aşılmaksızın doğru kinetik değerlendirme mümkün kılınmıştır. Ölçümler, farklı pH ortamlarında ilacın salım hızlarını ve toplam salım profillerini belirlemek amacıyla değerlendirilmiştir.

2.2.3.2. Hipoksik koşullarda ilaç salımı

Bu çalışmada, geliştirilen paklitaksel yüklü kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin hipoksiye duyarlı ilaç salım potansiyeli, *in vitro* ortamda kobalt klorür (CoCl₂) kullanılarak simüle edilen koşullarda değerlendirilmiştir. Hipoksik ortamın taklidi amacıyla, nanopartikül süspansiyonları, 100 µM CoCl₂ içeren fosfat tamponlu salin çözeltisinde hazırlanmış ve bu süspansiyonlar 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta, 100 rpm hızla çalışan orbital çalkalayıcı altında inkübasyona bırakılmıştır.

Belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 24, 48 ve 72 saat) süspansiyonlardan alınan örnekler, 10.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüjlenerak nanopartiküllerden ayrıştırılmış; elde edilen süpernatant örneklerinde serbest paklitaksel miktarı UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak λ= 227 nm dalga boyunda kantitatif olarak belirlenmiştir. Ölçümler sırasında, sink koşullarının korunmasına dikkat edilmiştir; bu doğrultuda her örnekleme sonrası sistem, eşdeğer hacimde taze tampon çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Karşılaştırmalı değerlendirme amacıyla oluşturulan kontrol grubu, aynı nanopartikül süspansiyonlarının hipoksik ajan içermeyen, yani normoksik koşulları (%21 O₂) temsil eden PBS çözeltisinde inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Böylece, nanopartiküllerin ilaç salım davranışında hipoksi koşullarının etkisi doğrudan analiz edilmiştir.

2.2.4. Sitotoksikite analizi

Bu çalışmada, geliştirilen kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin biyoyoumluluk profili, *in vitro* koşullarda L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. L929 hücreleri, biyomalzeme toksisitesinin belirlenmesinde yaygın olarak tercih edilen standart bir hücre modeli olup, sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerin belirlenmesi açısından güvenilir sonuçlar sunmaktadır.

L929 hücreleri, %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin karışımı) içeren DMEM ortamında 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Hücreler, logaritmik faza ulaştıklarında 96 kuyucuklu mikropatlara ekilmiştir. Her bir kuyucuğa *in vitro* çalışmalarda kullanılan serbest paklitaksel miktarlarına eşdeğer miktarda etken madde içerecek şekilde hazırlanmış kitosan-nitroimidazol nanopartikül süspansiyonları uygulanmıştır.

Sitotoksikite analizi, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile gerçekleştirilmiştir. Deney süresince kullanılan MTT reaktifi ile hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ölçülmüş ve canlı hücre oranı belirlenmiştir. Hücreler, nanopartikül uygulamasından sonra 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, her bir kuyucuğa MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit ile çözülmüştür. Absorbans değerleri, mikroparka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Boş kitosan nanopartiküllerinin ve paklitaksel yüklü nanopartiküllerin sitotoksik etkisi, kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2.2.5. *İn vitro* çalışmalar

Tez çalışmasının bu aşamasında MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattına normoksik ve hipoksik koşullarda boş kitosan, boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, serbest paklitaksel, paklitaksel yüklü kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküller uygulanmıştır. Uygulamalar sonunda deney gruplarının MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattındaki canlılık düzeyleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.1. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının normoksik koşullarda boş kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküller ile muamelesi

Boş kitosan bazlı nanopartiküllerinin normoksik koşullarda hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi, MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler, %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Logaritmik faza ulaştıklarında hücreler 96 kuyucuklu mikroparkalara ekilmiştir. Hücreler logaritmik büyüme fazına ulaştıklarında, 96 kuyucuklu mikroparkalara ekilmiştir. %70 konfluens seviyesine ulaştıktan sonra, bir gece boyunca serumuz ortamda inkübasyona bırakılmışlardır.

Nanopartiküller, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 ve 5 µg/mL paklitaksel içerek miktarda hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla, kitosan bazlı nanopartiküllerin 2,5 mg/mL'lik stok konsantrasyonu hazırlanmış ve yükleme kapasiteleri dikkate alınarak 0,01-5 µg/mL paklitaksel içerecek hacimlerde hücrelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından hücreler 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulanarak hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit ile çözülmüştür. Absorbans ölçümleri, mikroparka okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılmış ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin dispersiyonu için

kullanılan sürfaktan içeren 2 kez saflaştırılmış suyun MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki toksik etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.2. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının normoksik koşullarda serbest paklitaksel ile muamelesi

Serbest paklitakselin normoksik koşullarda MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS, Gibco, ABD) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin, Gibco, ABD) içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Hücreler, logaritmik faza ulaştıklarında 96 kuyucuklu mikrolakalara ekilmiştir. Hücreler logaritmik büyüme fazına ulaştıklarında, 96 kuyucuklu mikrolakalara ekilmiştir. %70 konfluens seviyesine ulaştıktan sonra, bir gece boyunca serumsuz ortamda inkübasyona bırakılmışlardır

Hücrelere uygulanan paklitaksel konsantrasyonları, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 ve 5 µg/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Serbest paklitaksel, %50 (v/v) etanol içeren bir çözücü sisteminde 10 mM stok konsantrasyonunda çözündürülerek hazırlanmıştır. Ayrıca, etanolün olası sitotoksik etkilerini kontrol edebilmek amacıyla, deney gruplarına ek olarak, aynı oranda (%0.1, v/v) etanol içeren taşıyıcı kontrol (vehicle control) grubu oluşturulmuştur. Böylece paklitakselin hücreler üzerindeki etkisi, taşıyıcı çözücünün olası etkilerinden ayırt edilebilmiştir.

Paklitaksel uygulanmasının ardından hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücre canlılık oranları, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmüştür. Mikrolaka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve serbest paklitakselin hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.3. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının normoksik koşullarda paklitaksel yüklü kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri ile muamelesi

Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin MCF-7 normoksik koşullarda insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS, Gibco, ABD) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin, Gibco, ABD) içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Hücreler, logaritmik faza ulaştıklarında 96 kuyucuklu mikrolakalara ekilmiş

ve her bir kuyucuğa belirli konsantrasyonlarda paklitaksel yüklü nanopartikül süspansiyonu uygulanmıştır.

Paklitaksel yüklü nanopartiküller, iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanarak saflaştırılmış ve Nanopartiküller, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 ve 5 µg/mL paklitaksel içerek miktarda hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin 2,5 mg/mL'lik stok konsantrasyonu hazırlanmış ve yükleme kapasitesi dikkate alınarak 0,01-5 µg/mL paklitaksele eşdeğer nanopartikül içerecek hacimlerde hücrelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından hücreler, 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulanarak hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmüştür. Absorbans ölçümleri, mikropilaka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılmış ve nanopartiküller içinde kapsüle edilen paklitakselin normoksik koşullarda hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.4. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının hipoksik koşullarda boş kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküller ile muamelesi

Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin hipoksik koşullarda hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi, MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler, %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Logaritmik faza ulaştıklarında hücreler 96 kuyucuklu mikropilakalara ekilmiş ve her bir kuyucuğa belirli konsantrasyonlarda boş kitosan-nitroimidazol nanopartikül süspansiyonu uygulanmıştır. Nanopartiküller, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 ve 5 µg/mL paklitaksel içerek miktarda hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin 2,5 mg/mL'lik stok konsantrasyonu hazırlanmış ve yükleme kapasitesi dikkate alınarak 0,01-5 µg/mL paklitaksele eşdeğer nanopartikül içerecek hacimlerde hücrelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından hücreler 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulanarak hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit ile çözülmüştür. Absorbans ölçümleri, mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılmış ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin dispersiyonu için kullanılan sürfaktan içeren 2 kez saflaştırılmış suyun MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki toksik etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.5. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının hipoksik koşullarda serbest paklitaksel ile muamelesi

Serbest paklitakselin hipoksik koşullarda MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS, Gibco, ABD) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin, Gibco, ABD) içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Hücreler, logaritmik faza ulaştıklarında 96 kuyucuklu mikropalakalara ekilmiş ve her bir kuyucuğa belirli konsantrasyonlarda serbest paklitaksel çözeltisi uygulanmıştır.

Hücrelere uygulanan paklitaksel konsantrasyonları, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 ve 5 µg/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Serbest paklitaksel, %50 (v/v) etanol içeren bir çözücü sisteminde 10 mM stok konsantrasyonunda çözündürülerek hazırlanmıştır. Ayrıca, etanolün olası sitotoksik etkilerini kontrol edebilmek amacıyla, deney gruplarına ek olarak, aynı oranda (%0.1, v/v) etanol içeren taşıyıcı kontrol (vehicle control) grubu oluşturulmuştur. Böylece paklitakselin hücreler üzerindeki etkisi, taşıyıcı çözücünün olası etkilerinden ayırt edilebilmiştir.

Paklitaksel uygulanmasının ardından hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücre canlılık oranları, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmüştür. Mikropalaka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve serbest paklitakselin hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Paklitaksel uygulamasının ardından hücreler 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından hücre canlılık oranları, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmüştür. Mikropalaka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve serbest paklitakselin hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.5.6. MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattının hipoksik koşullarda paklitaksel yüklü kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri ile muamelesi

Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin MCF-7 hipoksik koşullarda insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. MCF-7

hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS, Gibco, ABD) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin, Gibco, ABD) içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde kültürlenmiştir. Hücreler, logaritmik faza ulaştıklarında 96 kuyucuklu mikrolakalara ekilmiş ve her bir kuyucuğa belirli konsantrasyonlarda paklitaksel yüklü nanopartikül süspansiyonu uygulanmıştır.

Paklitaksel yüklü nanopartiküller, iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanarak saflaştırılmış ve deiyonize su içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Hücrelere uygulanan nanopartikül konsantrasyonları, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Uygulamanın ardından hücreler, 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulanarak hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmüştür. Absorbans ölçümleri, mikrolaka okuyucu (BioTek ELx808, ABD) kullanılarak 570 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen veriler, kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılmış ve nanopartiküller içinde kapsüle edilen paklitakselin normoksik koşullarda hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2.6. İstatiksel analiz

Bu çalışmada elde edilen veriler, istatistiksel analizler kullanılarak değerlendirilmektedir. Tüm deneyler, her bir grupta en az üç bağımsız tekrarla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin analizinde GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Veriler, ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve anlamlı farklılık gösteren grupların karşılaştırılmasında Tukey post-hoc testi kullanılmıştır. İki grup arasındaki karşılaştırmalar, bağımsız örneklem t-testi ile değerlendirilmiştir.

Hipotez testlerinde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar, hücre canlılığı, toksisite ve kontrollü ilaç salımı üzerinde nanopartikül formülasyonlarının etkilerini değerlendirmek amacıyla yorumlanmıştır. Elde edilen istatistiksel sonuçlar, nanopartiküllerin normoksik ve hipoksik koşullardaki etkinliklerini karşılaştırmalı olarak ortaya koymuştur.

3. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Nitroimidazol modifikasyonunun FTIR analizi ile doğrulanması

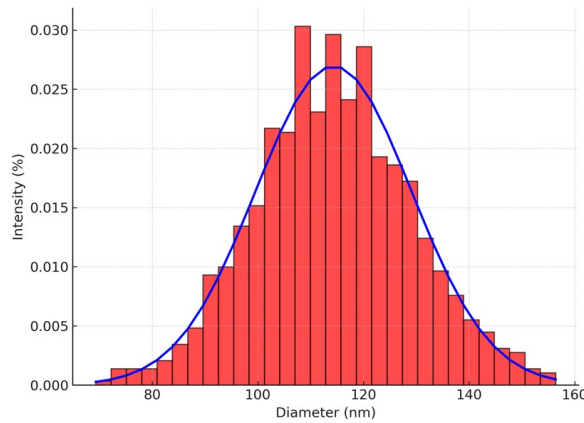
Kitosanın biyouyumlu ve reaktif yapısı sayesinde nitroimidazol grupları, başarılı bir şekilde kovalent bağlarla kitosan zincirine bağlanmıştır. Modifikasyon işleminin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen FTIR (Fourier Transform Infrared) spektroskopisi analizleri, reaksiyon sürecinin etkinliğini gösterecek önemli veriler sağlamıştır. FTIR spektrumlarında nitroimidazolün karakteristik fonksiyonel gruplarını temsil eden belirgin piklerin, kitosan spektrumuna eklenmesi, modifikasyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Özellikle $1300-1700\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında gözlemlenen C-N ve C=O gerilme titreşimlerine ait belirgin pikler, nitroimidazolün kitosan matriksine başarılı bir şekilde bağlandığını doğrulamaktadır (Şekil 3.1). Ayrıca, kitosanın karakteristik amino ve hidroksil gruplarına ait piklerdeki değişimler, kimyasal modifikasyonun moleküler düzeyde gerçekleştiğini ve kitosan yapısının bu modifikasyona uygun olduğunu desteklemektedir.

Santrifüj ve saflaştırma aşamalarının ardından modifiye edilen kitosan-nitroimidazol kompleksi, homojen bir süspansiyon halinde stabilize edilmiş ve kimyasal saflığının korunması sağlanmıştır. Saflaştırma süreci sırasında santrifüj hızının (10.000 rpm) ve düşük sıcaklık koşullarının (4°C) etkili bir şekilde kullanılması, nanopartiküllerin yapısal bütünlüğünü koruyarak nitroimidazol gruplarının kitosan yüzeyinde optimum düzeyde tutulmasını sağlamıştır. Bu koşullar, modifikasyon sonrası kitosan-nitroimidazol sisteminin biyoaktif stabilitesini artırmış ve gelecekteki ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin bir hipoksiye duyarlı taşıma mekanizması sunabileceğini göstermiştir.

Bu süreçte, reaksiyonun kimyasal etkinliğini belirleyen ana faktörlerden biri, EDC/NHS çiftinin katalitik rolü olmuştur. EDC, karbodiimid temelli bir çapraz bağlayıcı olarak, kitosan polimerindeki serbest amin grupları ile nitroimidazolün karboksil grupları arasında amido bağlarının oluşumunu sağlamıştır. NHS'nin varlığı ise ara ürünü stabilize ederek bağlanma verimliliğini artırmıştır. Yapılan kimyasal analizler, reaksiyon ortamındaki pH ve sıcaklık gibi parametrelerin modifikasyon verimliliği üzerindeki belirleyici rolünü ortaya koymuştur. Modifikasyon veriminin maksimum düzeye ulaştığı pH 5,5 koşulları, kitosanın protonlanmış amin gruplarının reaktivitesini artırmış ve nitroimidazol ile daha etkili bağlanmalarını sağlamıştır. Benzer şekilde, 25°C 'de gerçekleştirilen reaksiyonun, moleküler difüzyon ve etkileşim hızlarını optimize ederek kovalent bağ oluşumunu hızlandırdığı gözlemlenmiştir. FTIR analiz sonuçları, modifikasyonun yalnızca kimyasal bağlanma düzeyinde değil, aynı zamanda kitosanın yüzey özelliklerini değiştirerek fonksiyonel bir dönüşüm sağladığını da göstermiştir.

3.2. Boş kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin hazırlanması

Boş kitosan- ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlenmesi, başarılı ve kontrollü bir nanopartikül oluşum süreci sağladığını ortaya koymuştur (Şekil 3.1). İyonik jelasyon yöntemi, kitosan amino grupları ile TPP'nin fosfat grupları arasındaki elektrostatik dayalı çapraz bağlanmalarla nanopartikül oluşumuna yol açan ve ilaç taşıma sistemleri için yaygın şekilde kullanılan bir tekniktir (Koukaras ve ark., 2012). Kitosanın doğal biyouyumluluğu ve aktif fonksiyonel grupları sayesinde, sodyum tripolifosfat (TPP) gibi bir çapraz bağlayıcı ile elektrostatik etkileşimlere dayalı bu teknik, yüksek saflıkta ve stabil nanopartiküllerin sentezlenmesini mümkün kılmıştır. Yüksek verimlilik ve reproduktiflik ile karakterize edilen bu süreç, nanopartikül boyutlarının kontrol edilebilir olması ve zeta potansiyeli gibi yüzey özelliklerinin optimize edilmesi açısından önemli avantajlar sunmuştur. Kitosan-nitroimidazol çözeltisinin homojen bir şekilde hazırlanması, nanopartiküllerin oluşumunda kilit bir adım olmuştur. Asetik asit içinde çözündürülerek hazırlanan kitosan nitroimidazol çözeltisi, homojenizasyon süreci boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla dengeli bir şekilde çözünmüş ve çözelti içindeki moleküllerin dağılımının eşit olduğu tespit edilmiştir. Çözelti içindeki konsantrasyon aralığının (%0.3-0.5 w/v) seçimi, partikül boyutu ve yüzey yükü gibi parametreler üzerinde belirleyici bir faktör olmuştur. Kitosan-nitroimidazol çözeltisinin %0,3 (w/v) konsantrasyonu kullanıldığında ortalama partikül boyutu $115,0 \pm 9,1$ nm olarak ölçülmüştür. %0,4 (w/v) konsantrasyonunda bu değer $150,5 \pm 12,4$ nm'ye çıkarken, %0,5 (w/v) konsantrasyonunda partikül boyutu $210,0 \pm 11,7$ nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 1. Kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu histogramı

Kitosan-nitroimidazol polimerinin konsantrasyonundaki artışın, nanopartikül sistemlerinde partikül boyutu üzerinde belirgin bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Artan polimer derişimi,

sistemdeki viskoziteyi yükselterek nanopartiküllerin oluşumu sırasında daha büyük ve yoğun polimerik agregatların meydana gelmesine neden olmuştur. Bu durum, partiküller arasındaki elektrostatik ve sterik etkileşimlerin artmasına yol açmış ve sonuç olarak aglomerasyon eğilimini artırmıştır. Böylelikle partikül boyutlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Literatürde de belirtildiği üzere, yüksek polimer konsantrasyonu, özellikle iyonik jelasyon gibi yöntemlerde, partikül oluşum mekanizmalarını etkileyerek daha heterojen ve büyük boyutlu yapıların oluşmasına neden olabilir (Almalik et al., 2013; Huang et al., 2017). Bu bağlamda, optimum partikül boyutunun elde edilmesi için polimer konsantrasyonunun dikkatle kontrol edilmesi büyük önem arz etmektedir.

Tablo 3.1. Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri

Kitosan-nitroimidazol Konsantrasyonu (% w/v)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
0.3	115,0 ± 9,1	0,15 ± 0,01	+20.3 ± 12,4
0.4	150,5 ± 12,4	0,22 ± 0,02	-+30,5 ± 2,7-
0.5	210,0 ± 11,4	0,35 ± 0,01	-+35,9 ± 3,1

Çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan sodyum tripolifosfat (TPP) çözeltisinin, kitosan çözeltisine damla damla eklenmesi, kontrollü ve yavaş bir reaksiyon mekanizmasını tetiklemiştir. Bu süreçte, kitosan zincirleri üzerindeki pozitif yüklü amino grupları ile TPP'nin negatif yüklü fosfat grupları arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimler, partikül çekirdeğinin oluşmasını sağlamıştır. Elektrokimyasal bağlanma ile başlayan bu süreç, daha sonra çapraz bağların güçlenmesi ile stabil nanopartiküllerin oluşumuna yol açmıştır. TPP çözeltisinin kontrollü bir şekilde eklenmesi, nanopartikül büyüklüğü ve dağılımını doğrudan etkilemiş ve homojen bir partikül oluşumuna katkıda bulunmuştur. İyonik jelasyon sırasında ortam sıcaklığının 30°C'de tutulması, kitosan ve TPP arasındaki etkileşimlerin kinetik hızını düzenlemiş ve kontrollü partikül oluşumunu desteklemiştir. Düşük sıcaklık koşulları, daha yavaş ve kontrollü bir çapraz bağlanma sağlayarak partiküllerin aşırı büyümesini ve aglomerasyonunu engellemiştir. Ayrıca, ortam sıcaklığının belirli bir seviyede tutulması, kitosan zincirlerinin moleküler hareketliliğini artırmış ve TPP'nin kitosan üzerindeki amino gruplarına daha verimli bir şekilde bağlanmasını sağlamıştır. Bu sıcaklık kontrolü, partikül boyutu ve yüzey morfolojisi üzerinde belirleyici bir rol oynamış ve sentezlenen nanopartiküllerin homojen bir yapıya sahip olmasını mümkün kılmıştır. Santrifüj işlemi, nanopartiküllerin çözelti fazından ayrılarak saflaştırılmasını sağlamıştır. Santrifüj koşullarının (10.000 rpm, 20 dakika, 4°C) dikkatlice optimize edilmesi, partiküllerin yapısal bütünlüğünü

korumuş ve yüksek saflıkta ürün elde edilmesini sağlamıştır. Yüksek hızda santrifüj, çözelti içindeki serbest reaktiflerin ve yan ürünlerin uzaklaştırılmasına katkıda bulunmuş, bu da nanopartiküllerin kimyasal saflığını artırmıştır. Deiyonize su ile gerçekleştirilen yıkama işlemi, partiküller üzerindeki artık kimyasal maddelerin uzaklaştırılmasını ve yüzeyde safsızlık kalmamasını sağlamıştır. Bu adım, biyouyumlu ve toksik olmayan nanopartiküller elde edilmesi açısından kritik öneme sahip olmuştur.

Elde edilen sonuçlar, her bir kitosan konsantrasyonu için polidispersite indeksinin (PDI) de farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. %0,3 (w/v) konsantrasyonunda PDI değeri $0,15 \pm 0,01$ olarak ölçülmüş ve bu değer dar bir partikül dağılımını temsil ettiği belirlenmiştir. %0,2 (w/v) konsantrasyonunda bu değer $0,22 \pm 0,02$ 'ye yükselmiş ve partikül dağılımında bir miktar genişleme gözlemlenmiştir. %0,3 (w/v) konsantrasyonunda ise PDI değeri $0,35 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiş ve bu durum, yüksek konsantrasyonların partiküller arası aglomerasyonu artırarak daha geniş bir boyut dağılımına neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, özellikle kontrollü ilaç salımı uygulamalarında daha düşük konsantrasyonların daha homojen nanopartiküller elde etmek için tercih edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Zeta potansiyel, kolloidal sistemlerde partiküllerin yüzey yükünü ve buna bağlı olarak elektrostatik stabilitelerini değerlendirmek için kritik bir parametredir. Zeta potansiyel değeri yüksek olan partiküller, çözelti içerisinde daha uzun süre stabil kalabilirken, düşük zeta potansiyel değerleri partikül agregasyon riskini artırmaktadır (Honary & Zahir, 2013). Bu tez çalışmasında, sabit bir TPP konsantrasyonu kullanılarak farklı oranlarda kitosan-nitroimidazol çözeltisi ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri incelenmiştir. Elde edilen veriler, kitosan miktarındaki artışa paralel olarak zeta potansiyelinde anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 3.1). Bu artış, polimerin çözeltideki yoğunluğunun artmasıyla birlikte sistemde daha fazla sayıda protonlanabilir serbest amin grubunun bulunması ve bu grupların partikül yüzeyinde yoğunlaşması sonucu, elektrostatik yüzey yükünün artmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir ifadeyle, sabit miktarda çapraz bağlayıcı (TPP) varlığında kitosan miktarının artırılması, kitosan:TPP oranını yükseltmekte ve bu yükseliş daha fazla pozitif yük taşıyan amin grubunun yüzeyde bulunmasına olanak tanımaktadır. Bu durum partiküllerin elektrostatik itici kuvvetlerini artırarak, kolloidal stabiliteyi desteklemektedir.

Bununla birlikte, zeta potansiyelindeki bu artışın yalnızca kitosan:TPP oranındaki yükselmeye bağlı olmadığı, kitosan yapısına kovalent olarak bağlanmış olan nitroimidazol gruplarının da bu yüzey yükü artışında etkili olabileceği düşünülmektedir. Kitosan, fizyolojik pH koşullarında protonlanabilen serbest amin grupları sayesinde pozitif yük taşımaktadır. Nitroimidazol gruplarının kitosan zincirine kovalent bağlanması, polimerin elektriksel özelliklerini değiştirebilmekte ve yük dağılımını yeniden düzenleyebilmektedir. Bu modifikasyonun, yük dağılımını stabilize edici bir rol oynayarak zeta potansiyelin daha tutarlı ve yüksek düzeyde seyretmesini sağladığı düşünülmektedir. Nitekim, literatürde benzer şekilde türevlendirilmiş

kitosan yapılarında pozitif yük yoğunluğunun arttığı ve hücre etkileşimlerinin bu sayede iyileştirildiği belirtilmektedir (Zhao et al., 2020; Wang et al., 2021).

Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, kitosan-nitroimidazol nanopartikül sisteminin fizikokimyasal özellikleri açısından en uygun parametrelerin %0,31 (w/v) kitosan-nitroimidazol konsantrasyonunda sağlandığı belirlenmiştir. Bu nedenle, takip eden deneysel çalışmalarda bu konsantrasyon, optimize edilmiş koşul olarak tercih edilmiştir.

3.3. Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin iyonik jelasyon tekniği ile hazırlanması

Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin iyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenmesi, kontrollü ilaç taşıma ve salım mekanizmalarına uygun, homojen partiküller elde edilmesini sağlamıştır. Kitosanın nitroimidazol ile modifiye edilmesi sonucu oluşan yüzey özellikleri, nanopartiküllerin yüksek stabiliteye ve biyouyumluluğa sahip olmasını sağlamıştır. Sentez işlemi sırasında paklitaksel içeren etanol çözeltisinin kitosan-nitroimidazol çözeltisi ile homojen bir şekilde karıştırılması, ilacın partikül matriksine homojen olarak dağılmasını mümkün kılmıştır. Bu aşamanın ardından TPP çözeltisinin karışıma damla damla eklenmesi, kitosan ve TPP arasındaki elektrostatik etkileşimler sayesinde çapraz bağlanmayı tetikleyerek nanopartikül oluşumunu sağlamıştır. Bu işlemin sıcaklık ve süre gibi parametrelerle optimize edilmesi, partikül büyüklüğü ve dağılımının kontrolünü mümkün kılmıştır. Dinamik ışık saçılımı (DLS) analizleri, farklı paklitaksel konsantrasyonlarında elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksini (PDI) ortaya koymuştur. %0,3 (w/v) konsantrasyonda kitosan-nitroimidazol çözeltisi ile hazırlanan ve düşük paklitaksel konsantrasyonu (0,5 mg/mL) içeren nanopartiküllerde ortalama partikül boyutu $120,7 \pm 8,2$ nm olarak belirlenmiştir. Bu partiküller, düşük PDI değeri ($0,18 \pm 0,02$) ile oldukça dar bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Düşük paklitaksel konsantrasyonunda ilacın nanopartikül yüzeyine homojen dağılması ve moleküler düzeyde kitosan matriksine etkili bir şekilde entegre olması, partiküllerin düzenli ve kontrollü bir yapıda oluşmasını sağlamıştır. Paklitaksel konsantrasyonu 1 mg/mL'ye çıkarıldığında, partikül boyutu $145,1 \pm 8,3$ nm olarak ölçülmüş ve PDI değeri $0,22 \pm 0,03$ seviyesine yükselmiştir. Bu sonuçlar, paklitaksel konsantrasyonu arttıkça ilacın nanopartikül yapısı üzerindeki etkisinin arttığını ve boyut dağılımının genişlediğini göstermektedir. Bu genişleme, kitosan matriksine entegre edilen paklitaksel moleküllerinin kitosan ve TPP arasındaki etkileşimleri kısmen etkileyerek partikül boyutunda artışa yol açtığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu PDI değeri halen kabul edilebilir bir homojenlik düzeyine işaret etmektedir ve kontrollü salım uygulamaları için uygundur. Yüksek paklitaksel konsantrasyonu (2,0 mg/mL) kullanıldığında ise ortalama partikül boyutu $190,7 \pm 12,2$ nm olarak tespit edilmiş ve PDI değeri $0,25 \pm 0,04$ seviyesine çıkmıştır. Bu durumda gözlemlenen artış, yüksek ilaç konsantrasyonlarının nanopartiküller arasındaki aglomerasyon eğilimini artırarak daha büyük ve heterojen yapıda partiküllerin

oluşmasına neden olduğunu göstermektedir. Yüksek konsantrasyonların oluşturduğu bu etki, kitosan ve TPP arasındaki çapraz bağlanma süreçlerinin kısmen düzensiz hale gelmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak bu durum, nanopartiküllerin optimum ilaç salım kapasitesi ve hedefleme etkinliği üzerinde farklı etkiler yaratabileceği için dikkatlice optimize edilmelidir.

Tablo 3.2. Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri

Paklitaksel Konsantrasyonu (mg/mL)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
1	120,7 ± 8,2	0,15 ± 0,01	+32,3 ± 16,4
2	145,1 ± 8,3	0,22 ± 0,03	+28,3 ± 12,7
3	190,7 ± 12,2	0,25 ± 0,04	-+27,9 ± 13,1

Geliştirilen kitosan-nitroimidazol bazlı nanopartikül sisteminin yüzey yükü, farklı paklitaksel konsantrasyonları altında yapılan zeta potansiyel ölçümleri ile analiz edilmiştir. Bu ölçümler, sistemin kolloidal stabilitesi, yüzey yük dağılımı ve ilaç yükleme oranına bağlı değişimlerin anlaşılması açısından önemli bilgiler sunmuştur.

Düşük paklitaksel konsantrasyonlarında ölçülen ortalama +32,3 ± 16,4 mV'luk zeta potansiyel değeri, nanopartikül yüzeyinde kitosan zincirlerinin protonlanmış amino gruplarının ($-NH_3^+$) baskın olduğunu ve sistemin yüksek derecede pozitif yüklü kaldığını göstermektedir. Bu durum, nanopartiküllerin çözelti içerisinde elektrostatik olarak stabil kaldığını ve partiküller arası itici kuvvetlerin agregasyonu engellediğini göstermektedir.

Paklitaksel konsantrasyonu arttıkça, zeta potansiyel değerinde kademeli bir azalma gözlemlenmiş; yüksek konsantrasyonlarda bu değer +28,3 ± 12,7 mV seviyelerine gerilemiştir. Bu düşüş paklitaksel moleküllerinin kitosan-nitroimidazol matriksine artan oranda entegre olması ve yüzeydeki pozitif yüklerin bir kısmını maskeleyerek zeta potansiyel üzerinde nötral bir etki yaratmış olmasından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, ilaç moleküllerinin yüzeyde lokalize olması, elektrostatik yük dengesini hafifçe değiştirmiştir.

Bununla birlikte, elde edilen tüm zeta potansiyel değerlerinin +25 mV'in üzerinde olması, geliştirilen kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin elektrostatik olarak stabil kaldığını göstermektedir. Literatürde, ±30 mV'e yakın zeta potansiyel değerlerinin kolloidal sistemlerin stabilitesini korumada yeterli olduğu bildirilmektedir (Honary & Zahir, 2013). Bu durum, nanopartiküllerin çözelti içinde uzun süre süspansiyon halinde kalabileceğini ve fiziksel kararlılık açısından taşıyıcı sistem olarak uygunluk gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Yapılan zeta potansiyel analizleri, kitosan-nitroimidazol bazlı nanopartikül sisteminin, paklitaksel gibi hidrofobik ilaçların taşınmasında hem yüksek yüzey stabilitesine, hem de uyarlanabilir yüzey özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellikler, sistemin biyoyararlanımı artırma ve hedefli salım uygulamalarında kullanılabilirliğini desteklemektedir.

3.4. Yüzey morfolojisi (SEM/TEM analizi)

Kitosan ve kitosan-nitroimidazol bazlı nanopartiküllerin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, nanopartiküllerin yapısal bütünlüğünü, yüzey pürüzlülüğünü ve morfolojik farklılıklarını açıkça ortaya koymuştur. Boş kitosan nanopartikülleri, kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri ve paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri arasında belirgin yüzey farklılıkları gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar, nanopartikül sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcılar, yüzey modifikasyonları ve paklitaksel yüklemesinin morfolojik özellikler üzerindeki etkisini göstermektedir.

Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin SEM görüntüleri, partiküllerin küresel yapıda ve nispeten düzgün bir yüzey morfolojisine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ortalama partikül boyutları SEM analizi ile yaklaşık 110-130 nm arasında ölçülmüştür ve bu değer, DLS ile elde edilen ortalama partikül boyutu ile uyum göstermiştir. Küresel yapının yanı sıra, yüzeyde minimal pürüzlenme ve düzensizlikler gözlemlenmiştir. Bunun temel nedeni, iyonik jelasyon sırasında kitosan ve sodyum tripolifosfat (TPP) arasındaki elektrostatik etkileşimlerin kontrollü bir şekilde gerçekleşmesi ve homojen bir çapraz bağlanma mekanizması oluşturmasıdır. Yüzey pürüzlülüğünün düşük seviyede olması, boş kitosan nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalarda uzun süreli stabilite sağlayabileceğini ve çevresel faktörlere karşı dayanıklı olabileceğini göstermektedir.

Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin SEM ve TEM analizleri, yüzey morfolojisinde belirgin bir değişiklik olduğunu göstermiştir. Kitosanın nitroimidazol grupları ile modifikasyonu, partiküllerin yüzeyinde daha belirgin bir pürüzlenmeye ve mikroskobik düzeyde yüzey heterojenliğine yol açmıştır. SEM görüntülerinde, partiküllerin yüzeyinin kısmen kaba bir yapıya sahip olduğu ve modifikasyonun partikül yüzeyinde homojen bir kaplama oluşturduğu gözlemlenmiştir. TEM görüntüleri, bu yüzey modifikasyonunun sadece dış yüzeyle sınırlı kalmadığını, aynı zamanda partikül iç yapısına da etki ettiğini ortaya koymuştur. Modifikasyonun nanopartikül çekirdeğine kısmen nüfuz ettiği ve bu durumun çapraz bağlanma yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Bu yapısal değişikliklerin, nitroimidazol gruplarının hipoksik mikroçevrede aktifleşmesini sağlayarak kontrollü ilaç salımı mekanizmasını destekleyeceği düşünülmektedir.

Boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutu, SEM analizleri ile yaklaşık 90-100 nm arasında ölçülmüştür. Bu değer, boş kitosan nanopartiküllerine kıyasla daha büyük bir boyuta sahip olduklarını ve nitroimidazol modifikasyonunun partikül boyutunda belirli bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, PDI değerlerinin düşük olması ve partikül boyut dağılımının dar bir aralıkta bulunması, modifikasyonun kontrollü ve homojen bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Yüzeydeki pürüzlenme, kitosan ve nitroimidazol arasındaki kovalent bağların yoğunluğuna ve bu bağların nanopartikül matriksine etkisine dayanmaktadır.

Paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin SEM ve TEM analizleri, yüzey ve yapısal özelliklerin daha karmaşık bir hale geldiğini ortaya koymuştur. SEM görüntüleri, paklitaksel yüklemesi sonrasında partiküllerin yüzeyinde belirgin bir pürüzlenme ve düzensizlik oluştuğunu göstermiştir. Bu durum, paklitaksel moleküllerinin kitosan matriksine entegre olmasının yüzey morfolojisini etkilediğini ve partiküllerin homojen bir ilaç dağılımına sahip olmadığını göstermektedir. Yüksek paklitaksel konsantrasyonlarında, nanopartikül yüzeyinde kısmi aglomerasyon gözlemlenmiştir. Bu aglomerasyon, nanopartiküller arasındaki etkileşimlerin artmasına ve partiküllerin birbirine yapışmasına yol açmıştır. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda bu aglomerasyonun minimal seviyede olduğu ve nanopartiküllerin pürüzsüz bir yüzey yapısı sergilediği belirlenmiştir.

TEM analizleri, paklitaksel moleküllerinin nanopartikül iç yapısına nasıl entegre olduğunu detaylı bir şekilde ortaya koymuştur. TEM görüntülerinde, partikül çekirdeğinde homojen bir dağılım yerine kısmen yoğunlaşmış ilaç bölgeleri gözlemlenmiştir. Bu yoğunlaşma, yüksek konsantrasyonlarda ilacın kitosan matriksine tam olarak entegre olamamasından kaynaklanmaktadır. Bunun sonucunda, partiküllerin yapısal bütünlüğü ve yüzey özellikleri üzerinde etkili olan bu düzensiz ilaç dağılımı, kontrollü salım mekanizmalarının optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Paklitaksel yüklü nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu SEM analizleri ile yaklaşık 170-200 nm arasında ölçülmüştür. Bu değer, paklitaksel moleküllerinin nanopartikül matriksine yüklenmesi sonucunda partikül boyutunda belirgin bir artış olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, PDI değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olması, partikül boyut dağılımının kontrollü olduğunu ve nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalarda kullanılmaya uygun bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek ilaç konsantrasyonlarında PDI değerlerinde artış gözlemlenmiş ve bu durum, yüksek yükleme kapasitelerinin partikül homojenliğini olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir.

3.5. Paklitaksel yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği

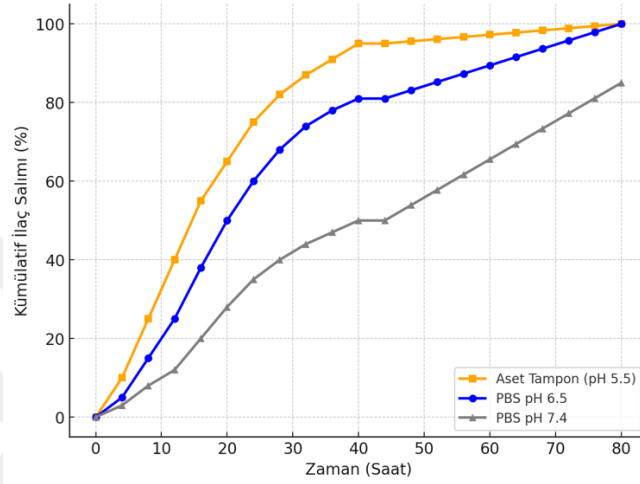
Paklitakselin kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerine yüklenmesi, etkili bir ilaç taşıma sistemi oluşturulması açısından kritik bir adım olarak değerlendirilmiştir. Yükleme

kapasitesi ve ilaç enkapsülasyon veriminin yüksek olması, ilacın nanopartikül sistemine homojen bir şekilde entegre olduğunu ve kontrollü salım mekanizmalarının optimize edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, farklı paklitaksel konsantrasyonlarının yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimi üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde analiz edilmiştir. İlacın kitosan-nitroimidazol matriksine entegre olması ve bu sistemde gösterdiği performans, biyomedikal uygulamalar açısından önemli sonuçlar doğurmuştur. Paklitaksel yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimi, ilaç yükleme süreci sırasında nanopartiküllerin ilacı ne kadar etkin bir şekilde bünyesine aldığı ve bu ilacın ne kadarının matrikse entegre olarak kalabildiğini belirlemektedir. Yükleme kapasitesi, nanopartiküllerde bulunan paklitaksel miktarının toplam nanopartikül ağırlığına oranı olarak ifade edilirken, enkapsülasyon verimi ise başlangıçtaki ilaç miktarının ne kadarının nanopartikül sistemine entegre olduğunu göstermektedir. Bu iki parametre, nanopartiküllerin farmasötik etkinliğini ve ilacın hedefe yönelik salımını optimize etmek için kritik öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında, paklitaksel yükleme işlemi sırasında çeşitli başlangıç konsantrasyonlarında (1, 2 ve 3 mg/mL) ilaç yükleme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Düşük başlangıç konsantrasyonunda (2 mg/mL) paklitaksel yüklü nanopartiküllerde yükleme kapasitesi %10,6 olarak belirlenmiş ve enkapsülasyon verimi %52,36 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, düşük konsantrasyonlarda ilacın kitosan-nitroimidazol matriksine homojen bir şekilde entegre olduğunu ve minimal kayıplarla nanopartiküllerde etkili bir şekilde kapsüllendiğini göstermektedir. Yüksek enkapsülasyon verimi, paklitaksel moleküllerinin kitosanın aktif fonksiyonel grupları (amin ve hidroksil grupları) ile güçlü etkileşimler kurarak nanopartikül matriksinde stabilize olduğunu ortaya koymaktadır. Paklitaksel konsantrasyonu 2,0 mg/mL'ye çıkarıldığında yükleme kapasitesi %12,7 olarak ölçülmüş ve enkapsülasyon verimi %31,37 olarak belirlenmiştir. Bu durumda gözlemlenen yükleme kapasitesindeki artış, başlangıçtaki ilaç konsantrasyonunun artırılmasının nanopartiküllerin taşıma kapasitesini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Ancak enkapsülasyon veriminde bir düşüş gözlemlenmiş ve bu düşüş, yüksek konsantrasyonlarda paklitaksel moleküllerinin nanopartikül sistemine entegrasyonunun sınırlı hale gelmesinden kaynaklanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda nanopartikül yüzeyindeki doygunluk seviyesine ulaşıldığı ve serbest kalan paklitaksel moleküllerinin çözelti fazında kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, ilaç yükleme süreçlerinde başlangıç konsantrasyonunun optimum seviyede tutulmasının önemli olduğunu göstermektedir. Daha yüksek bir başlangıç konsantrasyonu (3,0 mg/mL) kullanıldığında yükleme kapasitesi %14,2 olarak ölçülmüş ve enkapsülasyon verimi %35,1 seviyesine düşmüştür. Bu durumda gözlemlenen düşük enkapsülasyon verimi, yüksek konsantrasyonların nanopartikül sisteminde aglomerasyon eğilimine ve ilacın etkin şekilde kapsüllenmesinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. SEM ve TEM analizleri de bu durumu desteklemiş ve yüksek ilaç konsantrasyonlarında yüzeyde yoğun bir ilaç tabakası ve düzensiz dağılımlar gözlemlenmiştir. Hem optimum yükleme kapasitesi hem de yüksek enkapsülasyon verimi sağladığı için ilerleyen deneylere 1,0 mg/mL paklitaksel konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

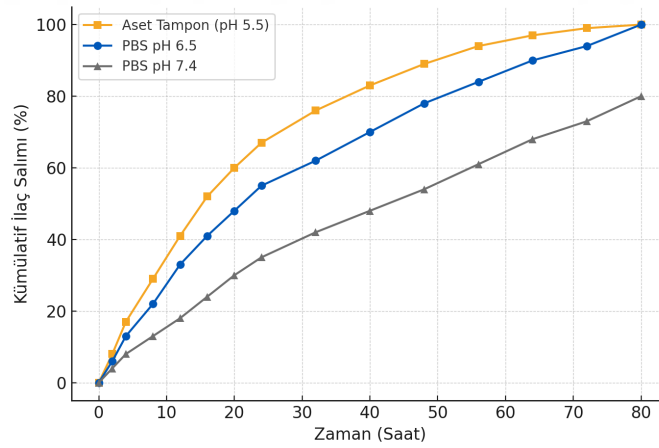
3.6. *In vitro* salım çalışmaları

Kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinden paklitaksel salım profili, kontrollü salım mekanizmaları ve hedefe yönelik etkinliğin optimize edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Salım profili analizleri, farklı çevresel koşullarda (pH 5,5; 6,5 ve 7,4) ve normoksik ile hipoksik mikroçevrelerde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, ilacın salım hızını, çevresel koşullara duyarlılığını ve nanopartikül sisteminin farmasötik etkinliğini ortaya koymuştur. Özellikle hipoksik koşullarda nitroimidazol gruplarının aktifleşmesiyle kontrollü ve uyarlanabilir bir salım mekanizması sağlanmıştır. Normoksik mikroçevrede farklı pH koşullarındaki salım profili incelendiğinde, asidik ortamların paklitaksel salımı üzerinde belirgin bir hızlandırıcı etki yarattığı gözlemlenmiştir. pH 5.5 koşulunda paklitaksel salımı ilk 12 saat içinde hızlı bir başlangıç yaparak toplam yüklenen ilacın yaklaşık %45'inin bu süre içinde salındığı belirlenmiştir. Bu hızlı salım, özellikle kitosan matriksinin asidik ortamlarda çözünürlüğünün artmasından ve kitosan-nitroimidazol bağlarının kısmen zayıflamasından kaynaklanmıştır. pH 6,5 ortamında ise bu başlangıç salımı daha yavaş gerçekleşmiş ve 12 saat içinde yaklaşık %30 oranında paklitaksel salınmıştır. Nötral pH (7,4) ortamında, paklitaksel salım hızının oldukça düşük olduğu ve bu sürede yalnızca %15-20 civarında salım gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). Bu sonuçlar, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin özellikle tümör mikroçevresindeki düşük pH koşullarında daha hızlı ve etkin salım sağladığını ve bu sistemin spesifik tümör bölgelerinde aktif olma potansiyelini desteklediğini göstermektedir. Hipoksik ve normoksik koşullar altındaki salım profili karşılaştırıldığında, hipoksik mikroçevrede nitroimidazol gruplarının indirgenmesi sonucu kontrollü salım mekanizmasının hızlandığı belirlenmiştir. Normoksik koşullarda paklitaksel salımı nispeten sabit bir hızla ilerlemiş ve 48 saat içinde toplam paklitakselin yaklaşık %50'si serbest bırakılmıştır. Ancak hipoksik koşullarda bu değer, aynı süre içinde %70-75 seviyelerine ulaşmıştır. Bu durum, hipoksik ortamlarda nitroimidazol gruplarının indirgenerek kitosan matriksinin daha hızlı parçalanmasına neden olması ile açıklanabilir. Ayrıca, hipoksik ortamlarda nanopartikül yüzeyinde daha fazla pürüzlenme ve matriksin çözünürlüğünde artış gözlemlenmiştir. Bu durum, TEM analizleri ile de desteklenmiş ve nanopartiküllerin hipoksik koşullarda daha hızlı yapı bozulması gösterdiği doğrulanmıştır. Paklitaksel salım profili incelendiğinde, salım sürecinin başlangıçta hızlı bir salım (burst release) ve ardından gelen yavaş ve kontrollü bir salım olmak üzere iki aşamalı bir model izlediği görülmüştür. İlk aşamada, nanopartikül yüzeyine daha yakın konumda bulunan paklitaksel moleküllerinin hızlı bir şekilde serbest bırakıldığı belirlenmiştir. Bu hızlı salım sürecinde pH ve hipoksi gibi çevresel faktörlerin etkisi daha belirgin olmuş ve başlangıçta serbest kalan ilacın tümör hücreleri üzerinde daha hızlı bir etkinlik göstermesinin sağlanabileceği öngörülmüştür. Salımın ikinci aşaması, nanopartikül çekirdeğindeki paklitaksel moleküllerinin yavaş yavaş serbest bırakıldığı daha uzun süreli bir salım penceresini temsil etmektedir. Bu kontrollü salım penceresi, ilacın uzun vadeli ve sürekli bir etki göstermesini sağlamış ve nanopartikül sisteminin kronik uygulamalarda etkinliğini desteklemiştir. Salım kinetiği modelleri incelendiğinde, salım profillerinin Higuchi ve

Korsmeyer-Peppas modellerine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Higuchi modeli, paklitakselin matriks boyunca difüzyonuna dayalı bir mekanizmayı desteklerken, Korsmeyer-Peppas modeli hem difüzyona hem de matriksin parçalanmasına bağlı çift mekanizmalı bir salım sürecini açıklamıştır. Hipoksik ortamda bu çift mekanizma daha belirgin hale gelmiş ve hem matriksin bozunması hem de ilacın difüzyon yoluyla kontrollü bir şekilde serbest bırakılması salım sürecini hızlandırmıştır.



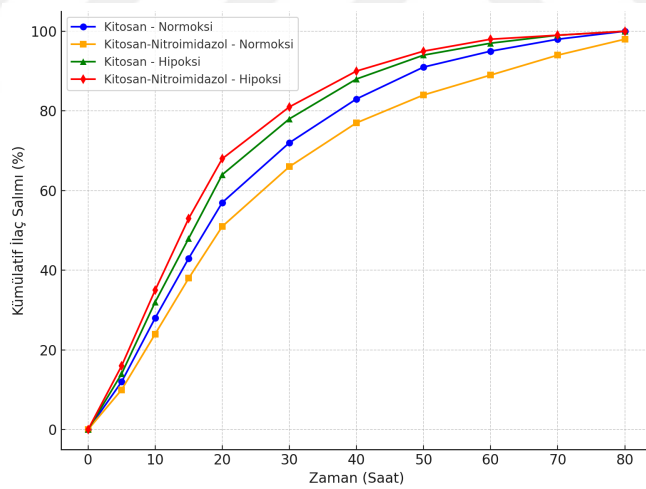
Şekil 3. 2. Kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerden paklitaksel salımı



Şekil 3. 3. Kitosan nanopartiküllerden paklitaksel salımı

Kitosan nanopartiküllerden paklitaksel salımı incelendiğinde, en yüksek salım oranı pH 5,5 koşulunda gözlemlenmiştir ve 80. saatin sonunda yaklaşık %100 kümülatif salıma ulaşılmıştır (Şekil 3.2). Bu durum, asidik ortamda kitosan yapısının şişme eğiliminin artmasıyla açıklanabilir; protonlanmış amino gruplarının daha fazla su tutması, matrisin gevşemesine neden olarak ilacın difüzyonunu kolaylaştırır. pH 6,5 koşulunda salım daha yavaş seyretmiş olup, 80. saatte yine yaklaşık %100 salıma ulaşılmış, ancak bu noktaya ulaşma süresi daha

uzundur. Bu, daha az şişen kitosan yapısının ilacın difüzyonunu sınırlaması ile açıklanabilir. Buna karşılık, fizyolojik pH olan 7,4'te kitosan nanopartiküllerden ilaç salımı belirgin şekilde azalmış, 80. saatte maksimum %80 seviyelerine ulaşmıştır. Nötral ortamda kitosanın çözünürlüğü düşük olduğundan, salım hızı da buna paralel olarak düşmüştür. Aynı koşullar altında kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri incelendiğinde, özellikle pH 5,5 ortamında salımın daha hızlı ve erken doygunluğa ulaştığı, pH 6,5 ve 7,4 koşullarında ise salım oranlarının kitosan nanopartiküllere kıyasla anlamlı şekilde daha düşük kaldığı görülmüştü. Bu farklılığın, nitroimidazol modifikasyonunun kitosan matriksinde çapraz bağlanma yoğunluğunu artırarak ilacın salımını fiziksel olarak sınırlamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin daha kontrollü ve pH-duyarlı bir salım profili sunduğunu, buna karşılık kitosan nanopartiküllerin asidik ortamda daha hızlı salım sağladığını göstermektedir. Bu durum, hedefe yönelik salım sistemleri tasarlanırken nitroimidazol modifikasyonunun salım kinetikleri üzerinde yapısal etkilerinin dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Özellikle tümör mikrosimülasyonunda pH'ın 5,5–6,5 arasında değiştiği dikkate alınırsa, bu farklılıkların biyolojik etkinlik üzerine doğrudan yansımaları olacağı düşünülmektedir.



Şekil 3. 4. Kitosan ve kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerden hipoksik ve normoksik koşullarda paklitaksel salımı

Normoksik koşullar altında, kitosan nanopartiküller yaklaşık 80. saatte %100'e yakın bir kümülatif ilaç salımı göstermiştir (Şekil 3.3). Buna karşılık, kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, normoksik ortamda daha yavaş bir salım profili sergilemiş ve aynı sürede yaklaşık %98 kümülatif salım düzeyine ulaşmıştır. Bu durum, nitroimidazol modifikasyonunun

nanopartikül matrisinde daha sıkı bir yapı oluşturduğunu ve ilacın salımını hafifçe geciktirdiğini göstermektedir. Hipoksik koşullarda ise her iki sistemde de daha hızlı ve etkili bir salım profili gözlemlenmiştir. Özellikle kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, hipoksiye duyarlı yapısı sayesinde yaklaşık 40. saatte %90 seviyesine kümülatif salım düzeyine ulaşmıştır. Bu sonuç, nitroimidazol modifikasyonunun hipoksik ortamda daha fazla parçalanarak ilaç salımını hızlandırdığını ortaya koymaktadır. Kitosan nanopartiküller ise benzer şekilde yüksek salım kapasitesi göstermiş, ancak nitroimidazol içeren yapı kadar hızlı bir başlangıç kinetiği sergilememiştir. Hipoksiye duyarlı sistemlerin özellikle tümör mikroçevresinde beklenen düşük oksijen seviyelerinde daha etkin bir ilaç salımı sağladığı ve bu durumun hedefe yönelik kemoterapi uygulamaları açısından avantajlı olabileceği değerlendirilmiştir. Özellikle kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, hipoksik koşullarda daha belirgin ve kontrollü bir salım stratejisi sunarak sistemik toksisiteyi azaltma ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeli taşımaktadır. Yapılan bu çalışmalar, geliştirilen nanopartikül sisteminin tümör hedeflemeli, çevresel uyaranlara duyarlı ve kontrollü ilaç salım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuş; böylelikle ileri prelinik ve klinik değerlendirmeler için güçlü bir aday olabileceğini göstermiştir.

3.7. *In vitro* çalışmalar

Bu tez çalışmasında, MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılarak normoksik ve hipoksik koşullarda boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküller, serbest paklitaksel ve paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküller ile yapılan *in vitro* uygulamalarda hücre canlılık oranları değerlendirilmiştir.

Hücrelere 0,1-5 µg/mL aralığında paklitaksel ve bu konsantrasyonlara eşdeğer düzeyde paklitaksel içeren kitosan bazlı nanopartiküler sistemler ve aynı konsantrasyonda bazlı nanopartiküler sistemler uygulanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MTT testi ile sitotoksik etkiler incelenmiştir. Her bir koşulda elde edilen absorbans değerleri normalize edilerek % hücre canlılığına dönüştürülmüş ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizler gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. Normoksik koşullarda hücre canlılığı

Normoksik ortamda yapılan uygulamalarda, her üç formülasyon da konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında hafif azalmalar göstermiştir. Ancak yapılan istatistiksel analizlerde aynı konsantrasyon düzeylerinde formülasyonlar arasında anlamlı farklar gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Bu sonuçlar, paklitakselin serbest formunun yanı sıra nanopartikül içine enkapsüle edilmiş formunun da hücre canlılığı üzerinde benzer etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Boş nanopartikül grubunda ise minimal sitotoksik etki gözlenmiştir, bu da kitosan-nitroimidazol sisteminin biyouyumlu olduğunu desteklemektedir.

3.7.2. Hipoksik koşullarda hücre canlılığı

Hipoksik koşullarda yapılan değerlendirmelerde de benzer bir eğilim izlenmiştir. Serbest paklitaksel, boş nanopartiküller ve paklitaksel yüklü nanopartiküller arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Her üç grupta da canlılık oranları, yüksek konsantrasyonlara çıkıldıkça azalmış olmakla birlikte, bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p > 0.05$). Beklenti, hipoksiye duyarlı nitroimidazol modifikasyonunun bu koşullarda daha belirgin bir sitotoksik etki yaratması yönündeydi. Ancak elde edilen veriler, bu etkinin ölçülebilir düzeyde gerçekleşmediğini göstermiştir. Yapılan *in vitro* deneylerde; hiçbir formülasyonun, MCF-7 hücre canlılığı üzerinde diğerlerine kıyasla belirgin üstünlük sağlamadığı, formülasyonlar arasında anlamlı fark olmadığı, boş nanopartiküllerin biyouyumlu ve düşük toksisiteli olduğu ve paklitakselin serbest ve enkapsüle formunun benzer etki profiline sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, nanopartikül sistemi ile kontrollü salım avantajının mevcut koşullar altında belirginleşmediğini ve sitotoksik etkinin optimize edilmesi için hücre tipi, inkübasyon süresi, konsantrasyon aralıkları farklı parametrelerin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın malignite türlerinden biridir ve 2020 yılı verilerine göre yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka teşhis edilmiştir (Sung et al., 2021). Kadın kanserlerinin %24'ünü oluşturan bu hastalık, erken teşhis ve tedaviye yönelik ilerlemelere rağmen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Moleküler heterojenitesi ve farklı alt tipleri (Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif ve triple negatif) nedeniyle her vaka kişiselleştirilmiş bir tedavi stratejisi gerektirmektedir. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri, mevcut tedavi yaklaşımları arasında yer almaktadır. Ancak özellikle metastatik ve ilaca dirençli meme kanseri vakalarında mevcut tedaviler sınırlı kalabilmektedir (Harbeck et al., 2019).

Geleneksel tedavi yöntemlerindeki sınırlamalar, kanser tedavisinde nanoteknoloji tabanlı yenilikçi sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler, terapötik moleküllerin hedef dokuya etkili bir şekilde ulaştırılmasını sağlayarak toksik etkileri minimuma indirmekte ve tedavi etkinliğini artırmaktadır (Torchilin, 2005). Özellikle pH ve hipoksiye duyarlı sistemler gibi akıllı ilaç taşıyıcıları, kanser mikroçevresindeki biyokimyasal değişiklikleri algılayarak kontrollü salım mekanizmalarını aktive etmektedir (Gillies et al., 2012). Bu tezde, hipoksiye duyarlı nitroimidazol modifikasyonu ile tasarlanan kitosan bazlı nanopartiküllere paklitaksel yüklenmiş ve kontrollü ilaç salımı hedeflenmiştir.

Tüm bu amaçlar ve hedefler doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında sentezlenen boş kitosan-nitroimidazol nanopartiküller ve paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartiküller çeşitli karakterizasyon analizlerine tabi tutulmuş ve ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri açısından detaylı olarak incelenmiştir. Bu parametreler, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi, biyoyumluluğu ve ilaç salım performansı üzerinde önemli etkiler yaratmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda,

1. %0.3 (w/v) kitosan içeriğine sahip formülasyonda ortalama partikül boyutu $115,0 \pm 9,1$ nm, polidispersite indeksi (PDI) $0,15 \pm 0,01$ ve zeta potansiyeli $+20,3 \pm 12,4$ mV olarak ölçülmüştür. Kitosan konsantrasyonu %0,5'e çıkarıldığında ise partikül boyutu anlamlı şekilde artarak $210,0 \pm 11,4$ nm'ye ulaşmış, PDI değeri $0,35 \pm 0,01$ 'e yükselmiş ve zeta potansiyeli $+35,9 \pm 3,1$ mV olmuştur. Bu durum, artan polimer konsantrasyonunun partiküller arası etkileşimleri ve aglomerasyon eğilimini artırarak daha büyük ve heterojen yapılar oluşturduğunu göstermektedir.
2. Paklitakselin 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan formülasyonda ortalama partikül boyutu $120,7 \pm 8,2$ nm, PDI değeri $0,15 \pm 0,01$ ve zeta potansiyeli $+32,3 \pm 16,4$ mV olarak ölçülmüştür. Ancak paklitaksel konsantrasyonu 3 mg/mL'ye çıkarıldığında bu değerler sırasıyla $190,7 \pm 12,2$ nm, $0,25 \pm 0,04$ ve $+27,9 \pm 1,1$ mV olarak

kaydedilmiştir. Bu bulgular, yüksek ilaç yüklemesinin partikül büyüklüğünü artırarak salım kinetiğini ve yüzey yükünü etkileyebileceğini ortaya koymuştur.

3. Farklı paklitaksel ve kitosan konsantrasyonları ile yapılan deneylerde 1.0 mg/mL paklitaksel ve %0,3 (w/v) kitosan konsantrasyonlarının optimum sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bu koşullarda yükleme kapasitesi yüksek ($10,6 \pm 1.1$) ve enkapsülasyon verimi (78 ± 4) tatmin edici bulunmuştur. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin verimli bir şekilde ilaç taşıyabildiğini ve farmasötik uygulamalara uygun olduğunu göstermektedir.
4. Yapılan *in vitro* salım deneyleri, kitosan-nitroimidazol nanopartiküllerinin tümör mikroçevresindeki düşük pH ve hipoksik koşullara duyarlı olarak ilaç salımını hızlandırabildiğini göstermiştir. pH 5,5 ve hipoksik koşullarda paklitaksel salımı, normoksik ve nötral koşullara göre belirgin şekilde artmıştır. Bu durum, tümör bölgelerinde daha yüksek ilaç konsantrasyonunun serbest bırakılabileceğini ve sistemik toksisitenin azaltılabileceğini göstermektedir.
5. Normoksik ortamda yapılan MTT testlerinde, serbest paklitaksel, paklitaksel yüklü kitosan-nitroimidazol nanopartikülleri ve boş nanopartiküller, MCF-7 meme adenokarsinom hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma göstermiştir. Ancak, istatistiksel analizler sonucunda, aynı konsantrasyon seviyelerinde formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum, paklitakselin serbest ve enkapsüle formunun benzer sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve nanopartikül sisteminin normoksik ortamda salım avantajını belirginleştiremediğini göstermiştir.
6. Hipoksik (düşük oksijenli) koşullarda yapılan değerlendirmelerde de benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Özellikle nitroimidazol modifikasyonunun hipoksiye duyarlı olması nedeniyle bu koşullarda daha yüksek bir sitotoksik etki beklenmesine rağmen, serbest ilaç, ilaç yüklü nanopartikül ve boş nanopartiküller arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark elde edilememiştir. Yüksek konsantrasyon seviyelerinde canlılık oranları azalmış olsa da bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamıştır.

Elde edilen *in vitro* veriler ışığında, çalışmada geliştirilen nanopartikül sistemlerinin MCF-7 hücre hattı üzerinde serbest paklitaksel ile benzer düzeyde sitotoksik etki gösterdiği, boş nanopartiküllerin ise biyouyumlu ve düşük toksisiteli olduğu belirlenmiştir. Ancak nanopartikül formülasyonlarının, özellikle hipoksik koşullarda nitroimidazol modifikasyonu ile hedeflenen düzeyde sitotoksikite farklılığına neden olmaması sistemin hücre düzeyindeki etkinliğinin sınırlı kaldığını göstermektedir. Bu durum, deney parametrelerinin gözden geçirilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

- Öncelikle, kullanılan hücre hattının moleküler alt tipi (Luminal A, hormon reseptör pozitif dikkate alındığında, farklı moleküler yapıya sahip ve daha agresif özellikler sergileyen hücre hatlarıyla da testler gerçekleştirilmesi, sistemin genelleştirilebilir etkinliğini değerlendirmek açısından önem arz etmektedir.
- Ayrıca, kullanılan inkübasyon sürelerinin (24 ve 48 saat) kontrollü salım mekanizmalarını yansıtmakta yetersiz kalabileceği düşünülerek, 72 saat ve üzeri gibi daha uzun süreli uygulamalar tercih edilmelidir. Bununla birlikte, doz-cevap ilişkisinin daha hassas değerlendirilmesi için düşük ve yüksek konsantrasyon aralıklarının genişletilmesi önerilmektedir.
- Hücre canlılığı değerlendirmelerinde yalnızca MTT testinin kullanılması, sistemin biyolojik etkilerini sınırlı biçimde ortaya koyduğundan, ileriki çalışmalarda apoptoz analizi, hücre döngüsü dağılımı ve nanopartikül alımına yönelik konfokal mikroskopi gibi tamamlayıcı yöntemlerin kullanılması fayda sağlayacaktır. Özellikle hipoksik ortama özgü etkilerin netleştirilebilmesi için HIF-1 α ekspresyon düzeyleri ya da hipoksi ile ilişkili biyobelirteçlerin düzeylerinin ölçülmesi, sistemin modifikasyonunun hücresel yanıt üzerindeki etkisini açıklamaya katkı sağlayacaktır. Sonuç olarak, nanopartikül sisteminin potansiyeli açık olmakla birlikte, bu etkinin daha güçlü ve farklı parametrelerle optimize edilmiş koşullarda daha net biçimde ortaya konulması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., ... & de Gramont, A. (2009). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2343-2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... & Coglian, V. (2007). Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet Oncology*, 8(4), 292-293. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70099-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70099-2).
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124-1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>.
- Benson, A. B., Venook, A. P., Al-Hawary, M. M., Cederquist, L., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., ... & Zhu, A. X. (2018). Colon cancer, version 2.2018, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(4), 359-369. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0021>.
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. J., & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55(4), 244-265. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>.
- Boyle, T., Keegel, T., Bull, F., Heyworth, J., & Fritschi, L. (2011). Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(20), 1543-1551. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr325>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857-866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>.
- Cassidy, J., et al. (2008). XELOX vs FOLFOX4: Efficacy and safety in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(12), 2006-2012.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2000). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1471(M1), M51-M62. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(00\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(00)00006-3).
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369-374.
- Cremolini, C., et al. (2015). FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line therapy in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, 16(13), 1306-1315.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.

- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3), 313-319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>.
- Dang, L. H., Bettegowda, C., Huso, D. L., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15155-15160. <https://doi.org/10.1073/pnas.261574598>.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... & Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc969>.
- Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., & Trotti, A. (2010). *AJCC cancer staging manual* (7th ed.). Springer-Verlag.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067>.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348. <https://doi.org/10.1038/35077213>.
- Falcone, A., et al. (2007). FOLFOXIRI, a combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(13), 1670-1676.
- Fang, X., Wei, J., He, X., Liao, D., Xie, M., Huang, T., ... & Zhang, J. (2021). Quantitative association between body mass index and the risk of cancer: A global meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cancer*, 149(2), 274-285. <https://doi.org/10.1002/ijc.33507>.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1016-1036.
- Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(4), 925-943. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(02\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(02)00053-6).
- Glozak, M. A., & Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26(37), 5420-5432. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210610>.
- Gutiérrez-Ruiz, S. C., Cortes, H., González-Torres, M., & et al. (2024). Optimize the parameters for the synthesis by the ionic gelation technique, purification, and freeze-drying of chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticles for biomedical purposes. *Journal of Biological Engineering*, 18(12). <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00403-w>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, 131(12), 2724-2732. <https://doi.org/10.1002/ijc.27816>.
- Heinemann, V., et al. (2014). Anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *The*

Lancet Oncology, 15(5), 485-494.

Heuberger, J., & Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a002915. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>.

Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A. E., ... & Fujita, Y. (2004). Characterization of the junctional rupture during epithelial cell scattering. *Current Biology*, 14(15), 1381-1390. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.031>.

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring, and therapeutics. A Comprehensive Review. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), 143-159. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100209>.

Janku, F., Yap, T. A., & Meric-Bernstam, F. (2018). Targeting the PI3K pathway in cancer: Review of current evidence. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(5), 273-291. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28>.

Janakiraman, M., & Vakiani, E. (2016). Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(4), 647-669. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.05.007>.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159-170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1).

Kriz, W., & Kaissling, B. (1996). Structural organization of the kidney. In *Comprehensive Clinical Nephrology* (pp. 3-30). Elsevier.

Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., ... & Gansler, T. (2012). American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), 30-67. <https://doi.org/10.3322/caac.20140>.

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

Lathia, J. D., & Liu, H. (2017). Overview of cancer stem cells and stemness for community oncologists. *Targeted Oncology*, 12(4), 387-399. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0508-3>.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386(6625), 623-627. <https://doi.org/10.1038/386623a0>.

Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Andrews, K. S., Brooks, D., Bond, J., ... & Winawer, S. J. (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: A joint guideline. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(3), 130-160. <https://doi.org/10.3322/CA.2007.0018>.

Li, G., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a026831. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>.

Li, W., Qiu, T., Guo, L., Ying, J., & Shi, Z. (2015). BRAF mutations are associated with distinct clinical outcomes in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 10(6), 3816-3824. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3763>.

Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of*

- Medicine, 348(10), 919-932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.
- Magee, J. A., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: Impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3), 283-296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449-2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>.
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215-230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- Masszi, A., Fan, L., Rosivall, L., McCulloch, C. A., Rotstein, O. D., Mucsi, I., & Kapus, A. (2010). Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF- β 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition. *American Journal of Pathology*, 176(1), 346-357. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090485>.
- Mayer, R. J., et al. (2015). Randomized trial of TAS-102 for refractory colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(20), 1909-1919.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49(9), 978-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274-284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>.
- Nieto, M. A. (2011). The ins and outs of the epithelial-to-mesenchymal transition in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 347-376. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>.
- Özer, M. (2021). Kolorektal Kanser: Moleküler biyolojisi ve tedavi yaklaşımları. *Türk Onkoloji Dergisi*, 36(1), 12-19.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415-428. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*, 28(6), 622-629. <https://doi.org/10.1002/humu.20495>.
- Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y. G., Lee, S. H., Jun, N., Kim, K. S., ... & Kwon, H. Y. (2018). Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells International*, 2018, 5416923. <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>.
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Prior, I. A., Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10), 2457-2467.
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and

- metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423-1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., & Gebbia, N. (2005). The TP53 gene and colorectal cancer: Mutations and pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1), 119-127. <https://doi.org/10.1002/jcp.20274>.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., ... & Vogelstein, B. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304(5670), 554-554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>.
- Schutte, M., Hruban, R. H., Hedrick, L., Cho, K. R., Nadasdy, G. M., Weinstein, C. L., ... & Kern, S. E. (1996). DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Research*, 56(11), 2527-2530.
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>.
- Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J., & Bardelli, A. (2009). Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(19), 1308-1324. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp280>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
- Straif, K., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., ... & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The Lancet Oncology*, 10(5), 453-454. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70134-2).
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., ... & Ivy, S. P. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(8), 445-464. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.61>.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- Tian, X., Dai, S., Sun, J., Jiang, S., & Jiang, W. (2010). Notch signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer: Biological significance and therapeutic application. *Journal of Hematology & Oncology*, 3, 37. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-37>.
- Tsai, H. C., & Baylin, S. B. (2011). Cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Cell Research*, 21(3), 502-517. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.24>.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8681-8686. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8681>.
- Twelves, C., et al. (2005). Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(26), 2696-2704.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., ... & Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 27(8), 1386-1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.

- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558.
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 275-283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., ... & Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(7), 787-793. <https://doi.org/10.1038/ng1834>.
- World Health Organization. (2020). Cancer prevention. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Xie, Y., Wang, Y., Wang, Y., Peng, X., & Zhang, X. (2021). The role of dietary factors in colorectal cancer development and prevention. *Cancer Management and Research*, 13, 803-817. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S291353>.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156-172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1429-1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.

