



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**DİRENÇLİ MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FOLİK ASİT İŞARETLİ
EKSOZOMA YÜKLÜ KARBOPLATİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA KARABULUT

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SIDIKA GENÇ

BİLECİK, 2026

10822721

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**DİRENÇLİ MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FOLİK ASİT İŞARETLİ
EKSOZOMA YÜKLÜ KARBOPLATİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA KARABULUT

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SIDIKA GENÇ

BİLECİK, 2026

10822721

BEYAN

“Dirençli Meme Kanseri Hücre Hattında Folik Asit İşaretli Eksozoma Yüklü Karboplatinin Antikanser Etkilerinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine uygun olarak tez/dönem projemi hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez/dönem projesi olarak sunulmadığını, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışma Bilecik Şeyh Edebali üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 717 no’lu proje ile desteklenmiştir .

Kübra Karabulut

../../2026

İmza:



YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN ÖĞRENCİ BEYAN FORMU

BŞEÜ-KAYSİS Belge	DFR-516
İlk Yayın Tarihi/Sayısı	30.04.2026/16
Revizyon Tarihi	00
Revizyon No.su	00
Toplam Sayfa	1

Bölüm I. Yapay Zekâ Kullanım Durumu

☒ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı araçlardan faydalandım.

☐ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı herhangi bir araçtan faydalanmadım.

Bölüm II. Yapay Zekâ Kullanım Detayları

**Bu bölüm yalnızca yapay zekâ kullanımı beyan edilmiş ise doldurulacaktır. Aksi durumda boş bırakılmalıdır.*

Tezinizde/projenizde kullandığınız yapay zekâ araçlarını ve sürümünü listeleyiniz:

ChatGPT- GPT-5.5

**Yapay zekâ araçlarını tezin/projemin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım.
(Birden fazla seçenek işaretlenebilir):**

- ☐ Cümle oluşturma
- ☐ Literatür tarama
- ☐ Çeviri
- ☒ Düzenleme/dil kontrolü
- ☐ Veri işleme ve analizi
- ☐ Veri görselleştirme
- ☒ Görüntü üretme
- ☐ Kaynakça düzenleme
- ☐ Diğer (Belirtiniz):.....

Bu çalışmada yapay zekâ kullanımı **Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber**'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup yapay zekâ araçlarından alınan destek, etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir. Yapay zekâ kullanımı, çalışmanın özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmayacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Usulsüz yapay zekâ kullanımı (örneğin: kaynak göstermeksizin metin üretimi, otomatik içerik üretiminin özgün eser gibi sunulması, yanıltıcı kaynak gösterimi vb.) tarafımdan kesinlikle yapılmamıştır. Yapay zekâ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

Kübra Karabulut

.././2026

İmza

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, sabırla tüm bildiklerini öğretmek için elinden geleni yapan, hiçbir desteğini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sıdika GENÇ'e, sabrı, emeği, maddi/manevi desteği ve her daim yol göstericiliği nedeniyle sayın Doç. Dr. Ali TAGHIZADEHGHAEHJOUGHİ hocama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmama TEZ-Y-2025-717 numaralı proje ile destek sağlayan Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Beni büyüten, her zaman arkamda duran, sevgi ve şefkatini üzerimden hiç eksik etmeyen annem Ünzile, babam Cüneyt KARABULUT'a çok teşekkür ederim.

Aramıza hiçbir zaman rekabetin girmesine izin vermeyen, her daim ve her yerde yanımda olan dostum ve akademik yoldaşım Esmanur NİĞDE ve Yunus Emre AYDIN'a, desteklerinden dolayı ağabeyimiz Abdullah DURAK'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), meme kanserinin en agresif alt tiplerinden biridir. TNBC, moleküler olarak östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatifliği ile karakterizedir. Bu nedenle reseptör hedefli tedavilerin TNBC'deki etkinliği kısıtlıdır. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi ve radyoterapiye ek olarak sitotoksik ajanlar sıklıkla tercih edilmektedir. TNBC tedavisinde kullanılan kemoterapötikler arasında taksanlar, antrasiklinler, siklofosfamid ve platin türevleri yer almaktadır. Karboplatin, DNA üzerinde zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller, hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu indükler. Ancak bu ajanların sağlıklı dokularda oluşturduğu toksisite ve kanser hücrelerinde gelişen ilaç direnci önemli sorunlardır. Bu sorunların aşılması için yeni nesil terapötik yöntemlerin geliştirilmesi elzemdir. Yeni terapötik stratejiler arasında, homotipik eksozomlardan, ilaçların tümör hücrelerine taşınması ve hücre içi ilaç birikiminin artırılması amacıyla yararlanılmaktadır. Ayrıca, başta eksozomlar olmak üzere diğer nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser hücrelerine özgü olarak hedeflendirilmesi de önemli bir araştırma alanıdır. Bu bağlamda, bazı kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen folat reseptörü alfa (FR α /FOLR1) hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında, farklı dozlarda karboplatin yüklenmiş MDA-MB-231 kaynaklı ekstraselüler veziküller folik asitle modifiye edilmiş ve antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Antikanser etkinliğin belirlenmesi amacıyla canlılık (MTT), sitotoksisite (LDH), oksidatif hasar (MDA, KAT), mitokondriyal hasar (PINK1, Parkin), inflamasyon (IL-1 β , IL-6, IL-10) ve apoptoz (P53, P21, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3, Kaspaz-9) parametreleri incelenmiştir. Tüm tedavi grupları kontrol grubuyla, FA-EXO-KP grupları ise karşılık gelen karboplatin monoterapi gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle FA-EXO-KP 5 ve FA-EXO-KP 10 μ M gruplarında, karboplatin monoterapisine kıyasla hücre canlılığında yaklaşık %50 daha fazla azalma gözlenmiştir. Oksidatif hasarın da doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Apoptotik belirteçlerden elde edilen sonuçlar da doza bağlı artış göstermiş olup, FA-EXO-KP 5 ve 10 μ M gruplarının karboplatin monoterapisine göre daha yüksek apoptotik etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, FA-EXO-KP kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerinde karboplatin monoterapisine kıyasla 72. saatte apoptozu %12–40 oranında daha fazla indüklediği ve L929 hücrelerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Eksozom, Folik asit, Karboplatin, MDA-MB-231, TNBC

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive subtypes of breast cancer. TNBC is characterized by molecular negativity to estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Therefore, the effectiveness of receptor-targeted therapies in TNBC is limited. Treatment options frequently include surgery and radiotherapy, in addition to cytotoxic agents. Chemotherapeutic agents used in TNBC treatment include taxanes, anthracyclines, cyclophosphamide, and platinum derivatives. Carboplatin inhibits DNA replication and transcription by forming intrastrand and interstrand cross-links on DNA, halting the cell cycle and inducing apoptosis. However, the toxicity these agents cause in healthy tissues and the development of drug resistance in cancer cells are significant problems. Developing next-generation therapeutic methods is essential to overcome these problems. New therapeutic strategies utilize homotypic exosomes for drug transport to tumor cells and to enhance intracellular drug accumulation. Furthermore, the targeted application of other nano-drug delivery systems, primarily exosomes, to specific cancer cells is a significant area of research. In this context, the folate receptor alpha (FR α /FOLR1), which is highly expressed in some cancer cells, is targeted. In this thesis study, extracellular vesicles derived from MDA-MB-231 loaded with different doses of carboplatin were modified with folic acid, and their anticancer effects were evaluated. To determine anticancer efficacy, parameters such as cell viability (MTT), cytotoxicity (LDH), oxidative damage (MDA, KAT), mitochondrial damage (PINK1, Parkin), inflammation (IL-1 β , IL-6, IL-10), and apoptosis (P53, P21, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Caspase-3, Caspase-9) were examined. All treatment groups were compared with the control group, and the FA-EXO-KP groups were compared with the corresponding carboplatin monotherapy groups. According to the results, a decrease in cell viability of approximately 50% greater was observed, especially in the FA-EXO-KP 5 and FA-EXO-KP 10 μ M groups, compared to carboplatin monotherapy. Oxidative damage was also determined to increase in a dose-dependent manner. Results obtained from apoptotic markers also showed a dose-dependent increase, and it was determined that the FA-EXO-KP 5 and 10 μ M groups exhibited higher apoptotic activity compared to carboplatin monotherapy. In conclusion, it was determined that the FA-EXO-KP complex induced apoptosis 12–40% more in MDA-MB-231 cells at 72 hours compared to carboplatin monotherapy and showed no toxic effect in L929 cells.

Keywords: Carboplatin, Exosome, Folic acid, MDA-MB-231, TNBC

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Meme Kanserine Genel Bakış	3
2.2. Meme Kanseri Patofizyolojisi.....	4
2.2.1. Meme kanserinde TNM (Tümör Nod Metastaz) evrelemesi	6
2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	9
2.3.1. Meme kanserinin invazyon durumuna göre sınıflandırılması	9
2.3.1.1. Non-invazif meme kanseri.....	9
2.3.1.2. İnvazif meme kanseri.....	9
2.3.2. Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılması	10
2.3.2.1. Duktal karsinoma in situ (DCIS).....	10
2.3.2.2. İnvazif lobüler karsinoma (ILC)	10
2.3.2.3. Modüller meme kanseri (MBC)	11
2.3.2.4. Müsinöz karsinoma (MC)	11
2.3.2.5. Tübüler karsinoma	11
2.3.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	11

2.3.3.1. Luminal A tipi	12
2.3.3.2. Luminal B tipi	12
2.3.3.3. HER2+	12
2.3.3.4. TNBC	13
2.4. Meme Kanserinde Tedavi	14
2.4.1. Mastektomi	15
2.4.2. Radyoterapi	15
2.4.3. Kemoterapi	15
2.4.4. Hormon tedavisi	16
2.4.5. İmmünoterapi	16
2.5. TNBC’de Kullanılan Kemoterapi Ajanları	18
2.5.1. Taksanlar	19
2.5.2. Antrasiklinler	20
2.5.3. Siklofosfamid	21
2.5.4. Platin ajanlar	22
2.5.4.1. Karboplatin ve antikanser etki mekanizması	25
2.5.5. İlaç direnç mekanizmaları	27
2.6. TNBC’de Etkinliğin ve Seçiciliğin Arttırılması için Biyoteknolojik Yaklaşımlar	29
2.6.1. İlaç taşıyıcı sistemler	30
2.6.1.1. Eksozomlar	32
2.6.2. Folik asit ile akıllı hedeflendirme stratejileri	34
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Hücre Kültürü	38
3.2. Eksozom İzolasyonu	38
3.3. Eksozom Karakterizasyonu	39

3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	39
3.3.2. Zeta potansiyeli	39
3.3.3. Western blot	39
3.3.4. BCA ile eksozomal protein tayini	40
3.3.5. Karboplatinin-eksozom kompleksinin oluşturulması	40
3.3.6. Folik asit konjuge eksozomların hazırlanması.....	41
3.4. İn Vitro Uygulama.....	41
3.4.1. Deney gruplarının oluşturulması	41
3.5. MTT ile Canlılık Testi.....	43
3.6. İmmünofloresan Boyama.....	43
3.7. Real-Time PCR Analizi.....	44
3.7.1. Genetik materyalin elde edilişi	44
3.7.2. Total RNA izolasyonu.....	44
3.7.3. cDNA sentezi	45
3.7.4. Gen ekspresyonu.....	45
3.8. ELİZA Analizleri.....	46
3.9. İstatistiksel Analiz	46
4. SONUÇLAR	47
4.1. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	47
4.2. Hazırlanan FA-EXO-KP Komplekslerinin Karakterizasyonu	49
4.3. MTT ile Canlılık Analizi	51
4.4. İmmünofloresan Boyama.....	55
4.5. qRT-PCR Analizleri.....	58
4.6. ELİZA Analizleri.....	62
5. TARTIŞMA	67
5.1. MDA-MB-231 ve L929 Hücre Hatları.....	68

5.2. Eksozomların ve FA-EXO-KP Komplekslerinin Karakterizasyonu	69
5.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi	70
5.4. Oksidatif Hasar Belirteçlerinin (MDA, KAT, MitoSOX) Değerlendirilmesi	72
5.5. İnflamatuvar Etkinliğin Tespit Edilmesi.....	74
5.6. Mitofaji ve Apoptozun PINK1, Parkin, P21, P53, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Ekspresyonları Üzerinden Değerlendirilmesi	77
6. SONUÇ	80
KAYNAKÇA.....	

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. TNM evrelemesi.....	7
Tablo 2. Meme kanseri sınıflandırmasında TNM evrelemesi ve evre gruplaması.....	8
Tablo 3. Meme kanserinde kullanılan tedaviler.....	17
Tablo 4. Deney grupları	42
Tablo 5. Gen primer dizilim listesi.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Meme kanserinin histolojik durumu, invaziv etkinliği ve moleküler alt tiplerine göre sınıflandırılması.....	14
Şekil 2. Taksan türevleri ve piyasadaki müstahzarları.....	19
Şekil 3. Antrasiklin türevleri ve piyasadaki müstahzarları.	20
Şekil 4. Siklofosfamidin kimyasal yapısı ve piyasadaki müstahzarı.	22
Şekil 5. Platin türevleri ve piyasadaki müstahzarları.	25
Şekil 6. Karboplatinin hücre içine alınması, aktivasyonu ve DNA üzerindeki etki mekanizması.	27
Şekil 7. Kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin temel moleküler mekanizmaları.	29
Şekil 8. Tez çalışmasına ait grafiksel özet.	37
Şekil 9. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların SEM görüntüsü.	47
Şekil 10. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların zeta potansiyel sonuçları.	48
Şekil 11. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların Western blot sonuçları.	48
Şekil 12. Yükleme ve işaretleme sonrası MDA-MB-231 eksozomlarının morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için elde edilen SEM görüntüsü.	49
Şekil 13. Oluşturulan FA-EXO konjugatının zeta potansiyel sonuçları	50
Şekil 14. Oluşturulan FA-EXO-KP kompleksinin zeta potansiyel sonuçları	51
Şekil 15. Karboplatin monoterapisi (A) ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının (B) 24 saatlik MTT sonuçları.....	52
Şekil 16. Karboplatin monoterapisi (A) ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının (B) 72 saatlik MTT sonuçları.....	53
Şekil 17. Fibroblast hücrelerinde karboplatin monoterapisi ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının 72 saatlik MTT analizi sonuçları.....	54
Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrasında Parkin (A) ve PINK1 (B) protein ekspresyonlarının immünfloresan mikroskopisi ile değerlendirilmesi.....	58
Şekil 19. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında P53 ve P21 gen ekspresyon düzeyleri.....	59
Şekil 20. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında BAX gen ekspresyon düzeyleri.....	60

Şekil 21. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Bcl-2 ve Bcl-xL gen ekspresyon düzeyleri	61
Şekil 22. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.	62
Şekil 23. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında LDH protein seviyeleri..	63
Şekil 24. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında MDA ve KAT seviyeleri	64
Şekil 25. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında IL-1 β , IL-6 ve IL-10 seviyeleri	65
Şekil 26. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein seviyeleri.	66

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ADC:	Antikor–ilaç konjugatı
BCA:	Bicinchoninic acid protein tayini
BRCA1/2:	Breast cancer susceptibility gene 1/2
CAT:	Katalaz
cDNA:	Komplementer DNA
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DSÖ/WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER:	Östrojen reseptörü
FA:	Folik asit
FBS:	Fetal bovin serum
FOLR1/FRα:	Folat reseptörü alfa
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IL:	İnterlökin
LDH:	Laktat dehidrogenaz
MDA:	Malondialdehit
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NTA:	Nanopartikül izleme analizi
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K:	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PINK1:	PTEN-induced kinase 1
PR:	Progesteron reseptörü
qRT-PCR:	Gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon PCR
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SEM:	Taramalı elektron mikroskobu
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
TBS-T:	Tween 20 içeren Tris tamponlu salin
TIL:	Tümör infiltre edici lenfosit
TNBC:	Üçlü negatif meme kanseri
TNM:	Tümör-Nod-Metastaz

1. GİRİŞ

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla gelişen malign bir hastalıktır (DSÖ, 2026). Kadınlarda, özellikle kanser ilişkili ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Meme kanserinin moleküler heterojenitesi; biyolojik davranışı, klinik seyri ve tedavi yanıtını etkilemektedir (Pasi et al., 2026). Belirtilen bu durumlar meme kanseriyle mücadeleyi olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle son yıllarda gerçekleştirilen genomik ve transkriptomik çalışmalar, meme kanserinin yalnızca histopatolojik özellikleriyle değil, aynı zamanda moleküler profiliyle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bu doğrultuda geliştirilen moleküler sınıflandırmalar, prognozun daha doğru tahmin edilmesine ve uygun tedavinin seçilmesine olanak sağlamaktadır (Benacka et al., 2022). Bu tezde TNBC hücrelerine yönelik aktif hedeflendirilmiş bir nanotaşıyıcı kompleks tasarlanmış ve kompleksin etkinliği ile seçiciliği değerlendirilmiştir.

Meme kanserinin sınıflandırılması, histopatolojik özelliklerine, invaziv davranışına ve içerdiği moleküler belirteçlere göre yapılmaktadır. Histopatolojik sınıflandırmada tümörün köken aldığı hücre tipi ve mikroskobik morfolojik özellikleri değerlendirilirken, invaziv sınıflandırmada tümör hücrelerinin bazal membranı aşarak invazyon gösterip göstermediği esas alınmaktadır. Moleküler sınıflandırmada ise hücrel reseptörlerin ekspresyon seviyeleri göz önünde bulundurulur (Cserni, 2020; Roy et al., 2023). Meme kanserinin moleküler alt tiplerinde esas alınan üç temel biyobelirteç bulunmaktadır. Bunlardan östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), hücre çekirdeğinde lokalize olan nükleer hormon reseptörleri iken, HER2 hücre membranında bulunan bir reseptör tirozin kinazdır. ER ve PR hormon bağımlı aktivasyon sağlarken HER2 dimerleşerek PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MEK/ERK gibi proliferasyon ve hücre sağkalımından sorumlu sinyal yollarını aktive eder (Fragomeni et al., 2018). Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı, ER ve PR ekspresyonunun bulunmaması ve HER2 aşırı ekspresyonunun olmamasıyla karakterize edilen bir TNBC modelidir (Fragomeni et al., 2018).

Meme kanseri tedavisinde; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler yer almaktadır (Maughan et al., 2010). TNBC'nin agresif biyolojisi ve metastatik profili nedeniyle tedavi imkânları diğer alt tiplere oranla kısıtlıdır. Bu nedenle tedavisinde sıklıkla sitotoksik ajanlar tercih edilir. Bu ajanlardan biri olan karboplatin, DNA üzerinde zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak DNA replikasyonu ve

transkripsiyonunu engeller, hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu indükler (Stewart, 2007). Karboplatinin oluşturduğu DNA hasarına oksidatif stres ve mitokondriyal işlev bozukluğu eşlik edebilir. Bu süreçte PINK1 ve Parkin gibi mitofajik proteinlerin miktarlarında değişimler meydana gelir. Apoptotik yanıt ise BAX, BCL-2, BCL-xL ve kaspaz ailesi üyeleri arasındaki düzenleyici etkileşimlerle yürütülür (Elmore, 2007). Ancak karboplatin gibi sitotoksik ajanların etkinliği zamanla azalabilmektedir. Tümör hücreleri; ilacın hücre içine alımının azalması, hücre dışına aktif taşınmasının artması, DNA hasarının daha etkin onarılması, antioksidan savunma mekanizmalarının güçlenmesi, mitokondriyal fonksiyonların değişmesi ve programlanmış hücre ölümünün baskılanması gibi çeşitli direnç mekanizmaları geliştirerek tedavi etkinliğini azaltmaktadır (Stewart, 2007). Sonuç olarak başlangıçta tedaviye yanıt veren hastalarda bile nüks ve metastaz gelişebilmektedir. Bu nedenle günümüzde, ilaç direnç mekanizmalarının hedeflenmesi ve yeni kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi kanser araştırmalarının öncelikli çalışma alanları arasında yer almaktadır (Housman et al., 2014; Tian et al., 2023). Bu kapsamda, kemoterapötik ajanların etkinliğini artırırken sistemik toksisiteyi azaltabilecek yeni ilaç taşıma sistemleri büyük önem kazanmıştır. Günümüzde lipozomlar, polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, dendrimerler ve nanokapsüller gibi çeşitli nanotaşıyıcı sistemler, antikanser ajanların tümör dokusuna seçici olarak ulaştırılması, biyoyararlanımının artırılması ve kontrollü ilaç salımının sağlanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu et al., 2021). Son yıllarda ise doğal hücre dışı veziküller olan eksozomlar; biyoyuumlulukları, düşük immünojenisitetleri, biyolojik bariyerleri aşabilmeleri ve hedef hücrelere seçici taşınabilmeleri sayesinde ilaçların ve diğer bileşiklerin taşınmasında umut vadeden yeni nesil nanotaşıyıcılar arasında ön plana çıkmaktadır (Pegtel & Gould, 2019).

Bununla birlikte, hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinin etkinliğinin yanı sıra seçiciliğinin de artırılması amacıyla yüzey modifikasyonları kullanılmaktadır. Folik asit (FA) ile işaretleme, birçok kanser hücresinde folat reseptörü (FR), özellikle folat reseptörü- α (FR α), ekspresyonunun normal hücrelere kıyasla daha yüksek olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Folik asit ile fonksiyonelleştirilen ilaçlar ve ilaç taşıyıcı sistemler, folat reseptör aracılı endositoz yoluyla tümör hücreleri tarafından daha etkin şekilde içselleştirilmektedir. Böylece hücre içi ilaç birikimi artırılarak antikanser etkinlik güçlendirilirken sağlıklı dokular üzerindeki sistemik toksisite azaltılabilmektedir. Bu nedenle folik asitle hedeflendirme, özellikle eksozom temelli ilaç taşıyıcı sistemlerinin seçiciliğini ve kullanılan ilaçların terapötik etkinliğini artıran umut verici stratejilerden biri olarak değerlendirilmektedir (Low & Kularatne, 2009)

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın hipotezi; folik asit ile hedeflendirilmiş, karboplatin yüklü homotipik eksozomların TNBC hücrelerine seçici taşınarak karboplatin monoterapisine göre daha yüksek antikanser etkinlik oluşturacağı ve sağlıklı hücrelerde toksisiteyi azaltacağıdır. Bu tez çalışmasında, TNBC hücre hattından elde edilen ekstraselüler veziküllere karboplatin yüklenmiş, veziküller FA ile işaretlenmiş ve farklı hücresel parametreler değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, karboplatinin MDA-MB-231 kaynaklı ekstraselüler veziküllere yüklenmesi ve bu veziküllerin FA ile modifiye edilmesi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulguların, bu alandaki sınırlı literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Meme Kanseri Genel Bakış

Meme kanseri, meme dokusunun duktuslarını ve lobüllerini örten epitel hücrelerinin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan malign bir hastalıktır. Günümüzde küresel ölçekte kadınlarda en sık görülen malignite olmasıyla birlikte, aynı zamanda yine kadınlarda kanserle ilişkili mortalitenin en önemli nedenlerindendir (DSÖ, 2026).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, DSÖ) verilerine göre meme kanseri çoğunlukla kadınlarda görülmesine rağmen %0,5-1'i erkeklerde görülmektedir. 2022 yılında yaklaşık 2.3 milyon kadına meme kanseri tanısı konulmuş, meme kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık 670.000'i ise yaşamını yitirmiştir. Gelecek yıllarda gelişmiş ülkelerde her 12 kadından 1'inin meme kanseri teşhisi alacağı, her 71 kadından 1'inin ise hastalık sebebiyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (DSÖ, 2026). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan güncel analizlere göre, dünya genelinde her 20 kadından birinin yaşamı boyunca meme kanseri tanısı alma riski taşıdığı bildirilmektedir (IARC, 2026). Yeni teşhis edilen meme kanseri vaka sayısının ise %40'ın üzerine çıkarak yılda yaklaşık 3 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Arnold et al., 2022). Türkiye'de, 2022 verilerine göre yılda yaklaşık 25.000 yeni vaka görülmektedir (TKE, 2026). Her 18 kadından biri, yaşamı boyunca bu hastalığa yakalanma riski taşımaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2024). Bu nedenle meme kanserinde erken teşhis ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önemlidir.

Meme kanserinin etiyolojisi, çeşitli çevresel ve kalıtsal faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşime bağlıdır. Bu etkileşim hastalığın gelişimine katkıda bulunan genetik, çevresel, beslenme, hormonal ve kalıtsal unsurlar tarafından belirlenir. Risk faktörleri arasında önceden

tanılanmış meme kanseri öyküsü, ailede meme kanseri öyküsü, obezite, sigara ve/veya alkol kullanımı, erken menarş, geç menopoz, hareketsiz yaşam tarzı, hiç doğum yapmamış olmak ve hormon replasman tedavisi yer almaktadır. Meme kanseri riskini azaltan faktörler arasında çoklu doğum, emzirme öyküsü, fiziksel aktivite, sağlıklı beslenme, profilaktik cerrahi ve tıbbi müdahaleler bulunmaktadır (Admoun & Mayrovitz, 2022). Kalıtsal risk faktörleri arasında; tümör baskılayıcı genler (özellikle BRCA1, BRCA2, TP53, PALB2 ve CHEK2), apoptotik regülatörler (BAX, BCL-2, BCL-xL, Kaspaz 3, 6 ve 9), ROS sistemi (CAT, MDA), inflamatuvar belirteçler (IL-1 beta, IL-6 ve IL-10) ve mitokondriyel faktörler (PINK1 ve Parkin) gibi çeşitli medyatörler yer almaktadır (Walsh et al., 2006).

Meme kanseri heterojen yapıya sahip bir kanser türüdür (Hanahan, 2022). Bu nedenden dolayı farklı sınıflandırma tipleri kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmalar temelde histopatolojik, invazif etkinlik ve moleküler olarak 3'e ayrılır. Histopatolojik sınıflandırmada tümörün köken aldığı doku ve mikroskopik morfolojik özellikleri değerlendirilirken, invaziv sınıflandırmada tümör hücrelerinin bazal membranı aşarak çevre stromaya yayılım gösterip göstermediği esas alınmaktadır. Moleküler sınıflandırmada ise tümöre ait biyobelirteçlerin ekspresyon düzeyleri dikkate alınmaktadır (Benacka et al., 2022).

Meme kanserinde prognozun belirlenmesi hastalığın teşhisinde ki evresine bağlı olarak değişir. Erken evrede saptanan olgularda cerrahi tedaviye ek olarak uygulanan radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavi ve hedefe yönelik tedaviler sayesinde yüksek sağkalım oranlarına ulaşılabilmektedir. Ancak ileri evre ve metastatik meme kanserinde tedavi başarısı önemli ölçüde azalmakla birlikte ilaç direnci, tümör heterojenitesi ve metastatik profil, prognozu kötüleştirmektedir. Özellikle kemoterapi direnci ve tümör hücrelerinin invaziv özellik kazanması, meme kanserine bağlı mortalitenin temel nedenlerindendir (Pasi et al., 2026; Wei et al., 2026). Günümüzde, meme kanseri kaynaklı mortalitenin azaltılması için tümör kontrolünün sağlandığı, sağlıklı dokulardaki toksisitenin azaltıldığı, ilaç direncinin önlenmesi ve hastaların yaşam kalitesiyle birlikte genel sağkalım süresinin artırıldığı tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

2.2. Meme Kanseri Patofizyolojisi

Meme bezleri, 15–20 lob ve bunları oluşturan lobüller, sütü meme başına ileten duktuslar (süt kanalları) ile lenf düğümleri ve kan damarlarını çevreleyen stromal dokudan (yağ ve bağ dokusu) oluşmaktadır (Zucca-Matthes et al., 2016). Meme kanseri genel olarak meme

dokusundaki epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile ortaya çıkar (Gupta & Goyal, 2022) ve genellikle süt kanallarında veya lobüllerde başlar. Erken evrelerde metastaz göstermeyen tümörler genellikle iyi prognoza sahipken, invazif formdakiler çevre dokulara ve lenf sistemine metastaz yapabilir (Effiong et al., 2022). Bu yayılım, meme kanserine bağlı ölümlerin en önemli nedenidir ve hastalığın klinik seyrini belirleyen temel faktördür.

Meme kanserinin patofizyolojisi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz arasındaki dengenin bozulması ile başlamaktadır. Normal meme epitelinde hücre döngüsü kontrol edilirken, genetik ve epigenetik mutasyonların birikmesi sonucunda bu düzenleyici mekanizmalar işlevlerini kaybetmekte ve kontrolsüz hücre çoğalması ortaya çıkmaktadır. Bu işlev değişimleri esnasında hücreler tek bir mutasyonla değil, zaman içinde biriken moleküler değişikliklerin etkisiyle kademeli olarak malign özellik kazanmaktadır. Bu süreçte tekli mutasyonlar sayesinde proliferasyon avantajı sağlayan hücreler hızla çoğalarak farklı moleküler özelliklere sahip hücre popülasyonları oluştururlar. Bu tip hücrelerde gelişen mutasyonlara bağlı olarak farklı kanser alt tipleri meydana gelir.

Meme kanserinin gelişiminde rol alan farklı hücresel yollar ve moleküller bulunmaktadır. En sık değişime uğrayan proteinlerden biri PIK3CA mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar metastatik meme kanseri olgularının yaklaşık %20–35’inde görülmektedir (Reinhardt et al., 2022). PIK3CA, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda görev alarak hücre proliferasyonu, büyümesi ve hayatta kalmasının düzenlemektedir. PIK3CA mutasyonları en sık TNBC’nin luminal androjen reseptör alt tipinde (LAR) ve sınıflandırılmayan (%31,5) alt tiplerde saptanırken, mezenkimal (%10,5) ve BL (%5) alt tiplerinde daha düşük sıklıkta görülmektedir (Kumar et al., 2021). Ayrıca hem PIK3CA mutasyonuna sahip hem de HER2+ grubu meme kanserlerinde, tümör içi sızan lenfosit (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL) sayısının arttığı ve immün yanıtla ilişkili genlerin yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Y. He et al., 2018).

Büyük ölçekli sekanslama çalışmalarında, DNA hasarını onarmada görevli ve tümör baskılayıcı rol oynayan ATM, CHEK2, PALB2, BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BARD1 ve TP53 gibi genlerdeki varyantların meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dorling et al., 2021). Ayrıca bazı genetik varyantların belirli moleküler alt tiplerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Özellikle RAD51C, RAD51D, BARD1, BRCA1, BRCA2 ve PALB2 genleri TNBC ile güçlü ilişkilere sahiptir (Consortium et al., 2022).

Meme kanseri gelişimi ve progresyonunda rol oynayan tüm moleküler mekanizmalar birbirleriyle ilişkili sinyal yolları aracılığıyla düzenlenmektedir. Bunun sonucunda hücre homeostazisi bozulur ve bu bozulma enerji metabolizmasında hasara yol açar. Etkilenen mitokondriyal fonksiyonlar oksidatif stresi artırarak mitofajiye tetikler. Bu tetiklenmede kilit rol oynayan bazı önemli proteinler bulunmaktadır. PINK1, Parkin, BNIP3 ve NIX proteinlerindeki değişimler mitokondriyal hasarı ileri düzeylere taşır. Böylece intrinsik apoptotik yolak aktive olur ve TP53, BAX, BCL-2, BCL-XL, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gibi moleküller aktivasyonu ya da inaktivasyonu hücre ölümü gerçekleşir (Ceylan & Dönmez, 2025; Elmore, 2007).

2.2.1. Meme kanserinde TNM (Tümör-Nod-Metastaz) evrelemesi

Günümüzde meme kanseri dahil olmak üzere solid tümörlerin sınıflandırılması için kullanılan TNM evreleme sistemi ilk olarak 1942 yılında Pierre Denoix tarafından ortaya konmuştur. TNM evrelemesinde tümörün morfolojik özellikleri olan primer tümör boyutu (T), bölgesel lenf nodlarının tutulumu (N) ve uzak metastaz varlığı (M) gibi üç temel anatomik özellik değerlendirmeye alınmaktadır. 1987 yılında International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) birlikte tek tip TNM evreleme sistemi yayınladı. Meme kanser biyolojisindeki gelişmeler ve yeni klinik verilere göre TNM evreleme sistemi, UICC ve AJCC tarafından periyodik olarak düzenlenmektedir. Bu sistemde, T (tümör), primer tümörün invaziv bileşeninin en büyük çapına göre değerlendirilirken; N (nod), bölgesel lenf nodu tutulumunun klinik, görüntüleme ve patolojik bulgularla belirlenmesini kapsar. M (metastaz) ise tümörün uzak organlara yayılım durumunu ifade etmektedir. Klinik evreleme fiziksel muayene ve görüntüleme yöntemleri ile yapılırken, patolojik evreleme cerrahi materyalin histopatolojik incelemesine dayanmaktadır. Neoadjuvan tedavi uygulanan hastalarda ise tedavi öncesi ve sonrası evreleme ayrı ayrı değerlendirilerek tümör yükü dikkate alınmaktadır. TNM sistemi, tümörün anatomik yayılımını standart bir şekilde tanımlayarak hastaların prognozunu belirlenmesi, uygun tedavi yaklaşımının seçilmesi ve klinik çalışmalar arasında ortak bir dil oluşturulmasını sağlamaktadır (MEMİŞOĞLU, 2020; Teichgraeber et al., 2021).

Tablo 1. TNM evrelemesi

Sınıf	Alt Sınıf	Tanım
T	Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
	T0	Primer tümöre ait bulgu yok
	Tis	Karsinoma in situ (DCIS/Paget)
	T1	≤20 mm boyutunda tümörler (T1mi, T1a, T1b, T1c alt grupları)
	T2	>20–50 mm boyutunda tümörler
	T3	>50 mm boyutunda tümörler
	T4	Göğüs duvarı ve/veya deri invazyonu (T4a–d)
N	cNx	Lenf nodu değerlendirilemiyor
	cN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
	cN1	İpsilateral hareketli Seviye I–II aksiller lenf nodu metastazı
	cN2	Fikse aksiller veya internal mammarian lenf nodu metastazı
	cN3	İnfraklaviküler/supraklaviküler veya kombine lenf nodu metastazı
M	cM0	Uzak metastaz yok
	cM0(i+)	Sadece moleküler yöntemlerle saptanan izole tümör hücreleri
	cM1	Uzak metastaz mevcut

T, N ve M kategorilerinin kombinasyonu kullanılarak hastalar Evre 0, Evre I, Evre II, Evre III ve Evre IV olarak gruplandırılmaktadır. Yani Evre 0-IV gruplaması TNM evrelemesinin özeti olarak kabul edilmektedir (Stage et al., 2009).

Tablo 2. Meme kanseri sınıflandırmasında TNM evrelemesi ve evre gruplaması

Prognostik Evre	Primer Tümör (T)	Bölgesel Lenf Nodu (N)	Uzak Metastaz (M)
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T0	N1	M0
Evre IB	T1	N1	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
Evre IIA	T1	N1	M0
Evre IIA	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
Evre IIB	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
Evre IIIA	T1	N2	M0
Evre IIIA	T2	N2	M0
Evre IIIA	T3	N1	M0
Evre IIIA	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
Evre IIIB	T4	N1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırması

Meme kanseri, DSÖ'nün sınıflandırmasına göre, klinik ve patolojik değerlendirmede histopatolojik özellikleri, invazyon durumu, evresi ve moleküler özellikleri temel alınarak farklı sınıflandırma yaklaşımları ile değerlendirilmektedir (DSÖ, 2026). Bu sınıflandırmalar, tümörün biyolojik davranışını, hastalığın seyrini ve tedaviye verilen yanıtı öngörmeye önemli rol oynamaktadır (Watkins, 2019).

2.3.1. Meme kanserinin invazyon durumuna göre sınıflandırılması

Meme kanseri, tümör hücrelerinin invazyon durumuna göre ikiye ayrılır; non-invaziv (in situ) ve invaziv (infiltratif) meme kanseri. Bu sınıflandırmada önemli olan tümörün bazal membranı aşip aşmama durumudur. Uzak organlara yayılım gösteren olgular ise metastatik hastalık olarak değerlendirilerek invazif meme kanseri altında incelenmektedir (Rakha et al., 2023).

2.3.1.1. Non-invazif meme kanseri

Non-invaziv meme kanserlerinde tümör hücreleri bazal membranı geçmemiştir ve yalnızca köken aldıkları süt kanalı veya lobül ile sınırlıdır. Bu nedenle çevre meme dokusuna, lenf düğümlerine veya uzak organlara metastaz yapamazlar. Erken teşhis edildiğinde tedavi başarı oranları oldukça yüksektir ve prognozlar genellikle olumludur (Malhotra et al., 2010). Bu grubun en yaygın alt tipi olan Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS) süt kanallarını kaplayan epitel hücrelerinden kaynaklanarak bazal membranı geçmeden kanalda sınırlı kalır (Fabbri et al., 2008). Tarama mamografilerinin yaygınlaşması ile görülme sıklığı önemli ölçüde artmış olmasına rağmen erken müdahalelerle birlikte hastalarda oldukça yüksek sağkalım oranları elde edilmiştir (Bombonati & Sgroi, 2011). Noninvaziv grubun diğer bir alt tipi lobüler karsinoma in situ (LCIS)'dur. LCIS, süt üreten lobüllerde gelişen ve çevre dokulara invazyon göstermeyen anormal hücre proliferasyonu ile karakterizedir (Reed et al., 2015).

2.3.1.2. İnvazif meme kanseri

İnvaziv meme kanserlerinde ise tümör hücreleri bazal membranı aşarak çevre meme dokusuna yayılmıştır. Bu özellik, tümörün lenfatik sistem ve kan dolaşımı aracılığıyla bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle invaziv tümörlerde cerrahi tedavinin yanında kemoterapi, hormonoterapi, hedefe yönelik tedavi

ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler de sıklıkla uygulanmaktadır. İnvaziv meme kanserlerinin en yaygın alt tipi, spesifik olmayan invaziv karsinomdur (IBC-NST). Tümör süt kanallarından köken aldıktan sonra kanal duvarını aşarak çevre meme dokusuna invaze olur. Lenf düğümlerine ve kemik, akciğer, karaciğer ile beyin gibi uzak organlara metastaz yapabilme potansiyeline sahip olduğundan klinik açıdan önemli bir alt tiptir (Gallas et al., 2025). İnvaziv grubun ikinci en sık görülen alt tipi İnvazif Lobüler Karsinomadır (ILC). Lobüllerden köken alan bu tümör tipi, E-kaderin ekspresyon kaybına bağlı olarak hücrelerin birbirinden ayrık şekilde ve tek sıra (single-file) dizilim göstererek ilerlemesiyle karakterizedir (Christgen et al., 2021). İnvaziv meme kanserlerinin ilerleyen evrelerinde tümör hücreleri başlangıç bölgesinden ayrılarak kan veya lenf dolaşımı yoluyla kemik, akciğer, karaciğer ve beyin gibi uzak organlara yayılabilmektedir. Bu durum metastatik meme kanseri (Evre IV) olarak tanımlanır ve hastalığın en ileri evresini oluşturur (Jones, 2008)..

2.3.2. Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırması

Histopatolojik sınıflandırmada meme kanseri, tümörün köken aldığı hücre tipi ve morfolojik özelliklerine göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır. En yaygın histolojik tipler duktal ve lobüler karsinomlar, medüller, müsinöz ve tübüler karsinomlar daha nadir görülen özel alt tipler arasında yer almaktadır.

2.3.2.1. Duktal karsinoma in situ (DCIS)

DCIS, meme kanallarının lümeninde malign hücrelerin klonal proliferasyonu ile karakterizedir ve bazal membranı aşmaz ve çevre stromaya invazyon göstermez. Spesifik olmayan invaziv karsinomanın öncüsü kabul edilen bu lezyon, tarama mamografisinin yaygınlaşmasıyla birlikte daha sık tanı almaya başlamış ve moleküler çalışmalar DCIS ile invaziv meme kanseri arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Burstein et al., 2004).

2.3.2.2. İnvaziv lobüler karsinoma (ILC)

ILC, meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan ikinci en yaygın histolojik alt tiptir. Duktal karsinomlarla aynı hücre kökeninden geliştiği düşünülmese de farklı genetik yollara ve biyolojik özelliklere sahiptir. E-kaderin kaybına bağlı gelişen diskohezi ve

karakteristik tek sıralı tümör hücre dizilimi ILC'nin ayırt edici histolojik özellikleridir (Batra et al., 2023).

2.3.2.3. Modüller meme kanseri (MBC)

MBC tüm meme kanserlerinin yaklaşık %3–6'sını oluşturmaktadır. Büyük tümör hücreleri ve tümör stromasında yoğun lenfositik infiltrasyon ile karakterizedir (Zangouri et al., 2018).

2.3.2.4. Müsinöz karsinoma (MC)

MC, büyük miktarda hücre dışı müsin içermesiyle tanınır ve saf (PMC) ile karışık (MMC) olmak üzere iki alt tipe ayrılır. Tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %4'ünü oluşturur ve diğer histolojik tiplere göre daha iyi prognoz göstermektedir (Marrazzo et al., 2020).

2.3.2.5. Tübüler karsinoma

Tübüler karsinom ise spesifik olmayan invaziv karsinomanın bir formu olup tanı için tümörün %75'ten fazlasının tübüler yapılardan oluşması gerekmektedir. Tarama mamografisinde sıklıkla küçük ve düzensiz şekilli kitleler olarak saptanan bu tümörler, diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha olumlu prognoza sahiptir (Sheppard et al., 2000).

2.3.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması

Meme kanserinin klinik moleküler sınıflandırılması ER, PR ve HER2 ekspresyon durumuna dayanmaktadır (Orrantia-Borunda et al., 2022). ER, invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %80-90'ında yüksek düzeyde eksprese edilen önemli tanısal bir biyobelirteçtir (Rakha et al., 2010). PR ise çoğunlukla ER+ tümörlerde görülmekte ve ekspresyonu, genellikle, ER sinyal yoluna bağlı olarak düzenlenmektedir. Bu nedenle PR düzeyi, fonksiyonel ER aktivitesine dair dolaylı bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Wei, 2023). ER ve PR ekspresyonunun birlikte değerlendirilmesi, hem hastalığın biyolojik özellikleri hem de tedavi yanıtı hakkında bilgi sunmaktadır. Yapılan kohort çalışmalarda yüksek PR ekspresyonu genellikle daha iyi genel sağkalım, daha uzun nüks süresi ve olumlu tedavi yanıtı ile ilişkilendirilirken, düşük PR düzeylerinin daha agresif tümör fenotipi ve kötü prognoz ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Kwak et al., 2023; Purdie et al., 2014). HER2, meme

kanserlerinin yaklaşık %15–20’sinde aşırı eksprese edilmekte veya gen amplifikasyonu göstermektedir (Gonullu et al., 2023). HER2’nin pozitif olması, tümör hücrelerinde proliferasyonu artırır ve apoptozu baskılayan sinyal yollarının aktivasyonuna neden olarak agresif bir prognoza yol açar (Iqbal & Iqbal, 2014).

Tüm bu genetik heterojenite, meme kanserinin, moleküler düzeyde 4 ana gruba ayrılmasına neden olur; lüminal A, lüminal B, HER2 pozitif (HER2+) ve TNBC (Orrantia-Borunda et al., 2022). Her bir alt tipin kendine özgü klinik, moleküler ve prognostik özellikleri bulunmaktadır.

2.3.3.1. Lüminal A tipi

Lüminal A tümör tipleri, ER ve/veya PR pozitifliği ile birlikte HER2 negatif ve önemli bir proliferasyon belirteci olan Ki-67’nin düşük ekspresyonu ile karakterizedir. Bu alt tip, genellikle düşük histolojik dereceye sahiptir ve yavaş çoğalır. Ayrıca, lüminal tip A, diğer alt tiplere göre düşük nüks seviyeleri ve daha yüksek sağkalım ile en iyi prognoza sahip meme kanseri grubunu oluşturur (Gao & Swain, 2018). Tedavi açısından değerlendirildiğinde ise lüminal A tipi, hormon tedavilerine belirgin düzeyde yanıt verirken, kemoterapi tedavilerinde yanıt kısıtlıdır (Ignatiadis & Sotiriou, 2013).

2.3.3.2. Lüminal B tipi

Lüminal B tümörleri, lüminal A alt tipine kıyasla daha agresiftir. Bu tümörler genellikle ER+ olmakla birlikte PR- ya da düşük PR ekspresyonuna sahip olabilir. Ayrıca Ki-67 proliferasyon indeksinin yüksek olması bu alt tipin daha yüksek proliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Creighton, 2012). Lüminal B tümörleri hem hormon hem de kemoterapi ile tedavi edilebilir. Ancak yüksek Ki-67 düzeyleri, tümörün daha hızlı büyümesine ve yavaş iyileşme göstermesine yol açabilmektedir (Tran & Bedard, 2011).

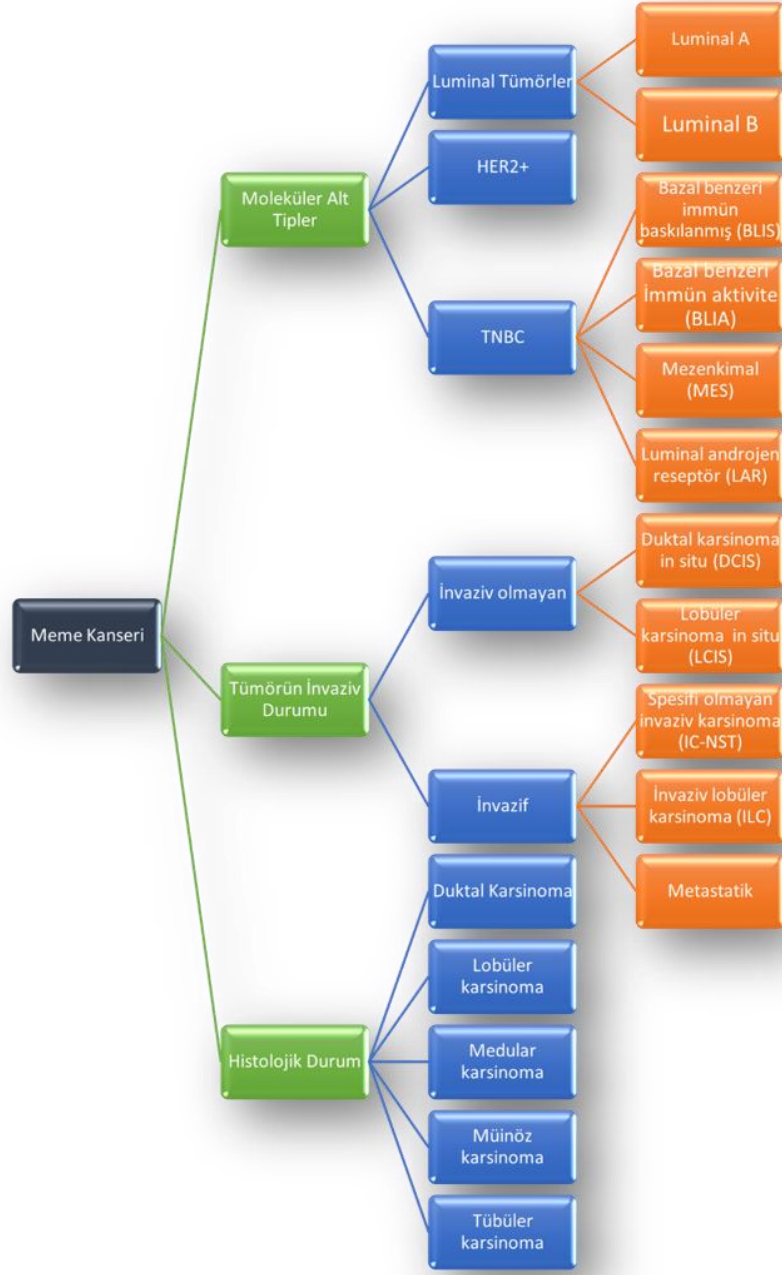
2.3.3.3. HER2+

HER2+ meme kanseri alt tipi neredeyse tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır (Vaz-Luis et al., 2013). Genellikle ER ve PR negatifliği ile birlikte yüksek düzeyde HER2 ekspresyonu ile karakterizedir. Bu tümörler, lüminal alt tiplere kıyasla daha hızlı proliferasyon gösterir ve daha agresif bir klinik seyre sahiptir. Ancak HER2 hedefli

tedavilerin klinik uygulamalara entegre edilmesiyle birlikte bu grubun prognozunda ciddi iyileşmeler sağlanmıştır (Liang et al., 2024; Prat et al., 2017).

2.3.3.4. TNBC

TNBC, östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonunun yokluğu ve HER2 aşırı ekspresyonu veya gen amplifikasyonunun olmaması ile karakterize edilir. Meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur ve en kötü prognoza sahiptir (Zagami & Carey, 2022). TNBC, tek tip bir hastalık olmayıp kendi içinde heterojen bir yapıya sahiptir. TNBC olgularının büyük çoğunluğu histopatolojik olarak özel tipte olmayan invaziv karsinom (IC-NST) alt tipinde sınıflandırılırken gen ekspresyon profillemesi çalışmaları sonucunda moleküler olarak TNBC'nin 6 farklı alt tipi olduğu tespit edilmiştir. Bunlar; bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve lüminal androjen reseptörüdür (LAR). TNBC alt tipleri arasında BL1, hücre döngüsü ve DNA hasar yanıtı genlerinin yüksek ekspresyonu ile karakterize edilirken, kemoterapiye karşı daha duyarlı bir profil sergiler. BL2 alt tipi büyüme faktörü sinyal yolları ve metabolik süreçlerle ilişkilidir. M ve MSL alt tipleri hücre migrasyonu, diferansiyasyon ve stromal etkileşimlerle bağlantılı mezenkimal özellikler gösterirken, IM alt tipi immün yanıt genlerinin aktivasyonu ile dikkat çeker. LAR alt tipi ise androjen reseptörünün ve ilişkili sinyal yollarının baskın olduğu, hormon ilişkili bir moleküler profil sunmaktadır. Bununla birlikte, sonraki çalışmalar IM ve MSL alt tiplerinin büyük ölçüde tümör mikroçevresine ait immün ve stromal hücrelerden kaynaklanan gen ekspresyonlarını yansıttığını ortaya koymuş ve bu nedenle TNBC sınıflandırmasını tümör hücresine özgü dört ana alt tipe indirgenmiştir: BL1, BL2, M ve LAR (Lehmann et al., 2011). Daha güncel yaklaşımlar ise TNBC'yi klinik açıdan daha anlamlı alt gruplara ayırarak LAR (lüminal androjen reseptörü), MES (mezenkimal), BLIS (bazal benzeri immün baskılanmış) ve BLIA (bazal benzeri immün aktive) olmak üzere dört ana moleküler alt tip tanımlamıştır (Burstein et al., 2015). Bu sınıflamada özellikle immün mikroçevre belirleyici bir rol oynamakta olup, TIL varlığı ile karakterize edilen BLIA alt tipi daha iyi prognoz ile ilişkilendirilirken, immün yanıtın baskılandığı BLIS alt tipi en kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (Tong et al., 2023). TNBC gen ekspresyon profiline dayalı olarak farklı biyolojik davranışlar sergileyen heterojen bir alt tiptir. Bu moleküler heterojenite hastalığın prognozu ve tedaviye yanıtı üzerinde belirleyici rol oynamaktadır.



Şekil 1. Meme kanserinin histolojik durumu, invaziv etkinliği ve moleküler alt tiplerine göre sınıflandırılması. Moleküler sınıflamada östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyon durumuna göre lüminal A, lüminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) alt tipleri yer almaktadır. TNBC, kendi içerisinde BLIS (bazal benzeri immün baskılanmış), Bazal benzeri immün aktivite (BLIA), MES (mezenkimal) ve LAR (lüminal androjen reseptörü) moleküler alt tiplerine ayrılmaktadır. Tümörler ayrıca lokalizasyonlarına göre in situ, invaziv ve metastatik olarak; en sık görülen histolojik tiplerine göre ise duktal, lobüler, medüller, müsinöz ve tübüler karsinom şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma, tümör biyolojisi, prognoz ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Puligundla & Annamaneni, 2024).

2.4. Meme Kanserinde Tedavi

Meme kanserinin tedavisinde kanser kitlesinin metastaz yapıp yapmadığı göz önünde bulundurularak uygun tedavi rejimi hastaya göre uygulanır. Tedavi metastatik olmayan kanser

türünde cerrahi işlemi ile yapılan mastektomi birinci basamağı oluştururken metastatik kanser durumlarında ise radyoterapi ve kemoterapi tedavi rejiminin ilk basamağını oluşturmaktadır. Genel olarak meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi, neoadjuvan ve adjuvan tedaviyi içeren multidisipliner bir yaklaşım kullanılmaktadır. Meme kanserinde etkili tedavi, hastalar için iyi bir yaşam kalitesi sağlamak amacıyla, minimum yan etki ve maksimum terapötik etkinliği gerektirir. Uygun terapötik kombinasyonlar, hastalarda maksimum fayda sağlama fırsatı sunarken, nüksü, direnci ve toksik etkileri en aza indirir veya ortadan kaldırır (Fisusi & Akala, 2019).

2.4.1. Mastektomi

Mastektomi, meme dokusunun cerrahi olarak kesilip çıkarılmasıyla uygulanan bir tedavi seçeneğidir. Mastektomi özellikle, BRCA1/2 mutasyonlarına sahip olan ya da ailesinde meme kanseri öyküsü olan kişilerde kanseri önlemek amacıyla gerçekleştirilir. Mastektomi alınan dokuya bağlı olarak total mastektomi, deri koruyucu mastektomi ve meme başı ve areola koruyucu mastektomi olmak üzere üçe ayrılır. Total mastektomi, meme dokusunu, areola kompleksini ve göğüs duvarındaki fazla deriyi çıkarır; yalnızca kesiği kapatmak için yeterli deri bırakır. Deri koruyucu mastektomi, meme parankimini ve areola kompleksini çıkarır, deriyi doğal bir zarf olarak bırakır. Areola koruyucu mastektomi ise deri zarfına ek olarak meme başı areola kompleksini de korur (Cicio et al., 2025; Moo et al., 2018).

2.4.2. Radyoterapi

Meme kanserinde ameliyat öncesi radyoterapi, rutin uygulamadan ziyade klinik çalışmalar kapsamında değerlendirilmektedir. Özellikle ilaçla tedaviye yetersiz yanıt veren veya başlangıçta cerrahi olarak kesip çıkarılamayan ilerlemiş kanser olgularında, tümör boyutunu küçülterek cerrahi uygulanabilirliği artırmak için kullanılabilir. Mevcut çalışmalarda radyoterapi güvenli bir alan olarak gösterilmesine rağmen, dozlama, zamanlama ve kullanılan antikanser ilaçlarla kombinasyon stratejilerinin belirlenmesi önemlidir (Zamagni et al., 2025).

2.4.3. Kemoterapi

Kemoterapi, lenf nodu pozitif olan veya tümör çapı 1 cm'den büyük olan kadınlarda standart tedavi yöntemlerinden biridir. Hormon reseptörü negatif hastalar, pozitif olan hastalara kıyasla kemoterapiden daha fazla fayda görmektedir. Ayrıca yaş gibi etkin faktörler de

kemoterapi kullanımına karar verilmesinde etkilidir (Maughan et al., 2010). Çoğu çalışma, özellikle HER2 aşırı ekspresyonu gösteren tümörlere sahip kadınlarda, antrasiklin veya taksan içeren tedavilerin diğer kemoterapi rejimlerine göre daha faydalı olduğunu göstermektedir (Group, 2005; Pritchard et al., 2006). Bu doğrultuda kemoterapi, tümörün biyolojik özellikleri ve hastaya ait klinik faktörler göz önünde bulundurularak planlanmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde farklı etki mekanizmalarına sahip çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar arasında antrasiklinler, taksanlar, vinka alkaloidleri, kapesitabin, eribulin, gemsitabin ve platin tuzları gibi birçok kemoterapötik ajan bulunmaktadır (Andreopoulou & Sparano, 2013).

2.4.4. Hormon tedavisi

Hormon tedavisinde kullanılan seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM), seçici östrojen reseptör downregülatörleri (SERD) ve aromataz inhibitörleri östrojen sinyal yollarını farklı mekanizmalarla baskılayarak özellikle hormon reseptörü pozitif (HR+) meme kanserinde tümör proliferasyonunu azaltmayı hedeflemektedir. SERM'ler, östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen etkisini baskılar ve HR+ meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Bu grupta tamoksifen ve toremifen yer almaktadır (Dutertre & Smith, 2000). SERD'ler östrojen reseptörünü bloke edip yıkarak etkisiz hale getirir. Bu gruptaki fulvestrant, metastatik HR+ meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Howell et al., 2000). Aromataz inhibitörleri, periferik dokularda östrojen sentezini azaltarak özellikle menapoz sonrası HR+ meme kanserinde tercih edilmektedir (Augusto, 2021).

2.4.5. İmmünoterapi

Meme kanserinde geliştirilen immünoterapötik yaklaşımlar arasında aşılar, monoklonal antikorlar ve kontrol noktası inhibitörleri gibi klinik olarak kullanımı yaygın yeni nesil teknolojiler bulunmaktadır. Meme kanseri aşıları; DNA, peptit ve hücre bazlı aşılar ile viral veya bakteriyel vektörler kullanılarak tümör antijenlerine karşı bağışıklık yanıtı oluşturmaya amaçlanmaktadır (Burke et al., 2019; Santos-Carballal et al., 2018). Monoklonal antikorlar ise bu alanda umut verici klinik sonuçlar doğurmaktadır. Bu antikorlar tümör hücrelerinde proliferasyon ve anjiyogeneze görev alan sinyal yollarını inhibe etmekte, antikora bağımlı hücrel sitotoksikite oluşturarak antitümör etki göstermektedir (Şakalar et al., 2013). Meme kanseri tiplerinde yaygın olan HER2+ alt tipi için kullanılan trastuzumab, HER2 reseptörüne bağlanarak hücre döngüsünü G1 fazında durdurur. Ancak bazı durumlarda trastuzumab direnci

gelişebilir. Bu durumda pertuzumab ve lapatinib gibi ajanlarla kombinasyon tedavileri uygulanabilmektedir (Nahta & Esteva, 2006). Ayrıca PI3K/AKT/mTOR yolak inhibitörleri de direnç gelişimine karşı kullanılmaktadır. mTOR inhibitörü Everolimus ve AKT inhibitörü Capivasertib bu gruba örnek ilaçlardır (Nierengarten, 2024; Royce & Osman, 2015). Kontrol noktası inhibitörleri ise PD-1/PD-L1 ve CTLA-4 etkileşimlerini bloke ederek T hücre aracılı antitümör bağışıklık yanıtını artırır. Meme kanserinde kullanılan başlıca kontrol noktası inhibitörleri atezolizumab, pembrolizumab, avelumab, tremelimumab ve ipilimumab'dır (Kahveci & Türkoğlu, 2019; Sabatier et al., 2014).

Tablo 3. Meme kanserinde kullanılan tedaviler

Tedavi Tipi	Hedef Kanser Tipi	Etki Mekanizması	Tedavide Kullanılan Yöntemler/Ajanlar
Cerrahi	Erken ve lokalize meme kanseri	Primer tümörün uzaklaştırılması	Lumpektomi, mastektomi
Radyoterapi	Cerrahi sonrası lokal kontrol	DNA hasarı oluşturarak hücre ölümünü tetikler	Radyasyon
Kemoterapi	Erken evre ve metastaz durumu	Hızlı bölünen hücrelerin baskılanması	Doksorubisin, Paklitaksel, Sisplatin, Karboplatin
Hormon Tedavisi	ER+/PR+ meme kanseri	Östrojenin baskılanması	Tamoksifen, Letrozol, Fulvestrant
HER2 Hedefli Tedaviler	HER2+ meme kanseri	HER2 sinyal yolunun baskılanması	Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib

Tablo 4. Devamı

PARP İnhibitörleri		BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu olan meme kanserleri	DNA onarımının baskılanması	hasar	Olaparib, Talazoparib
İmmünoterapi		PD-L1+ olguları	TNBC	PD-1/PD-L1 yolağının baskılanması	Pembrolizumab, Atezolizumab
PI3K/AKT/mTOR Tedaviler	Hedefli	PIK3CA mutasyonlu meme kanseri	Hücre büyümesi ve proliferasyonunun baskılanması		Alpelisib, Everolimus
Antikor-İlaç (ADC)	Konjugatları	Metastatik HER2+ ve TNBC	Hedefli sitotoksik taşıyımını	yönelik ilaç	Trastuzumab deruxtecán, Sacituzumab govitecan
Nanoteknolojik Sistemleri	İlaç Taşıma	Deneysel çalışmalar	Hedefli ilaç salımı ve biyoyararlanım artışı		Lipozomlar, nanopartiküller, eksozomlar polimerik miseller,

2.5. TNBC’de Kullanılan Kemoterapi Ajanları

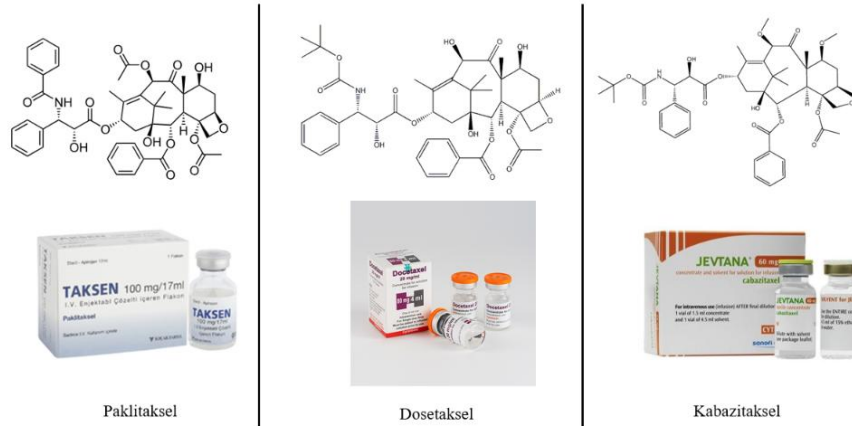
TNBC'de tedavi seçenekleri, hastalığın evresi, tümörün biyolojik özellikleri ve hastaya ait klinik faktörlere göre belirlenmektedir. Hedeflenebilir moleküler belirteçlerin sınırlı olması nedeniyle TNBC tedavisinin temelini sitotoksik kemoterapi oluşturmaktadır. Sitotoksik kemoterapi olarak özellikle taksan, antrasiklin, siklofosfamid ve platin bazlı ajanlar ile bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (Zhang et al., 2023). Klinik uygulamalarında hastadan alınan doku ve kan örnekleri laboratuvarında histopatolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmesinden sonra tanı ve TNM evrelemesi gerçekleştirilmektedir.

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) kılavuzlarına göre TNBC'de kullanılan başlıca sistemik kemoterapi rejimleri; Docetaxel ve Siklofosfamid (TC), Docetaxel, Doxorubisin ve Siklofosfamid (TAC), Doxorubisin ve Siklofosfamid (AC), Siklofosfamid, Metotreksat ve Florourasil (CMF), Siklofosfamid, Doxorubisin ve Florourasil (CAF) ile Siklofosfamid, Epirubisin, Florourasil ve Paklitaksel/Docetaxel (CEF-T) kombinasyonlarını içermektedir (Bou Zerdan et al., 2022).

2.5.1. Taksanlar

Taksanlar, mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül dinamiklerini ve mitozu bozar, hücre bölünmesini durdurur ve anjiyogenezi baskılayarak antitümör etkinlik gösterir (Mosca et al., 2021). Klinik kullanımda başlıca paklitaksel, dosetaksel ve kabazitaksel yer almaktadır (Reddy & Bazile, 2014). TNBC'de tek başına veya antrasiklinlerle kombine kullanıldıklarında diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla daha yüksek patolojik tam yanıt oranları sağlayabildikleri bildirilmiştir (Khan et al., 2022). Ayrıca metastatik TNBC'de nab-paklitaksel ile karboplatin kombinasyonunun, diğer kemoterapi kombinasyonlarına kıyasla daha uzun progresyonsuz sağkalım sağladığı bildirilmiştir (Yardley et al., 2018).

Taksan tedavisiyle birlikte, hastalarda yaygın olarak nörotoksisite gözlemlenebilmektedir. Nöropati, taksanların doz sınırlayıcı yan etkisidir ve paklitaksel ile tedavi edilen hastaların %97'sinde görülür. Merkezi sinir sisteminde oluşan nörotoksisite, taksanların yeni tespit edilen bir yan etkisidir. Bilişsel bozukluk ve ensefalopati ile karakterizedir. Oluşan bu toksisiteler hastanın yaşam kalitesini uzun vadede olumsuz etkileyebilir. Klinik önemine rağmen, taksanların terapötik olarak kullanıldığında ortaya çıkan nörotoksisiteyi kapsamlı bir şekilde ele alan çok az inceleme bulunmaktadır (da Costa et al., 2020). Bu nedenle TNBC tedavisinde taksan rejimleri özellikle kombinasyon tedavilerde her ne kadar antikanser etkinliği yüksek olsa dahi uzun süreli ve sık dozlamalar sonucu zorlayıcı bir nöropatiye ve ilgili hastalıklara yol açabilir.

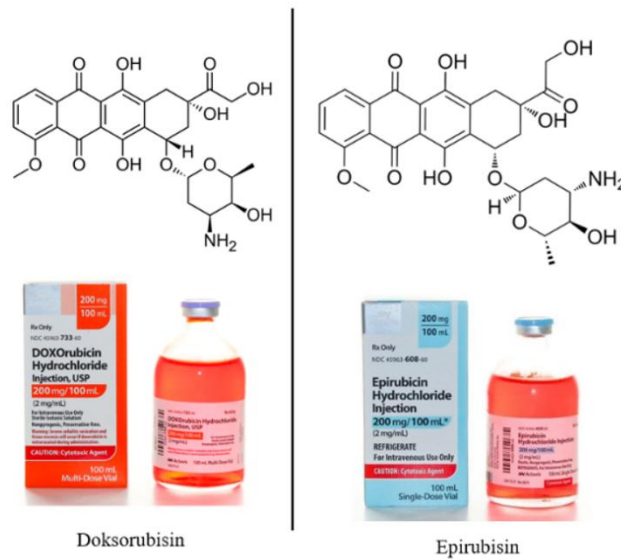


Şekil 2. Taksan türevleri ve piyasadaki müstahzarları.

2.5.2. Antrasiklinler

Genellikle taksanlarla birlikte kullanılan bu ajanlar, yalnızca DNA çift zincirleri arasına yerleşerek hasara neden olmakla kalmaz, aynı zamanda CD8⁺ T hücrelerini aktive ederek antitümör immün yanıtı destekler (Yadav et al., 2014). Doksorubisin ve epirubisinin hem neoadjuvan hem de adjuvan tedavide yanıt oranlarını ve sağkalımı artırdıkları gösterilmiştir (Lee et al., 2020). Neoadjuvan çalışmalarda TNBC ve bazal benzeri meme kanserinin (BLBC), antrasiklin bazlı kemoterapi rejimlerine genel olarak yüksek duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, fluorourasil, epirubisin ve siklofosfamid (FEC) rejiminin değerlendirildiği bir çalışmada, TNBC hastalarında yüksek pCR oranı (%44) saptanmıştır. Ancak BRCA1 mutasyonuna sahip TNBC'li küçük bir hasta grubunda (n=14) daha düşük pCR oranı (%17) ve antrasiklinlere karşı direnç gözlenmiştir. Buna ek olarak, antrasiklin bazlı rejimlerin siklofosfamid, metotreksat ve fluorourasil (CMF) rejimi ile karşılaştırıldığı çalışmalarda, TNBC hastalarında antrasiklin tedavisiyle nüks riskinin %23 oranında azaldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise CMF ile siklofosfamid, epirubisin ve fluorourasil (CEF) rejimleri karşılaştırılmış; BLBC hastalarında CMF tedavisi alan grupta daha yüksek 5 yıllık hastalıksız sağkalım oranı bildirilmiştir.

Antrasiklinlerin TNBC'de etkinliğine karşın, tolere edilemez kardiyotoksik etkileri nedeniyle yeniden kullanımı sınırlı olabilir. Miyelotoksisite, alopesi, bulantı, kusma ve daha yüksek nüks riski gibi yan etkiler de antrasiklinlerin klinik kullanımını kısıtlayan önemli dezavantajlar arasında yer almaktadır (Johnson & Keyes, 2024).



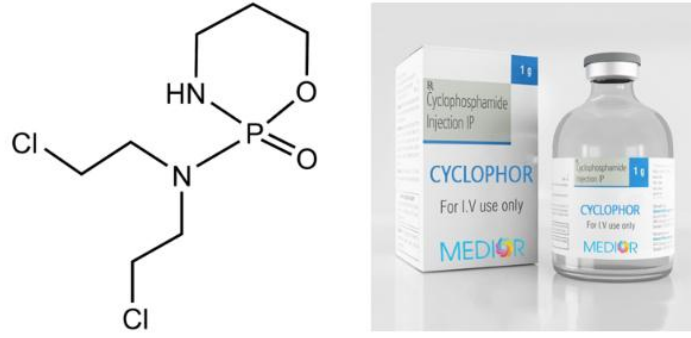
Şekil 3. Antrasiklin türevleri ve piyasadaki müstahzarları.

2.5.3. Siklofosfamid

Siklofosfamidin temel antitümör etkisi, alkilliyici metabolitlerinin DNA'da çapraz bağlar oluşturmaya dayanmaktadır (Awwad & North, 1988). Dosetaksel ile kombine edilen siklofosfamid, TNBC için standart adjuvan kemoterapilerden biri olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kapesitabin, epirubisin ve siklofosfamid kombinasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, TNBC hastalarında önemli bir tedavi yanıtının görüldüğü bildirilmiştir (Yokoyama et al., 2020).

Hematolojik malignitelerde siklofosfamid (C) bazlı kök hücre nakillerinin klinik başarısı, bu ilacın kanser hücrelerine karşı bağışıklık sistemini yeniden düzenleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (McCurdy & Luznik, 2019). Benzer şekilde, siklofosfamid, klinik etkinliği artırmak amacıyla CAR-T hücre infüzyonundan önce uygulanmaktadır (Bouchkouj et al., 2019). Yapılan çalışmalarda düşük dozda günlük uygulanan siklofosfamidin vinorelbin (V) ile kombinasyonunun, meme kanseri ve lenfoma modellerinde immün kontrol noktası inhibitörlerinin (anti-PD-1 ve anti-PD-L1) preklinik etkinliğini artırabildiği gösterilmiştir (Orecchioni et al., 2018). Son yıllarda gerçekleştirilen randomize klinik çalışmalarda ise, immün kontrol noktası inhibitörlerinin taksanlar (T), doksorubisin (D) veya platin (P) gibi kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının, TNBC hastalarında klinik fayda sağlayabileceği ortaya konulmuştur (Falvo et al., 2021).

Siklofosfamidin kullanımına bağlı gelişen ve mesanenin iç yüzeyinin aniden iltihaplanması ve buna bağlı olarak idrarda gözle görülür kanama meydana gelmesi durumu olarak bilinen hemorajik sistit, idrar kesesi mukozasının ürotelyumuna zarar veren, doz sınırlayıcı bir yan etkidir. Siklofosfamid kaynaklı sistit, idrarda şiddetli yanma/acı ve kanamaya yol açar. Bu nedenle uzun süreli tekrarlanan kullanımı ikincil kanserlere (örneğin, mesane) neden olabilir. Bu sebeple antikanser etkinliği güçlü olsa dahi kullanımı hakkında endişeler güncelliğini korumaktadır (Gore et al., 2016).



Şekil 4. Siklofosfamidin kimyasal yapısı ve piyasadaki müstahzarı.

2.5.4. Platin ajanlar

Platin bazlı ilaçlar ilk olarak cisplatinin keşfiyle ortaya çıkmıştır. 1960'lı yıllarda Michigan Üniversitesi'nde çalışan Barnett Rosenberg ve ekibi bakteriler üzerinde elektrik alanlarının etkisini araştırırken tesadüfen platinlerin canlılık üzerindeki etkinliğini keşfetmiştir. Platin elektrotlarla yapılan bu deneylerde bakterilerin normal bölünemeyip olağanüstü şekilde uzadığı gözlemlenmiş, daha sonra bu etkinin elektrik alanından değil elektrotlardan açığa çıkan platin bileşiklerinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Rosenberg et al., 1965). Bu keşif, cisplatinin geliştirilmesine ve modern platin bazlı kemoterapilerin temelini atılmasına öncülük etmiştir. Daha sonra 3000'den fazla platin grubu keşfedilmiş fakat oksaliplatin, nedaplatin, lobaplatin, heptaplatin, karboplatin ticarileştirilmiştir (Wheate et al., 2010).

Platinlerin antikanser etkinliği, hücre içine alındıktan sonra düşük klorür konsantrasyonuna sahip hücre içi ortamda hidrolize uğrayarak aktif forma dönüşür. Oluşan bu aktif kompleksler, DNA, RNA ve proteinler gibi hücre içindeki nükleofilik biyomoleküllerle etkileşime girebilmektedir. Bununla birlikte, platin türevlerinin başlıca sitotoksik hedefinin DNA olduğu kabul edilmektedir. Platin kompleksleri DNA'ya bağlanırken, özellikle guanin ve adenin bazlarının imidazol halkasındaki N7 atomunu hedef alır. Bu etkileşim sonucunda DNA'da üç temel lezyon tipi meydana gelir: monoadduktlar (ana gruba tek bir molekülün bağlanması), zincir içi çapraz bağlar ve zincirler arası çapraz bağlar. İlk aşamada, aktif platin kompleksinin bir su molekülünü kaybetmesiyle monoadduktlar oluşur. Ancak bu monoadduktların %90'dan fazlası daha sonra ikinci bir nükleotitle reaksiyona girerek çapraz bağlara dönüşmektedir. DNA'daki bu bağlantılar replikasyonu engeller. Bölünme gerçekleşmediği için apoptoz aktive olur ve hücre ölüme sürüklenir (Rabik & Dolan, 2007).

Oksaliplatin, eş molar konsantrasyonlarda sisplatinin kıyasla daha az sayıda DNA çapraz bağı oluşturmaya rağmen benzer düzeyde antitümör etkinlik göstermektedir. Ayrıca, her iki ajanın DNA'da benzer sayıda tek zincir ve çift zincir kırığı oluşturabildiği bildirilmiştir. Günümüzde oksaliplatin, mide, pankreas, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin tedavisinde klinik denemelerde kullanılmaktadır (Wheate et al., 2010).

Nedaplatin (cis -diamminglikolatoplatin(II)), cisplatin'e kıyasla daha iyi bir toksisite profiline ve cisplatin'e benzer farmakokinetik özelliklere sahiptir (Kuwahara et al., 2010). Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), baş, boyun ve özofagus kanseri tedavisi için bölgesel onayı sınırlıdır (Japonya) (Wheate et al., 2010).

Diğer üçüncü nesil ilaçlar arasında lobaplatin ve heptaplatin yalnızca bölgesel onay almıştır. Lobaplatin, Çin'de metastatik meme kanseri, kronik miyelojenik lösemi ve SCLC tedavisi için onaylanmıştır (Wheate et al., 2010). Doz sınırlayıcı toksisitesi trombositopenidir. Heptaplatin, daha büyük bir amin ligandına sahiptir, ancak yapısal olarak lobaplatin ile benzerdir. İlacın çözeltide stabil olduğu, belirgin bir toksisiteye sahip olmadığı ve sisplatin dirençli hücre hatlarında sitotoksik aktiviteyi koruduğu gösterilmiştir. Heptaplatin şu anda Kore Cumhuriyeti'nde mide kanseri tedavisi için kullanılmaktadır (Wheate et al., 2010).

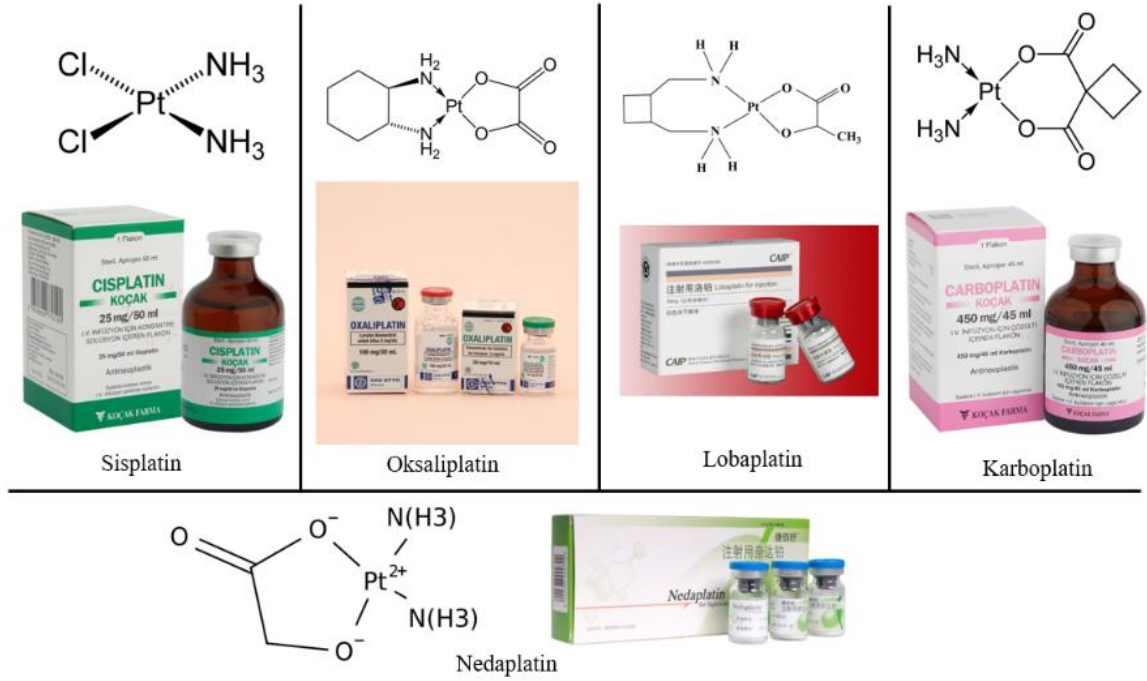
İkinci nesil platin bazlı bir ilaç olan karboplatin (cis- diammin(1,1-siklobütan dikarboksilato), sisplatinin doz sınırlayıcı toksisitesini azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Karboplatinin etki mekanizması sisplatininkine benzerdir. Bununla birlikte, karboplatin, ikili siklobütan dikarboksilat ligandı nedeniyle daha düşük bir hidroliz oranına sahiptir (Calvert et al., 1982). Hidrolizinin düşük olması nedeniyle, karboplatin tedavisi sonrası nörotoksisite ve ototoksisite daha az görülmektedir. Azaltılmış toksisite profili nedeniyle, karboplatin daha agresif yüksek doz kemoterapi için uygundur. Bu ilaç dünya çapında kabul görmüş ve yumurtalık kanseri tedavisinde paklitaksel ile kombinasyon rejimlerinde sisplatinin yerini neredeyse almıştır (Ozols et al., 2003). Karboplatinin testis germ hücreli kanserlerine, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomuna ve mesane kanserine karşı etkinliği sınırlıdır. Sonuç olarak, bu hastalıkların tedavisinde tercih edilen ilaç hala sisplatindir (Stewart, 2007).

Platin türevlerinin ortak etki mekanizması ve farklı toksisite profilleri, bu ajanların çeşitli kanser türlerinde kullanımını mümkün kılmıştır. Özellikle DNA onarım mekanizmalarında hasarla karakterize TNBC'de platin bazlı kemoterapilerin etkinliği son

yıllarda gerçekleştirilen çok sayıda klinik çalışma ile ortaya konmuştur. Metastatik üçlü negatif meme kanserli (mTNBC) hastalarda platin monoterapisinin etkinliğini değerlendiren Faz II bir klinik çalışmada (TBCRC009), genel hasta popülasyonunda objektif yanıt oranı (ORR) %25,6 olarak bildirilmiştir. Buna karşın, kalıtsal BRCA1/2 mutasyonu taşıyan hastalarda ise yanıt oranı %54,5'e yükselmiştir. Bu bulgular, BRCA1/2 mutasyonu bulunan hastaların platin bazlı tedavilerden daha fazla yarar görebileceğini düşündürmüştür (Isakoff et al., 2015).

İleri evre TNBC hastalarında gerçekleştirilen Faz III çalışmasında, germ hattı BRCA1/2 mutasyonu taşıyan ve düşük BRCA ekspresyonu gösteren hastalarda karboplatin ile dosetaksel karşılaştırılmıştır. Tüm hasta grubunda objektif yanıt oranı (%31,4'e karşı %34,0), ortalama sağkalım (3,1 aya karşı 4,4 ay) ve genel sağkalım (12,8 aya karşı 12,0 ay) açısından iki tedavi arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak kalıtsal BRCA1/2 mutasyonu bulunan alt grupta karboplatin, dosetaksele kıyasla belirgin üstünlük göstermiş ve objektif yanıt oranı sırasıyla %68,0 ve %33,3 olarak bulunmuştur ($p=0,01$). Ek olarak karboplatin ile tedavi edilen hastalarda progresyonsuz sağkalım sürelerinin uzadığı verilerce gösterilmiştir (6,8 aya karşı 4,4 ay). Bu sonuçlar, BRCA mutasyonlu hastalarda karboplatinin diğer kemoterapötiklere göre üstünlüğün olduğunu ortaya koymaktadır (Tutt et al., 2018). Metastatik olmayan TNBC hastalarında gerçekleştirilen GeparSixto Faz II çalışmasında (NCT01426880), standart neoadjuvan tedaviye karboplatin eklenmesi, özellikle TNBC hastalarında patolojik tam yanıt (pCR) oranını anlamlı düzeyde artırmıştır (%53,2'ye karşı %36,9; $p=0,005$). Oysa HER2 pozitif hastalarda karboplatinin pCR üzerine anlamlı bir katkısı gösterilememiştir (Von Minckwitz et al., 2014). İleri evre TNBC'li 190 hastayı kapsayan bir prospektif çalışmada, neoadjuvan karboplatin + dosetaksel (CbD) tedavisi ile %55 patolojik tam yanıt oranı elde edilmiştir. Tedaviye verilen yanıt, BRCA1/2 mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastalarda benzer bulunmuştur. Ayrıca rejimin iyi tolere edildiği ve ciddi yan etkilerin kabul edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, karboplatin ve dosetaksel kombinasyonunun TNBC'de etkili ve güvenli bir neoadjuvan tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir (Sharma et al., 2017).

Genel olarak bu çalışmalar, platin bazlı kemoterapinin özellikle erken evre TNBC'de neoadjuvan tedavi kapsamında patolojik tam yanıt oranlarını artırdığını, BRCA1/2 mutasyonu bulunan metastatik TNBC hastalarında ise klinik yanıtı ve progresyonsuz sağkalımı iyileştirdiğini göstermektedir. Ayrıca, homolog rekombinasyon eksikliği gösteren ve düşük ekspresyonlu BRCA fenotipine sahip bazı hastaların da platin tedavisinden fayda görebileceği bildirilmektedir.



Şekil 5. Platin türevleri ve piyasadaki müstahzarları.

2.5.4.1. Karboplatin ve antikanser etki mekanizması

Karboplatin, platin bazlı antikanser ilaçlar arasında yer alan ikinci nesil bir kemoterapötik ajan olup, sisplatinin toksisitesini azaltma amacıyla sentezlenmiştir. Sisplatin başta olmak üzere diğer platin türevlerine (oksaliplatin, nedaplatin, lobaplatin ve heptaplatin) kıyasla daha düşük toksisite profiline sahip olması nedeniyle klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (McWhinney et al., 2009). Karboplatin, baş ve boyun, endometriyum, özofagus, mesane ve servikal kanser, merkezi sinir sistemi tümörleri ve osteojenik sarkom dahil olmak üzere birçok kanser türü için de kullanılmaktadır (Fuentes et al., 2003). Hematolojik ve uzun vadeli toksisitesinin olmaması, çocukluk çağı kanseri için birçok tedavi rejiminde de faydalı olmasını sağlar.

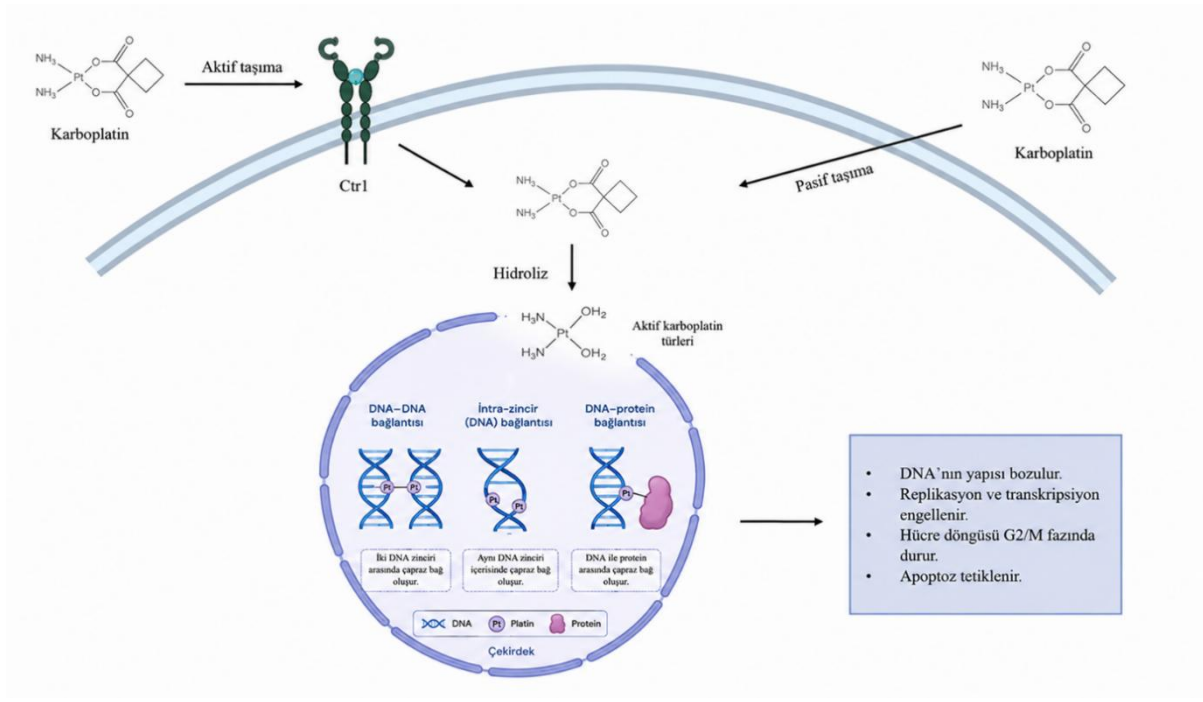
Karboplatinin vücuttan eliminasyonu büyük ölçüde renal yolla gerçekleşmektedir. Uygulanan toplam platin miktarının yaklaşık %50–75'i, ilk 24 saatlik süreç içerisinde biyotransformasyona uğramadan, değişmemiş formda idrarla atılmaktadır. Sisplatinden farklı olarak karboplatinin eliminasyonunda, renal tübül sekresyon mekanizmasının anlamlı bir katkısı bulunmamaktadır. Karboplatin temel olarak glomerüler filtrasyon yoluyla temizlenmektedir. Bu nedenle böbrekte toksisite oluşturma ihtimali sisplatine oranla daha düşüktür. Serbest platinin toplam vücut klerensi, uygulanan doz aralığına bağlı olarak 75–147

mL/dk arasında değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle, karboplatinin toksisite profili sisplatine göre daha elverişlidir. Şiddetli nefrotoksisite nadir görölmekte olup, yalnızca bazı hastalarda böbrek fonksiyonlarında geri dönüşümlü bozulmalar bildirilmiştir. Gastrointestinal yan etkiler görölebilmekle birlikte, bulantı ve kusmanın şiddeti sisplatine kıyasla daha düşüktür.

Karboplatin, sisplatin ile aynı temel etki mekanizmasına sahip olmasına rağmen daha düşük toksisite profili ve daha iyi tolere edilebilirliği sayesinde klinik uygulamada önemli bir alternatif olarak öne çıkmıştır. Karboplatindeki 1,1-siklobütandikarboksilat ayrılan grubunun, sisplatindeki klorür ligandlarına kıyasla daha yavaş hidrolize olması ilacın DNA ile reaktif platin komplekslerini daha kontrollü bir şekilde oluşturmasını sağlamaktadır. Bu durum nefrotoksisite, nörotoksisite ve gastrointestinal toksisite gibi istenmeyen etkilerin azalmasına katkıda bulunurken, antitümör etkinliğinin korunmasına olanak tanımaktadır (Hah et al., 2006).

Karboplatinin temel doz sınırlayıcı toksisitesi doza bağımlı miyelosüpresyonu ve trombositlerin azalması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Akyuvar ve alyuvar sayılarında azalma görölebilmekle birlikte, genellikle trombosit azalmasına göre daha hafif seyretmektedir.

Karboplatinin etki mekanizması hücre içine girdikten sonra 1,1-siklobütandikarboksilat grubunun hidroliziyle aktif hale gelmesi ve pozitif yüklü ara ürünler oluşturmasıyla başlar. Daha sonra DNA, RNA ve proteinler gibi hücresel nükleotit eğilimli maddelerle etkileşime girer (McWhinney et al., 2009). Asıl antitümör etkisini ise DNA'nın pürin bazlarının N7 bölgelerine kovalent olarak bağlanarak gösterir. Bu etkileşim sonucunda DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları oluşur ve DNA'nın normal yapısı bozulur. Özellikle zincirler arası çapraz bağlar, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu ciddi şekilde engelleyerek hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına ve apoptozun tetiklenmesine neden olur (Amptoulach & Tsavaris, 2011).



Şekil 6. Karboplatinin hücre içine alınması, aktivasyonu ve DNA üzerindeki etki mekanizması. Karboplatin hücre içine başlıca CTR1 taşıyıcısı aracılığıyla aktif taşıma ve kısmen pasif difüzyon yoluyla alınır. Hücre içinde 1,1-siklobütandikarboksilat grubunun hidrolizi ile reaktif platin türleri oluşur ve bu aktif metabolitler DNA'nın pürin bazlarının (özellikle guanin N7 pozisyonu) ile kovalent bağlanarak DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları oluşturur. Bu yapısal hasar DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu inhibe ederek hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına ve apoptoza yol açar.

Bu tez çalışmasında, normal hücrelerde karboplatin toksisitesinin azaltılması, ilaç direnci mekanizmalarının aşılması ve tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla, karboplatin ile yüklenmiş MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomların folik asit (FA) ile aktif hedeflendirilmesi gerçekleştirilmiştir (Truva atı yaklaşımı). Oluşturulan FA-EXO-KP kompleksinin mitokondri kaynaklı disfonksiyon, oksidatif hasar, sitokin düzeyleri ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, kompleksin hazırlanmasında MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomlar kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomların, köken aldıkları tümör hücrelerine karşı Truva atı etkisi göstererek karboplatinin hücre içi birikimini artırması beklenmektedir. Ayrıca, eksozom yüzeyinin FA ile işaretlenmesiyle, TNBC hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen folat reseptörlerine bağlanarak eksozomların hücreler tarafından alımının artırılması hedeflenmiştir.

2.5.5. İlaç direnç mekanizmaları

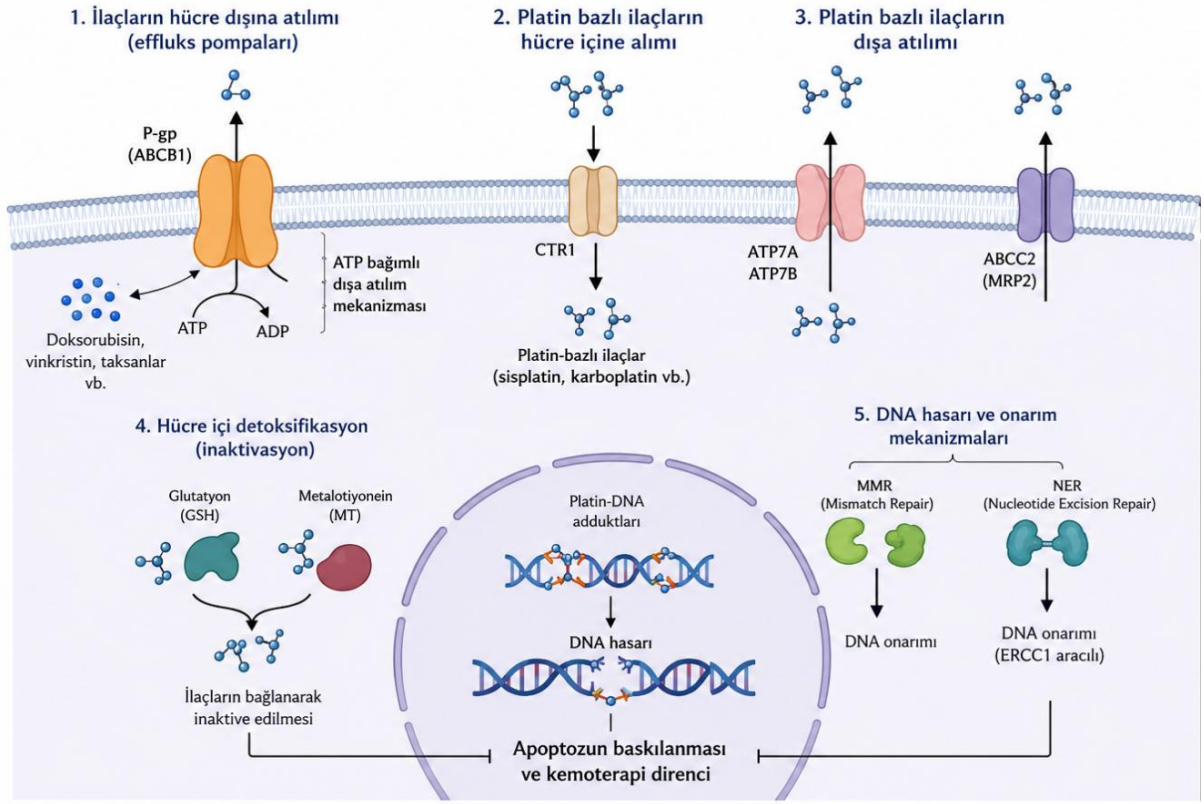
TNBC için kullanılan taksanlar, antrasiklinler, siklofosfamid ve platin ilaçlarının etkili olmalarının yanı sıra kanser hücreleri tarafından bu ilaçlara karşı direnç mekanizmaları

geliştirilebilir. Antikanser ilaçlara karşı direnç çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Bunlar arasında hastalardaki bireysel çeşitlilik ve tümör heterojenitesi sayılabilir. Hatta aynı doku kökenli tümörlerde bile genetik farklılıklar gözlemlenebilir. Yani aynı tür kanser içinde farklı direnç mekanizmalarına sahip kanser hücreleri var olabilir (Gottesman, 2002). Direnç sıklıkla kansere özgüdür, ancak tedavi etkinliği arttıkça, edinilmiş direnç de yaygınlaşır. Çeşitli antikanser ilaçlara karşı direnç oluşumunun en yaygın nedeni, antikanser ilaçları algılayarak hücre dışına atan bir veya daha fazla enerjiye bağımlı taşıyıcıların ekspresyonudur (Perez-Tomas, 2006).

Kanser hücreleri, çeşitli mekanizmalarla ilaç direncini geliştirebilir. Bunlar arasında ilacın hücre içine girişinin azalması, hücre dışına atılımının artması, ilaçların detoksifikasyonu, DNA hasarının daha etkin onarılması ve apoptozun baskılanması yer alır. Özellikle yapısal olarak farklı birçok ilaca karşı aynı anda direnç gelişmesi “çoklu ilaç direnci” olarak tanımlanır (Gottesman et al., 1994). Bu durumda hücreler, ilaç birikimini azaltan taşıyıcı sistemleri aktive ederek veya hücre ölüm mekanizmalarını engelleyerek kemoterapötik ajanların etkilerini azaltabilirler. Kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin en önemli mekanizmalarından biri, P-glikoprotein (P-gp) olarak adlandırılan ATP bağımlı ilaç dışı atım pompasının aşırı ekspresyonudur. MDR1 geni tarafından kodlanan bu taşıyıcı, birçok kanser türünde bulunmakta ve kemoterapötik ajanların hücre içinde yeterli düzeyde birikmesini engelleyerek tedavi etkinliğini azaltmaktadır (Chen et al., 1986).

P-gp, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesinin bir üyesidir. İki tane ATP bağlayıcı bölge ve ilaç taşınmasından sorumlu transmembran bölgelerden oluşan bir fosfolipoproteindir (Chen et al., 1986). Platin bazlı ilaçlarda da hücre içi ilaç birikimi tedavi başarısını belirleyen önemli faktörlerden biridir. Geçmişte platin bileşiklerinin hücre içine yalnızca pasif difüzyon yoluyla girdiği düşünülse de günümüzde bu sürecin çeşitli taşıyıcı proteinler ve endositik mekanizmalar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Özellikle CTR1 platin ilaçlarının hücre içine alınmasında önemli rol oynarken, ATP7A, ATP7B ve ABCC2 gibi taşıyıcılar ilacın hücre

dışına atılmasına katkıda bulunmaktadır. Hücreler glutatyon ve metalotiyeinein gibi moleküller aracılığıyla platin bileşiklerini etkisiz hale getirebilmektedir.



Şekil 7. Kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin temel moleküler mekanizmaları. Şekilde, antikanser ilaçların hücre içine alınması, hücre içi detoksifikasyon süreçleri, DNA hasarı ve DNA onarım mekanizmaları ile ilaçların hücre dışına atılımını içeren direnç yollarını şematik olarak gösterilmektedir. P-glikoprotein (P-gp) gibi ATP-bağımlı pompalar, doksorubisin, vinkristin ve taksanlar gibi kemoterapötik ajanları hücre dışına atarak hücre içi ilaç birikimini azaltır. Platin bazlı ilaçların hücre içine alımı CTR1 aracılı taşıma ile gerçekleşirken, ATP7A/ATP7B ve ABCC2 gibi taşıyıcılar ilacın dışa atılımına katkı sağlar. Hücre içinde glutatyon ve metalotiyeinein aracılı detoksifikasyon platin bileşiklerini inaktive eder. DNA düzeyinde oluşan hasar ise MMR ve NER sistemleri tarafından onarılabilir. Özellikle ERCC1 aracılı NER aktivitesi platin direnci ile ilişkilidir. Bu süreçlerin tamamı apoptozun baskılanmasına ve tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı direnç kazanmasına yol açmaktadır.

2.6. TNBC’de Etkinliğin ve Seçiciliğin Arttırılması için Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Son yıllarda moleküler biyoloji, genomik, proteomik ve biyoinformatik alanlarında kaydedilen gelişmeler, meme kanserinin moleküler mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak anlaşılmasını sağlamıştır. Bu gelişmeler doğrultusunda, tümör hücrelerini hedefleyen kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri, immünoterapiler, PARP inhibitörleri, antikor-ilaç konjugatları (ADC'ler), yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemleri ve nanoteknoloji tabanlı yaklaşımlar geliştirilmiştir (Loo et al., 2022; Tong et al., 2018). Günümüzde meme kanseri tedavisinde temel amaç, tümör kontrolünü sağlarken sağlıklı dokularda oluşabilecek toksisiteyi en aza indirmek, ilaç direncini önlemek ve hastaların yaşam kalitesiyle birlikte genel sağkalım süresini

artırmaktır. Bu nedenle TNBC gibi agresif alt tipler başta olmak üzere tüm meme kanserlerinin moleküler patogenezinin ayrıntılı olarak aydınlatılması ve yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi, daha etkili ve güvenli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

TNBC, başta hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve yüksek metastaz, kemoterapiye direnç gibi etmenler nedeniyle tedavisi zor bir alt tiptir. Bu nedenle son yıllarda, kemoterapötik ajanların etkinliğini artırırken sağlıklı dokular üzerindeki toksik etkilerini azaltmayı amaçlayan biyoteknolojik yaklaşımlar araştırılmaktadır. Özellikle nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler ve aktif hedeflendirme stratejileri, terapötik ajanların tümör dokusunda seçici olarak birikmesini sağlayarak tedavide başarı oranını artırdığı bilinmektedir (Cengiz & Sezer, 2024). Bu kapsamda, liposomlar, nanopartiküller, polimerik miseller ve eksozomlar gibi nano taşıyıcı sistemlerin ilaçların spesifik taşınmasında rolü büyüktür (Tüylek, 2017). İlaç taşıyıcı sistemler dışında hedeflendirme stratejileri de son yıllarda araştırılan konular arasındadır. İlaçların direkt hedeflendirilmesi gibi çalışmalara ek olarak, taşıyıcı sistemlerinde yüzeyleri fonksiyonelleştirilebilir (Yardley et al., 2018). Bu bağlamda özellikle kanser hücreleri tarafından aşırı eksprese edildiği bilinen folat reseptörünün hedeflenmesi çalışmalara ışık tutmaktadır (Hartmann et al., 2007). Bu biyoteknolojik stratejiler, ilaç direncinin azaltılması, kontrollü ilaç salımının sağlanması ve sistemik yan etkilerin en aza indirilmesi açısından günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır.

2.6.1. İlaç taşıyıcı sistemler

21. yüzyılda biyoteknolojideki önemli ilerlemelerle birlikte etkili ilaç tasarımı konusunda büyük adımlar atılmıştır. İlacın yalnızca hastalıklı bölgede etkili olmasını amaçlayan ilaç hedefleme yaklaşımı, aktif maddenin kimyasal yapısından ve uygulama yolundan bağımsız olarak belirli doku veya organlarda birikebilme özelliği olarak tanımlanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin hedef bölgeye ulaştırılmasını sağlayarak terapötik etkinliği artırırken yan ve toksik etkileri, doz tekrarlarını azaltır ve ilacın vücuttan atılmasını yavaşlatır (Danckwerts & Fassihi, 1991; Zhang et al., 2008). Bu nedenle hedeflendirilmiş nano taşıyıcıların kullanımı nanotıp alanının en önemli araştırma konularından biri hâline gelmiştir. Bu sistemler ilgili bölgeye ulaştıklarında organ, doku ve hücre düzeyinde alımı artırır. Hatta bu nano taşıyıcıların aktif veya pasif hedeflendirmeleri sağlanarak seçici taşınım gerçekleştirilir (Tüylek, 2017). Aktif hedeflendirme sistemlerinde, peptitler veya monoklonal antikorlar gibi ligandlar kullanılmaktadır. Aktif hedeflendirme ilacın

kanser hücrelerine alımını hızlandırırken ilacın daha hızlı hücreye ulaşmasını ve stabilitesini artırmaktadır (Tüylek, 2017).

Lipozomlar, boyutları nanometre ile birkaç mikrometre arasında değişen, fosfolipit çift tabakalı yapısı da, biyolojik olarak uyumlu, immünolojik etkisiz ve yeniden kullanılabilen kesecikli sistemlerdir. İlaç yapımında büyük öneme sahip olan lipozomlar, çok yönlü olmaları ve tedavi etkisini artırmaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Silindir et al., 2013). Lipozomlar sayesinde, ilacın, çözünürlüğünün ve vücutta emiliminin azalmasının yanı sıra kısa süreli etkisi ve güçlü yan etkileri gibi sorunlar büyük ölçüde çözülmüştür. Şu anda ilaç uzmanları, ilacın zararlı etkilerini ve toksisitesini azaltmak için lipozomları kullanmaktadır. Lipozomlar, tümörlü dokularda damararası geçişi artırma özelliğine sahip olduğundan kanser tedavisinde tercih edilmektedir (Manish & Vimukta, 2011).

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen sentetik ya da doğal polimerlerle hazırlanmış materyallerdir. İlgili madde (ilaç, peptit, genetik materyal gibi) bu nanopartiküllerin içerisinde çözündürülebilir, saklanabilir veya yüzeye sabitlenebilir. Nanopartiküllerin iki ana avantajı vardır. Bunlardan birincisi, küçük boyutlara sahip olmalarıdır. Böylece aktif maddenin hedef alana ulaşması sabitlenir. İkincisi ise, nanopartiküllerin çoğunlukla biyoçözünür yapıda olmasıdır. Bu özellikleri sayesinde ilgili maddelerin uzun bir süre boyunca kontrollü şekilde salınımı gerçekleştirilebilir. Ayrıca, nanopartiküllere paketlenen ilgili maddelerin stabilizasyon süresi artmış olur. Bu durum ilgili maddenin etkinliğinin iyileşmesine ve yan etkilerinin azalmasına olanak sağlamaktadır (Derman et al., 2013).

Nanokapsüller, veziküle edilmiş sistemlerdir. İlgili madde, bir boşluğa yerleştirildikten sonra polimer bir membranla çevrilir. Bu sistem, biyomalzemedan yapılan kılıf ve yağlı iç çekirdekten oluşan bir membran özelliğine sahiptir. Damarlardan kolay geçebilme ve sistemik dolaşıma kolay karışma özellikleri bulunmaktadır (Singh & Lillard Jr, 2009). Ayrıca bu taşıyıcı sistemlere, ilgili maddenin PEG gibi hidrofilik moleküllerle bağlanması, dolaşımda daha uzun süre etki göstermesine yol açabilir. Nanokapsüller bir maddeyle değil, birden fazla etken maddeyle işaretlenerek, aynı anda çoklu hedeflemeye ulaşabilirler. Günümüzde miseller ve dendrimerler ilaç taşıyıcı sistemler arasında kullanılan önemli nanokapsüllerdir (Derman et al., 2013).

Miseller, morfolojik olarak hidrofobik uç ve hidrofilik başlardan oluşan küresel nano veziküllerdir. Miseller, düşük çözünürlükteki aktif maddeleri çözünür hale getirerek biyoyararlanımı artırır. Vücutta yeterli miktarda uzun süre kalabilmek, hedeflenen bölgeye etken maddenin ulaşmasını sağlamak gibi görevlerinin yanı sıra, kan damarları çok ince olan bölgelerde ilaçların birikmesine de olanak tanır (Tüylek, 2017).

Dendrimerler, küre şeklinde ve birbirini tekrar eden simetrik dallanmış yapıdaki geniş molekül yapılarıdır. İç içe geçen yapısı, reaktif edilebilen uç grupları ve dallar arasında çeşitli moleküllerin eklenebilmesi gibi ön plana çıkan özelliklere sahiptir. Fonksiyonel grupların eklenmesiyle dendrimerlerin çeşitliliği artırılabilir. Dendrimerler, ilaçların dendritik yapı içinde taşınmasını sağlayarak, kovalent bağlarla veya ilaçların fonksiyonel gruplarıyla etkileşime girerek taşıyıcı görev görürler (Bulut & Akar, 2012).

Taşıyıcı sistemler, yüksek biyoyararlanım, kontrollü salım, hedeflendirilmiş taşınım ve azaltılmış yan etkiler gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Fung & Saltzman, 1997). Ayrıca terapötik ve görüntüleme ajanlarını aynı anda taşıyabilmeleri, yüzey modifikasyonlarına uygun olmaları ve farklı biyolojik yapılara hedeflendirilebilmeleri nedeniyle son zamanlarda çalışmalarda sıklıkla yer alırlar. Ancak tolere edilebilir de olsa bazı dezavantajları bulunmaktadır. Agregasyon eğilimleri, hedef bölgeye ulaşmadan ilaç salımı yapabilmeleri gibi dezavantajları bazı moleküllerin yüklenmesinde güçlükler yol açabilmektedir (Dash & Cudworth II, 1998).

2.6.1.1. Eksozomlar

Eksozomlar, farklı hücre tipleri tarafından doğal olarak üretilen, biyolojik ve patolojik süreçlerde görev alan, çeşitli biyomoleküller içeren nano boyutlu (30–100 nm) hücre dışı veziküllerdir. Yapılarında proteinler, lipitler, mRNA, mikroRNA (miRNA) ve DNA gibi hücreler arası iletişimde rol oynayan önemli moleküller bulunmaktadır. Endozomal kökenli bu veziküller, multiveziküler cisimciklerin plazma membranı ile birleşmesi sonucunda hücre dışı ortama salınmakta ve taşıdıkları moleküler yükleri hedef hücrelere aktararak hücreler arası haberleşmede önemli görevler üstlenmektedirler. Eksozomlar hedef hücrelerle membran füzyonu, endositoz veya reseptör aracılı etkileşimler yoluyla birleşebilmekte ve içeriklerinde bulunan molekülleri hücre içersine aktarabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde doku homeostazının korunması, immün yanıtların düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, farklılaşma

ve hücre göçü gibi çok sayıda fizyolojik süreçte rol oynarlar (McKelvey et al., 2015; Pegtel & Gould, 2019).

Son yıllarda eksozomlar özellikle kanser biyolojisi alanında yoğun ilgi görmektedir. Kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, tümör mikroçevresinin şekillendirilmesinde, anjiyogenezis süreçlerinin desteklenmesinde, metastaz için altyapı oluşumunda ve immün kaçış mekanizmalarının düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir. Bunun yanı sıra eksozomların kaynaklandıkları hücrelere özgü proteinler, nükleik asitler ve diğer biyobelirteçleri taşıyabilmeleri, onları sıvı biyopsi uygulamalarında umut verici tanısal ve prognostik araçlar haline getirmiştir. Kanser hastalarının kan, idrar, tükürük ve diğer biyolojik sıvılarından elde edilen eksozomların analiz edilmesiyle tümörün moleküler özellikleri hakkında bilgi edinilebilir ve hastalığın seyri takip edilebilir (Kalluri, 2016).

Eksozomların doğal biyolojik özellikleri yalnızca tanı yöntemleri için kısıtlı değildir. Aynı zamanda ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarına yönelik ilgi son zamanlarda artmıştır. Geleneksel nanopartikül sistemlerine kıyasla yüksek biyoyumluluk göstermeleri, düşük immünojenisiteye sahip olmaları ve kan-beyin bariyeri gibi biyolojik bariyerleri etkin şekilde aşabilmeleri nedeniyle son yıllarda yoğun şekilde araştırılmaktadır. Ayrıca kaynaklandıkları hücrelerden gelen özgün yüzey proteinlerini korumaları sayesinde belirli dokulara yönelme potansiyeli gösterir ve taşıdıkları moleküllerin hedef dokulara iletilmesinde avantaj sağlar. Bu özellikleri sayesinde eksozomlar kanser çalışmalarında kemoterapötik ajanların, proteinlerin ve RNA tiplerinin taşınmasında uygun aday haline gelmiştir (Gutierrez-Millan et al., 2021).

Eksozomların ilaç taşıyıcı sistem olarak sundukları avantajlar çeşitli başlıklar altında değerlendirilebilir. İlk olarak, nano boyutlarda olmaları nedeniyle nanopartikül sınıfında yer alır. Özellikle molekül ağırlığı düşük olan ilaçların taşınmasında etkilidir. Küçük boyutları sayesinde dolaşım sisteminde daha kolay hareket edebilmekte ve bazı biyolojik bariyerleri aşabilmektedirler (Alvarez-Erviti et al., 2011). İkinci olarak, hücresel kökenli olmaları nedeniyle yüksek biyoyumluluk ve stabilite göstermektedirler. Hücre zarına benzer yapıları sayesinde stabilizasyon süreleri uzundur. Üçüncü olarak, eksozomlar çift katmanlı lipid membran yapısına sahiptir. Bu yapı, taşınan moleküllerin enzimatik yıkımdan korunmasına ve hem hidrofilik hem de hidrofobik özellik gösteren terapötik ajanların yüklenmesine katkı sağlamaktadır. Lipit çift tabakası aynı zamanda dolaşım sırasında ilaçların stabilitesini artırarak kontrollü salınımına olanak sağlar (Wang et al., 2024). Dördüncü olarak ise geniş yüzey alanına

sahip oldukları için yüzeyleri fonksiyonelleştirebilir. Bu özellik sayesinde peptitler, antikorlar, aptamerler veya diğer biyolojik ligandlar eksozom yüzeyine bağlanabilmekte ve hedef hücrelere yönelik aktif hedeflendirme stratejileri geliştirilebilmektedir (Gutierrez-Millan et al., 2021).

Tez çalışmamda yukarıdaki bilgileri değerlendirmek için kanser kaynaklı eksozomları Truva atı gibi kullanarak ilaç taşıma özelliği yanı sıra kanserin direnç mekanizmalarından gizlenerek hücre merkezine etkin bir şekilde antikanser ilacının taşınmasını hedeflemekteyiz.

2.6.2. Folik asit ile akıllı hedeflendirme stratejileri

Günümüzde tümör hedefli tedavilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar temel olarak iki farklı strateji üzerine yoğunlaşmıştır. Birincisi, malign hücrelerde ortaya çıkan veya aşırı eksprese edilen protein ve sinyal yollarının seçici olarak baskılanmasını amaçlamaktadır. Örneğin, BCR-ABL1 füzyon proteinini hedefleyerek kanser proliferasyonunu inhibe eden imatinib (Buchdunger et al., 2002). İkinci strateji ise ağırlıklı olarak malign hücrelerde eksprese edilen reseptörlere özgül bağlanabilen hedefleyici ligandların kullanılmasını içermektedir. Terapötik bir ilaca bağlanan bu ligandlar, seçici olmayan ilaçların doğrudan kanser hücrelerine taşınmasını sağlamaktadır. Özellikle bu tür ilaçların kullanımı, hedef reseptöre sahip olmayan antikanser ilaçların tümöre özgü hale getirilmesine olanak sağlamaktadır (Xia & Low, 2010). 2.strateji TNBC’de en tercih edilen yöntemdir. Son yıllarda bu amaç doğrultusunda yaygın olarak folat reseptörü alfa (FOLR1) hedef alınmaktadır. Folat, hücre metabolizmasının gerekli bir bileşenidir. FOLR1’in aşırı ekspresyonu, folat alımını artırarak tümörlere büyüme avantajı sağlayabilir ve/veya alternatif hücre sinyal yolları aracılığıyla hücre proliferasyonunu etkileyebilir (Kelemen, 2006). FOLR1 seviyelerinin, yumurtalık, meme, beyin, akciğer ve kolorektal kanserler de dahil olmak üzere normal dokuya kıyasla epitel kökenli tümörlerde yüksek olduğu bulunmuştur (Bagnoli et al., 2000; Parker et al., 2005). Bugüne kadar, kanserde folat reseptörüne odaklanmanın büyük bir kısmı yumurtalık kanserine yönelmiştir. Ancak meme kanserinde yapılan çeşitli çalışmalar, FOLR1’in primer meme kanserlerinde de önemli bir terapötik hedef olabileceğini öne sürmektedir. 2007 yılında Hartmann ve çalışma arkadaşları, FOLR1’in yoğun aşırı ekspresyonu ile meme kanserinin erken nüksü arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ilk kez bildirmişlerdir (Hartmann et al., 2007). O zamandan beri, iki laboratuvar, FOLR1 ekspresyonunun üçlü negatif ve ER negatif alt tiplerle önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar sunmuştur (O’Shannessy et al., 2012; Zhang et al., 2014). Bu

Çalışmaların daha geniş klinik popölasyonlarla ve FOLR1 ekspresyonunun ölölölmesine yölnelik ek teknik yölntemlerle bağımsız olarak doğırulanması, meme kanseri alt tiplerinde FOLR1 aşırı ekspresyonunun boyutunu ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini anlamada faydalı bilgiler sağılayacaktır.

Folik asit, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen folat reseptörlerine bağılanabilmesi nedeniyle hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemlerinde en yaygın kullanılan ligandlardan biridir. Folat reseptörleri özellikle over, akciğıer, meme, böbrek ve endometrium kanserleri gibi birçok malignitede normal dokulara kıyasla yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Buna karşılık, oğıu sağılıklı dokuda folat reseptörü ekspresyonunun sınırlı olması, seçici hedeflendirmede folik asit kullanımını ön plana çıkarmaktadır. Folik asitin küçük molekül yapısı, yüksek stabilitesi ve düşük maliyeti nedeniyle hedeflendirme ligandları arasında önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca folik asit ile reseptör arasındaki afinitenin yüksek olması hedef hücrelere etkin taşınmayı desteklemektedir. Bu özellikler sayesinde folik asit hem terapötik ajanların hem de görüntölleme amaçlı moleküllerin tümör dokusuna seçici olarak yölendirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Low et al., 2008; Parker et al., 2005; Ross et al., 1994).

Folat reseptörü aracılı hedeflendirme mekanizması reseptör aracılı endositoz prensibine dayanmaktadır. Bu yaklaşımla birlikte ilacın tümör hücrelerinde birikimi artırılırken sağılıklı dokuların ilaca maruziyeti azaltılabilmektedir. Böylece tedavi etkinliğı yükselir ve sistemik toksisite önemli ölçüde azalır (Ahmadi et al., 2024).

Folik asit hedeflendirmesinin ilk uygulamalarından biri kemoterapötik ajanların folik asit ile konjuge edilmesidir. Bu amaçla mitomisin C, kamptotesin, tubulisin ve maytansin türevleri gibi güçlü sitotoksik ajanlar folik aside bağılanarak geliştirilmiştir. Bu konjugatların yüksek folat reseptörü ekspresyonu gösteren tümör hücrelerinde kullanılmasının, sitotoksik aktiviteyi artırdığı ve sağılıklı hücrelerde daha düşük toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Leamon et al., 2007; Li et al., 2009; Yang et al., 2007).

Son yıllarda doğıal biyoyumlulukları, düşük immünojenisite göstermeleri ve biyolojik bariyerleri aşabilme yetenekleri nedeniyle eksozomlar da folat hedefli ilaç taşıma sistemleri arasında öne çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda folik asit ile modifiye edilen eksozomların tümör hücrelerine seçici olarak yölendirilebildiğı, tümör dokusunda daha yüksek düzeyde biriktiğı ve terapötik ajanların hücre içine alımını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca folik asit konjuge

eksozomlara yüklenen antikanser ilaçların tümör baskılama etkinliğini artırırken hedef dışı toksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (Feng et al., 2021; Pourmasoumi et al., 2024).

Bu tez çalışmasında, folik asit ve eksozom yapıları birlikte kullanılarak kemoterapötik ajanın taşınması ve aktif hedeflendirilmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde yüksek hedefleme afinitesi, düşük toksisite ve artırılmış tedavi etkinliği elde edilmesi hedeflenmiştir.

Şekil 8. Tez çalışmasına ait grafiksel özet. **Adım 1:** Eksozom izolasyonu. **Adım 2:** İn vitro uygulama.



3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada MDA-MB-231 TNBC hücre hattı ve karşılaştırma hücre hattı olarak fare fibroblast L929 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin temini Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalından (Bilecik, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Azot tankında kriyotüpler içerisinde stoklanmış hücreler hızlıca çözündürülmüş ve 15 ml'lik falkonlara alınarak üzerlerine 2'şer ml hücre medyumunu eklendi. Falkonlar hiç bekletilmeden 5 dakika süreyle 1500 rpm'da santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılarak hücreler medyumla süspanse edildi. Hücre medyumunu içeriği; %83 Dulbecco modifiye besiyeri ortamı (DMEM), %15 fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin ve %1 antibiyotik (penisilin, streptomisin ve amfoterisin B) oluşmaktadır. Süspanse edilen hücreler, 25 cm² lik flasklara (Corning, ABD) ekililerek inkübasyon için etüv'e bırakılmıştır (PHCBI, MCO-170AC-PE, %5 CO₂; 37°C). Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar her gün kontrol edilmiştir. 3 günde bir medyumların tazelemesi yapılmıştır. Flaskın %85'i hücrelerle kaplanınca, hücreler Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisiyle (%0,25 tripsin-%0,02 EDTA) kaldırılarak, 75 cm²'lik flasklara (Corning, ABD) aktarılmıştır. Yeni flasklar tekrar inkübasyona alınarak (%5 CO₂; 37 °C) hücre çoğaltma işlemi tekrarlanmıştır. Flasklardaki hücreler ELISA testleri için 96 kuyucuklu plaklara, İmmünofloresan boyama için 6'lı platelere, PCR analizleri için uygun flasklara aktarım yapılmıştır (Genç et al., 2024; Sencan & Celik Onar, 2025).

3.2. Eksozom İzolasyonu

Eksozomların eldesi FBS'siz ortamda gerçekleştirilmiştir. Bunun için 150 cm²'lik flastaki MDA-MB-231 hücreleri %85 yoğunluğa ulaştıktan sonra, 3 gün boyunca FBS siz medyum ile muamele edilmiştir. 3. günün sonunda hücre süspansiyonu toplanmıştır. Toplanan süspansiyonlar 0.2 mikronluk filtrelerden geçirilmiştir. Devamında 300 g de santrifüj işlemi yapılarak hücre kalıntıları ve büyük veziküller uzaklaştırılmıştır. Kalan sıvı Exo-spin (Thermo Sci, Kat. No. 4478359) ticari eksozom izolasyon kitinde belirtilen adımlara tabi tutulmuştur. Kısaca, kit içerisinde bulunan tampon süpernatantlara (2:1) eklenerek gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler önceden soğutulmuş santrifüjde -4°C'da 14000 g'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar atılmıştır. Her ependorfa 400 µl nükleaz içermeyen sıvı eklenerek pelletler çözündürülmüştür. Çözdürülen pelletlere total protein analizi için BCA testi gerçekleştirildi (Yeni et al., 2023).

3.3. Eksozom Karakterizasyonu

Toplanan ve -80'de saklanan eksozomların karakterizasyonu Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan (BARUM) hizmet alınarak SEM ve Zeta potansiyeli analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca örneklerde CD81 proteininin varlığı Western blot analiziyle değerlendirilmiştir (Oksvold et al., 2014; Sokolova et al., 2011).

3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Eksozomların taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi için, önce elde edilen eksozom süspansiyonu uygun bir taşıyıcı yüzeye (SEM stub) damlatılarak, yaklaşık 10-20 dakika içinde yüzeyde kurutulmuştur. Kuruyan örnekler, iletkenliği sağlamak amacıyla ince bir platin tabakasıyla kaplandı. Son aşamada numuneler, ZEISS/Supra 40 VP SEM cihazı kullanılarak düşük hızlandırma voltajı altında (1–5 kV) incelenmiştir. Elde edilen görüntülerde eksozomların morfolojik özellikleri ve yaklaşık boyut dağılımları değerlendirilmiştir (Al Shehadat et al., 2018).

3.3.2. Zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli analizi, eksozomların yüzey yükünü ve koloidal kararlılığını belirlemek için yapılan yaygın bir analiz yöntemidir. Tez çalışmamda izole edilen eksozomlar öncelikle saf su ile seyreltilerek (1:20 oranında), ölçüm için uygun bir konsantrasyona getirilmiştir. Numunede agregasyonu önlemek amacıyla nazikçe vortex uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler, partikül yüzey yükünü ölçmek amacıyla kullanılan MALVERN/NANO-ZS zeta potansiyel cihazı (Malvern, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak ölçülmüştür. Kısaca, örnekler kuvvetlerin içine dikkatlice aktarıldıktan sonra cihazın okuma bölmesine yerleştirilmiştir. Tüm ölçümler 25 °C sıcaklıkta ve 3'er tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen zeta potansiyeli değerleri, eksozomların yüzey yükünü (genellikle negatif) ve süspansiyonun istikrarını ölçmek için önemlidir. Mutlak zeta potansiyeli değerinin yaklaşık 30 mV veya üzerinde olması, elektrostatik olarak kararlı dispersiyonun göstergelerinden biri kabul edilir (Getnet Midekessa et al., 2020).

3.3.3. Western blot

Protein miktarı BCA yöntemiyle belirlenmiş, CD81 proteini Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomlardaki toplam protein

içeriğini belirlemek için BCA Protein Tayin Kiti (Thermo Fisher Scientific, Kat. # 23225) kullanılarak spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Kısaca, ölçüm sonrası eşit miktarda protein (kuyu başına 50 µg) SDS-PAGE jellerine aktarılmıştır. Jel yürütme işlemi Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell elektroforez cihazı ile yapılmıştır. Elektroforezden sonra proteinler, yarı kuru transfer cihazı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) aracılığıyla nitroselüloz membranlara (NC) aktarılmıştır. Transfer aşaması için sırayla bir sandviç düzeneği oluşturulmuştur. Sünger, Filtre kâğıdı, Jel, Nitroselüloz membran, Filtre kâğıdı ve sünger (katottan anoda). Aktarım sonrası membranlara bloke işlemi yapılmıştır. Daha sonra %5'lik yağsız sütte, 0,1% Tween 20 içeren Tris tamponlu salin (TBS-T) kullanılarak birincil antikorlarla 4 °C'de bir gece boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır. Kullanılan antikorlar eksozomun varlığını ispatlamak için CD-81 (Thermo Fisher Scientific, 0630D) değerlendirilmiştir. Antikor oranı ise 1:1000 olarak tercih edilmiştir. İkincil antikorların hazırlanması için %5 süt tozu ile seyreltilerek primer için uygun hale getirilmiştir (Fare Karşıtı İkincil Antikor: 1/5000). Hazırladığımız membranlar antikorlarla 1 saat muamele edilmiştir. Membranların görüntülenmesi için kemilüminesan konjugat kullanılmıştır. Bant görüntülerinin SYNGENE G: Box Chemi XRQ görüntüleme cihazı ile elde edilmiştir. Görüntülerdeki bant yoğunlukları ImageJ2 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Analiz üç defa tekrar edilmiştir (Ahlatcı et al., 2026; Getnet Midekessa et al., 2020).

3.3.4. BCA ile eksozomal protein tayini

Örneklere 400 µL RIPA lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler buz üzerinde 20 dakika bekletilmiştir. Bekletme sırasında arada bir nazikçe alt üst edilmiştir. Süre sonunda 14.000 ×g'de 20 dakika, +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant temiz bir ependorfa alınarak pellet atılmıştır. Tüm örnekler 96'lı well platelere 25 µL olacak şekilde eklenmiştir. BSA kimyasalı (Thermo Fisher Scientific, Kat. # 23225) üretici protokolüne göre hazırlanarak her numunenin üzerine hazırlanan kimyasaldan 200 µL eklenmiş ve örnekler 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası spektrofotometrik cihazda 562 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Eksozomal protein konsantrasyonları BSA standart eğrisi üzerinden hesaplanarak µg/mL olarak ifade edilmiştir.

3.3.5. Karboplatin-eksozom kompleksinin oluşturulması

Karboplatin-Eksozom kompleksinin oluşturulması için elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. Karboplatinin (5, 25, 50, 100, 500 nM, ve 1, 2.5, 5, 10 µM) dozları MDA-MB-

231 kaynaklı eksozomlara elektroporasyon yöntemi ile yüklenmiştir. Her bir doz aynı dozdaki eksozom ile [~ 3018 pg/ml (1:10 sulandırma)] ayrı ayrı olacak şekilde bir elektroporasyon cihazı (NEPA GENE, Super Electroporator NEPA21 Type II) kullanılarak elektropore edilmiştir. Karışımlar, poring pulse aşamasında 99 V'de 1 ms süreyle 9 darbe, ardından transfer pulse aşamasında 99 V'de 1 ms süreyle 10 darbe uygulanarak elektropore edilmiştir. Oluşan süspansiyonlar, elektroporasyondan sonra 15 dakika boyunca 4°C'de inkübe edilerek ilaç difüzyonunu ve gözenek kapanmasını desteklemek için 37°C'de 1 saat inkübasyona devam edilmiştir (Han et al., 2021).

3.3.6. Folik asit konjuge eksozomların hazırlanması

2 mg/ml dozunda hazırlanan folik asit (Sigma-Aldrich, F8758-5G) çözeltisi, yüklü eksozom çözeltisine eklendi ve iyice dağıldıktan sonra, $-NH_2$ ve $-COOH$ grupları arasındaki bağlanmayı sağlamak için oda sıcaklığında yarım saat karıştırıldı. İnkübasyonun ardından bağlanmamış NH_2 -PEG-FA moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla süspansiyon $3500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan kompleks kullanıma kadar +4 °C'de saklanmıştır. Hazırlanan folik asit ile fonksiyonelleştirilmiş karboplatin yüklü eksozomlar (FA-PEG-Exo/KP) kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır. Nanoparçacıkların karakterizasyonu için SEM ve zeta potansiyel yöntemleri kullanılmıştır. Karakterizasyon işlemleri Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (BARUM) gerçekleştirilmiştir (Yeni et al., 2024).

3.4. In Vitro Uygulama

MTT, immünofloresan boyama, qRT-PCR ve ELISA testleri için tüm hücreler uygun hücre büyüme kaplarına alınarak çoğalmaları sağlanmıştır.

3.4.1. Deney gruplarının oluşturulması

MTT testi için 96 kuyucuklu hücre plateleri kullanıldı (n=8). Karboplatin monoterapisi ve kompleks tedavi gruplarının hepsi MDA-MB-231 ve L929 hücrelerinde MTT testine tabi tutulmuştur. MTT testleri deney uygulandıktan sonra 24. ve 72. saatte gerçekleştirilmiştir.

MTT sonuçlarına göre İmmüno Floresan boyama, qRT-PCR ve ELISA testlerinde kullanılacak gruplar belirlendi;

- Kontrol,
- Karboplatin 10 μ M,
- Eksozom+Folik Asit,
- Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 500 nM,
- Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 1 μ M,
- Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 2.5 μ M,
- Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 5 μ M,
- Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 10 μ M

ELISA testleri için 96 kuyucuklu well platelerde bulunan hücre süspansiyonları tedaviden sonraki 72. saatte toplanarak ependorflarda -80 °C’de saklanmıştır (n=3). İmmüno Floresans boyama için 6’lı platelere hücreler ekildi ve %85 konfluenseye ulaşana kadar hücrelere tedavi uygulanmıştır. 72.saatte flasklardaki hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak 5 dakika boyunca 1500 rpm’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pelet protein izolasyonu için işlemlere tabi tutulmuştur. MTT analizi dışında gerçekleştirilen tüm analizlerde, 72 saatlik tedavi sonrasında elde edilen örnekler kullanılmıştır. Bu süre; eksozomların hücreler tarafından internalize edilmesi, eksozom içerisindeki karboplatinin salınması ve ilacın hücresel düzeyde biyolojik etkilerini tam olarak gösterebilmesi göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Tablo 5. Deney grupları

Monoterapiler	Kompleks Tedaviler
Kontrol	Kontrol
Karboplatin 5 nano Molar (nM)	Eksozom+Folik Asit (FA-EXO)
Karboplatin 25 nano Molar (nM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 5 nano Molar (FA-EXO+C 5 nM)
Karboplatin 50 nano Molar (nM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 25 nano Molar (FA-EXO+C 25 nM)
Karboplatin 100 nano Molar (nM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 50 nano Molar (FA-EXO+C 50 nM)
Karboplatin 500 nano Molar (nM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 100 nano Molar (FA-EXO+C 100 nM)

Tablo 5. Devamı

Karboplatin 1 mikro Molar (μM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 500 nano Molar (FA-EXO+C 500 nM)
Karboplatin 2,5 mikro Molar (μM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 1 mikro Molar (FA-EXO+C 1 μM)
Karboplatin 5 mikro Molar (μM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 2,5 mikro Molar (FA-EXO+C 2,5 μM)
Karboplatin 10 mikro Molar (μM)	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 5 mikro Molar (FA-EXO+C 5 μM)
	Eksozom +Folik Asit+ Karboplatin 10 mikro Molar (FA-EXO+C 10 μM)

3.5. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] ile Canlılık Testi

Hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) kullanılmıştır (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA). 5 miligram MTT tozu, 1 mililitre PBS içine karıştırılarak homojen bir çözüm elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım 0,22 μm 'lik steril filtreden (Corning, Wiesbaden, Almanya) geçirilmiştir. MTT'nin ışığa hassasiyeti nedeniyle tüm işlemler karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan solüsyonların dış yüzeyi alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C'de saklanmıştır. Tedavi süreci bittikten sonra, 96 kuyucuklu platelerdeki medyumlar ortamdan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 10 μL MTT solüsyonu eklenerek üzerine 90 μL FBS'siz hücre medyumuna eklenmiştir. Daha sonra 4 saat boyunca 37 °C'de %5 karbondioksit içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için hücre solüsyonları tekrar ortamdan uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100'er μL dimetilsülfoksit (DMSO) eklendi. Formazan kristallerinin tamamen çözdürülmesi için plateler 3 dakika boyunca bir çalkalayıcıya (BIOSAN Orbital Shaker) bırakılmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra absorbans, yani optik yoğunluk, μQuant cihazında (Bad Friedrichshall, Biotek) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (n=8) (Celebi et al., 2026).

3.6. İmmünofloresan Boyama

PINK1 ve PARKIN protein ekspresyonunun hücrelerde belirlenmesi amacıyla IF boyama yöntemi uygulanmıştır. Tüm aşamalar üretici firmanın prosedürüne uygun şekilde

gerçekleştirildi. Hücreler, 72 saatlik tedavi süresi sonunda PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından hücreler TBS ile üç kez yıkanmış ve hücre membranının geçirgenliğini artırmak amacıyla %0,3 Triton X-100 içeren antikor dilüsyon tamponu kullanılmıştır. Nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla hücreler %5 yağsız sütte 37 °C'de 30 dakika bloke edilmiştir. Bloklama işleminin ardından anti-PINK1 (ABclonal, A7131), anti-PARKIN (ABclonal, A0968) çözeltileri hazırlanarak hücrelerin tamamını örtecek şekilde uygulanmış ve örnekler 4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 0,1% Tween 20 içeren Tris tamponlu salin (TBS-T) ile 5'er dakika arayla 3 kere yıkanmıştır. Primer antikorun bağlandığı bölgelerin floresan olarak görüntülenebilmesi amacıyla Alexa Fluor® 488 ile konjuge keçi anti-tavşan IgG (H+L) sekonder antikoruna uygulanmış ve örnekler ışık almayan koşullarda 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından hücreler TBS-T ile 3 kere 5'er dakika arayla yıkanmıştır.

Hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla 1 µg/mL DAPI çözeltisi uygulanmış ve örnekler karanlık ortamda 10 dakika inkübe edilmiştir. Preparatlar floresan mikroskopunda (ZEISS Primovert, Carl Zeiss, Almanya) uygun filtreler kullanılarak görüntülenmiş ve elde edilen floresan sinyalleri analiz edilmiştir.

3.7. Real Time PCR Analizi

3.7.1. Genetik materyalin elde edilişi

Toplanan hücre pelletleri RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için işleme alınmıştır.

3.7.2. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, Qiagen RNA izolasyon kitiyle gerçekleştirilmiştir. Pellet halinde tüpün dibine çöken hücrelere 1 mL Qiazole solüsyonu ilave edilmiştir ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra her bir ependorfa 200 µl kloroform ilave edilmiştir. Tüpler 15 saniye boyunca çalkalanmıştır ve 2-3 dakika boyunca tekrar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen örnekler 12.000'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edilmiştir. En üst kısımda duran renksiz sıvı başka bir tüpe aktarılmıştır. Aktarılan tüplerin içine 1:1 oranında etanol ilave edilerek 5 saniye boyunca düşük ayarında vortekslenmiştir. Örneklerden 700 µL alınarak RNeasy kolonlarına koyulmuştur ve kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 15

saniye 8.000 g iki kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası örneklerin üzerine 700 µl RW1 solüsyonu eklenmiştir. Kolonunun kapağı kapatılmıştır ve 15 saniye 8.000 g'de tekrar santrifüjlenmiştir. 500 µl RPE kolonlara eklenerek 15 saniye boyunca 8.000 g'de santrifüj edilmiştir. İkinci kez 500 µl RPE kolonlara eklenerek 2 dakika 8.000 g santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra RNeasy kolonuna yeni bir 1,5 ml'lik tüp yerleştirilerek 30-50 µl RNasefree su eklenmiştir. Son santrifüj işlemi 8.000 g'de 1 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Tüplerde kalan RNA'lar cDNA sentezi için işleme alınmıştır (Gecili et al., 2026).

3.7.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi, kullanılan kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (ECO-TECH Biotechnology, 2X SYBR Green qPCR Master Mix). Her grup için bir cDNA tüpü etiketlenmiştir ve her 0.2 ml'lik tüpün içerisine 2 µl genomic DNA wipeout buffer 7x solüsyonu, 3 µl örnek RNA ve 9 µl nükleaz-free water eklenerek total hacim 14 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler 2 dakika boyunca 42 °C'de tutularak tekrar buza koyulmuştur. Sonra, 1 µl reverse transcription master mix, 4 µl Quantscript RT buffer 5x, 1 µl RT primer mix ve bir önceki aşamada hazırlanan 14 µl'lik örnek eklenerek son hacim 20 µl olarak hazırlanmıştır. Örnekler termal cycle (Thermo Fisher Scientific, SimpliAmp Thermal Cycler) cihazına yerleştirilmiştir. 15 dakika 42 °C'de ve 3 dakika 95 °C'de ısı verilerek cDNA oluşumu gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda örnekler cihazdan alınarak qRT-PCR işlemi için kullanılmıştır (Gecili et al., 2026).

3.7.4. Gen ekspresyonu

Kaspaz-3, P21, P53, BAX, BCL-2, BCL-xL ve GAPDH gen primerleri ticari olarak elde edilmiştir. Bu aşamada her tüp içine 1,5 µl primer prop, 3 µl cDNA, 3 µl master mix ve 12,5 µl nükleaz içermeyen saf su ilave edilerek son hacim 20 µl gelecek şekilde ayarlanmıştır. qRT-PCR cihazında (Roche Diagnostics, LightCycler 96 Real-Time PCR System) mastermix kit prosedürüne uygun şekilde döngü bilgileri girilmiştir. Preinkübasyon aşaması için 95 °C'de 600 saniye, denatürasyon için 95 °C'de 10 saniye, birleşme/uzama için 60 °C'de 30 saniye olacak şekilde toplam 45 döngü gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin relatif ekspresyon düzeyleri, referans gen olarak GAPDH kullanılarak ΔC_t değerlerine göre analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilerek kat değişimi (fold change) olarak ifade edilmiştir (Gecili et al., 2026).

Tablo 6. Gen primer dizilim listesi

Gen	Forward	Reverse
<i>Kaspaz-3</i>	5'AGCGAATCAATGGACTCTGGA 3'	5' TTCCCTGAGGTTTGCTGCAT 3'
<i>P21</i>	5' GACCTGTCACTGTCTTTGTAC 3'	5' CTCTCATTCAACCGCCTAG 3'
<i>P53</i>	5' CCACCATGAGCGCTGCTCA 3'	5' GCAGGGGAGGGAGAGATG 3'
<i>BAX</i>	5' TTCATCCAGGATCGAGCAGG 3'	5' GGAAAAAGACCTCTCGGGGG 3'
<i>BCL-2</i>	5' CCTGTGGATGACTGAGTACC 3'	5' GAGACAGCCAGGAGAAATCA 3'
<i>BCL-xL</i>	5'GCAGGTATTGGTGAGTCGGATCGC 3'	5' CACAAAAGTATCCCAGCCGCCG 3'
<i>GAPDH</i>	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'

3.8. ELİZA Analizleri

Eliza analizleri kapsamında laktat dehidrojenaz (LDH), malondialdehit (MDA), katalaz (KAT), kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9) ve interlökin (IL-1 β , IL-10, IL-6) düzeyleri uygun ticari kitlerle ölçülmüştür. Örnekler n=3 olacak şekilde kit içerisinde çıkan plakelere eklenmiştir. 1 saat boyunca 36 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kit prosedürüne uygun şekilde deney gerçekleştirilmiştir. LDH (Feiyue Bio, FY-EH1908), MDA (Sunred, DZE201121372), KAT (BT Lab, SH0023), Kas-3 (Sunred, DZE201120970), Kas-9 (Sunred, DZE201120969), IL-1 β (Feiyue Bio, FY-EH1444), IL-10 (Feiyue Bio, FY-EH31875), IL-6 (Feiyue Bio, FY-EH31865). Her numunenin optik yoğunlukları 450 nm'de ölçülmüştür. Kit içerisinde bulunan standart çözeltiler üretici protokolüne uygun olarak 1:2 oranında seri dilüsyon şeklinde hazırlanarak numunelerle aynı koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen standart absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve numunelere ait konsantrasyonlar bu standart eğri esas alınarak hesaplanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, deneysel gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla IBM Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics) Version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birden fazla

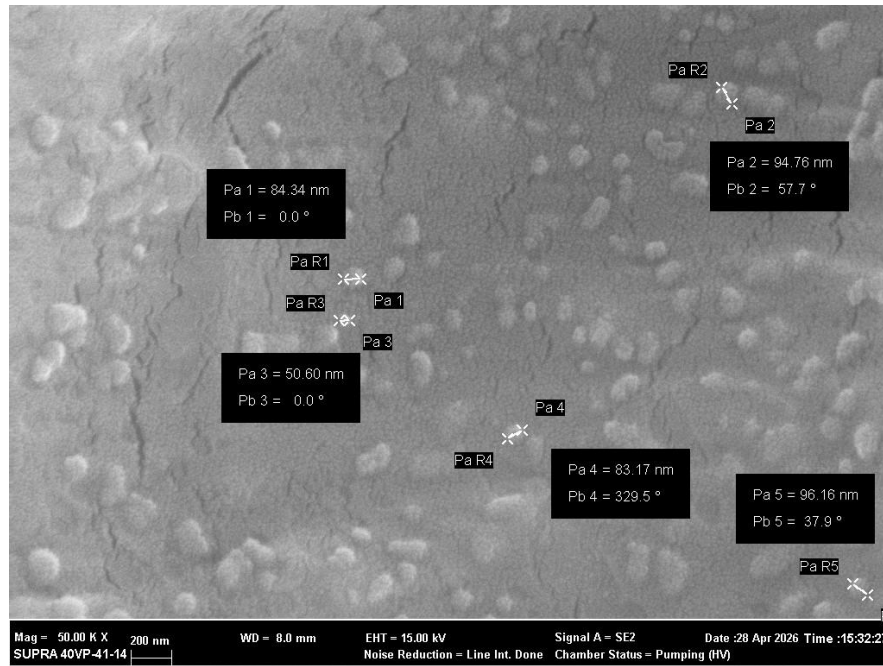
bağımsız grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way Analysis of Variance; One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (Mean $\pm$ Standard Deviation; Ortalama $\pm$ SD) olarak ifade edilmiştir. Grafiklerin hazırlanması ve verilerin görsel sunumu için GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılmıştır (Genc et al., 2025).

4. SONUÇLAR

4.1. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

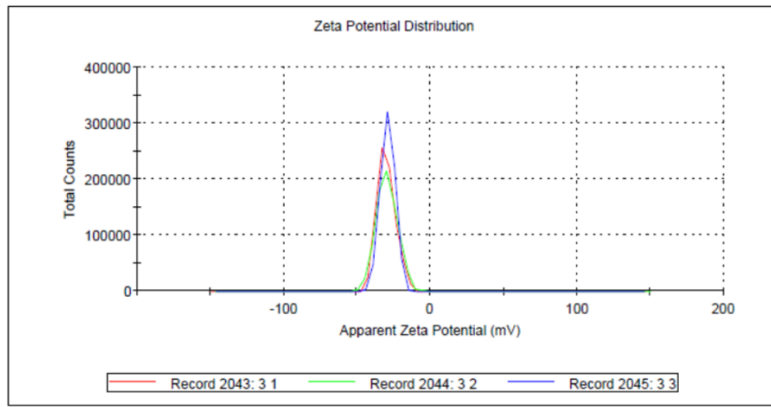
Elde edilen MDA-MB-231 eksozomları SEM, zeta potansiyeli ve Western Blot yöntemleri ile karakterize edildi. Eksozomların morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için SEM analizi yapıldı. Stub üzerinde bulunan eksozom örneği 50.000 kat büyütmede bir ZEISS Supra 40 VP Taramalı Elektron Mikroskobu (Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi ve temsili mikrograflar Şekil 9'da sunuldu.

SEM görüntülerinde, eksozomların, düzgün dağılım ve minimum agregasyon ile küresel veya yarı küresel bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Eksozomların boyutu, literatürle uyumlu olarak 50.60 nm ile 96.16 nm arasında tespit edildi (Yeni et al., 2023).



Şekil 9. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların SEM görüntüsü. Eksozomların küresel morfolojiye sahip olduğu ve yaklaşık 50–95 nm çap aralığında dağıldığı belirlenmiştir. Görüntü üzerinde temsilci partiküllerin çapları sırasıyla 84.34 nm, 94.76 nm, 50.60 nm, 83.17 nm ve 96.16 nm olarak ölçülmüştür. Görüntüler 50.000× büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu 200 nm'dir. Pa: Birinci ölçülen bölgeyi ifade eder. Pb: İkinci ölçülen bölgeyi ifade eder.

Eksozomlara ait zeta potansiyeli, MALVERN Nano-ZS Zetasizer (Malvern, İngiltere) kullanılarak değerlendirildi ve bulgular Şekil 10'da gösterildi. ± 30 mV olan zeta potansiyeli değerleri, kararlı bir sistemin göstergesidir. Eksozomlar ortalama $\pm 5,01$ mV sapma ile $-28,9$ mV'lik bir ortalama zeta potansiyeli ve bu değerde belirgin bir tepe noktası gösterdi. Bu durum, tutarlı bir yüzey yükü dağılımını işaret etmektedir. Zeta potansiyeli sonuçlarına göre, eksozomlar arasında elektrostatik itme olduğu, agregasyonunun olmadığı ve sulu süspansiyonda koloidal stabilite sağladığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, tespit edilen $-28,9$ mV kararlı ve iyi dağılmış eksozomlar elde edildiğini göstermektedir.

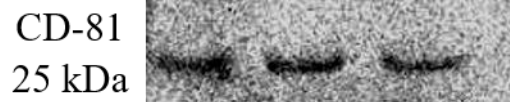


Parametre	Değer
Zeta potansiyeli (mV)	-28,9
Standart sapma (mV)	5,01
Kondüktivite (mS/cm)	0,0170
Sonuç kalitesi	İyi

Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart sapma (mV)
1	-28,9	100,0	5,01
2	0,00	0,0	0,00
3	0,00	0,0	0,00

Şekil 10. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların zeta potansiyel sonuçları. Eksozomların ortalama yüzey yükü $-28,9 \pm 5,01$ mV olarak belirlenmiştir.

CD81 protein seviyelerinin Western blot sonuçları Şekil 11'de gösterilmiştir. MDA-MB-231 eksozomlarına ait CD81 proteinleri 3 tekrar halinde gösterilmiştir. Eksozomların yüzey belirteçlerinden CD81'in Western blot ile tespit edilmesi, eksozomal yapının bozulmadığı ve proteinlerin stabil kaldığını desteklemektedir.



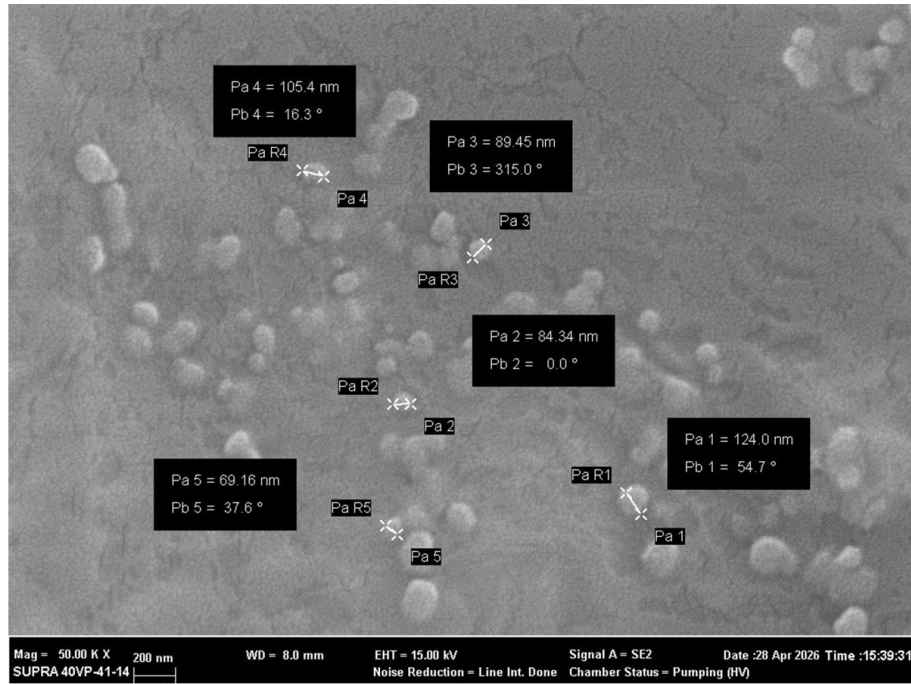
Şekil 11. MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomların Western blot sonuçları. Görüntüde CD81 protein seviyeleri bulunmaktadır. kDa: Kilodalton.

4.2. Hazırlanan FA-EXO-KP Komplekslerinin Karakterizasyonu

Oluşturulan FA-EXO-KP komplekslerinin karakterizasyonları SEM ve Zeta Potansiyeli testleri ile gerçekleştirildi.

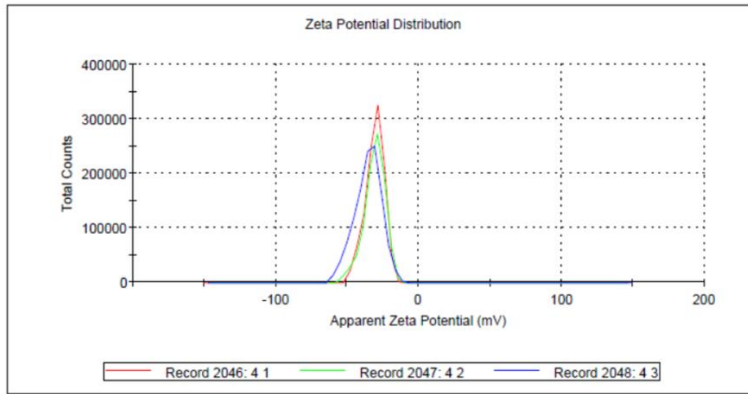
Yükleme ve işaretleme sonrası eksozomların morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için SEM analizi yapıldı. Stub üzerinde bulunan eksozom örneği 50.000 kat büyütmede bir ZEISS Supra 40 VP Taramalı Elektron Mikroskobu (Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi ve temsili mikrograflar Şekil 12'de verilmiştir.

SEM görüntülerinde, yükleme ve işaretleme sonrası eksozomların, düzgün dağılım ve minimum agregasyon ile küresel veya yarı küresel bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Eksozomların boyutlarında meydana gelen değişimlerin sebebi olarak karboplatinin eksozomların içerisine girerek boyutlarında değişime neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 12. Yükleme ve işaretleme sonrası MDA-MB-231 eksozomlarının morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için elde edilen SEM görüntüsü. Eksozomların boyutları 69,16 nm ile 124 nm arasında değişmektedir. Görüntüler 50.000× büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu 200 nm'dir. Pa: Birinci ölçülen bölgeyi ifade eder. Pb: İkinci ölçülen bölgeyi ifade eder.

FA ile işaretlenen eksozomların kararlılığını test etmek için zeta potansiyeli testi gerçekleştirildi. FA-EXO'ya ait sonuçlar Şekil 13'te gösterildi. FA-EXO'lar ortalama $\pm 9,29$ mV sapma ile $-35,3$ mV'lik bir ortalama zeta potansiyeli ve bu değerde belirgin bir tepe noktası gösterdi. Bu durum tutarlı bir yüzey yük dağılımını işaret etmektedir. Ortalama zeta potansiyeli, eksozomlar arasında önemli elektrostatik itme sergilediğini, agregasyonu engellediğini ve sulu süspansiyonda koloidal stabilite sağladığını göstermektedir. ± 30 mV'yi aşan zeta potansiyeli değerleri, kararlı bir sistemin göstergesidir. Bu nedenle, tespit edilen $-35,3$ mV kararlı ve iyi dağılmış eksozomlar elde edildiğini göstermektedir. Sonuçlara göre eksozomların yüzeyinin FA ile fonksiyonelleştirilmesinin eksozom morfolojisinin bozulmasına neden olmadığı tespit edilmiştir.



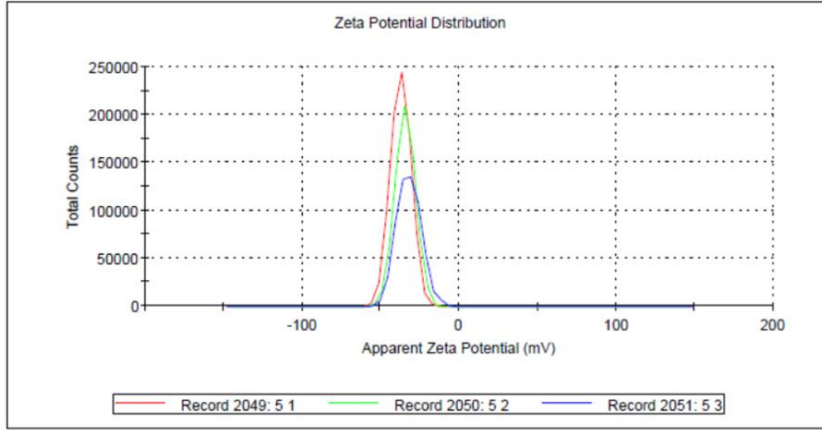
Parametre	Değer
Zeta potansiyeli (mV)	-35,3
Standart sapma (mV)	9,29
Kondüktivite (mS/cm)	0,0115
Sonuç kalitesi	İyi

Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart sapma (mV)
1	-35,3	100,0	9,29
2	0,00	0,0	0,00
3	0,00	0,0	0,00

Şekil 13. Oluşturulan FA-EXO konjugatının zeta potansiyel sonuçları. Eksozomların ortalama yüzey yükü $-35,3 \pm 9,29$ mV olarak belirlenmiştir.

Yükleme ve işaretleme sonrası eksozomların yüzey yüklerinin belirlenmesi için zeta potansiyel testi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 14'te sunuldu. FA-EXO-KP kompleksi ortalama $\pm 7,73$ mV sapma ile $-31,8$ mV'lik bir ortalama zeta potansiyeli ve bu değerde belirgin bir tepe noktası gösterdi. Bu durum, tutarlı bir yüzey yükü dağılımını işaret etmektedir. Ortalama zeta potansiyeli, eksozomların eksozomlar arasında önemli elektrostatik itme sergilediğini, agregasyonu engellediğini ve sulu süspansiyonda koloidal stabilite sağladığını göstermektedir. ± 30 mV'yi aşan zeta potansiyeli değerleri, kararlı bir sistemin göstergesidir. Bu nedenle, tespit edilen $-31,8$ mV kararlı ve iyi dağılmış eksozomların elde

edildiğini göstermektedir. Sonuçlara göre eksozomların karboplatin ile yüklenerek yüzeylerinin FA ile fonksiyonelleştirilmesinin eksozom morfolojisinin bozulmasına neden olmadığı tespit edilmiştir.



Parametre	Değer
Zeta potansiyeli (mV)	-31,8
Standart sapma (mV)	7,73
Kondüktivite (mS/cm)	0,00876
Sonuç kalitesi	İyi

Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart sapma (mV)
1	-31,8	100,0	7,73
2	0,00	0,0	0,00
3	0,00	0,0	0,00

Şekil 14. Oluşturulan FA-EXO-KP kompleksinin zeta potansiyel sonuçları. Eksozomların ortalama yüzey yükü $-31,8 \pm 7,73$ mV olarak belirlenmiştir.

4.3. MTT ile Canlılık Analizi

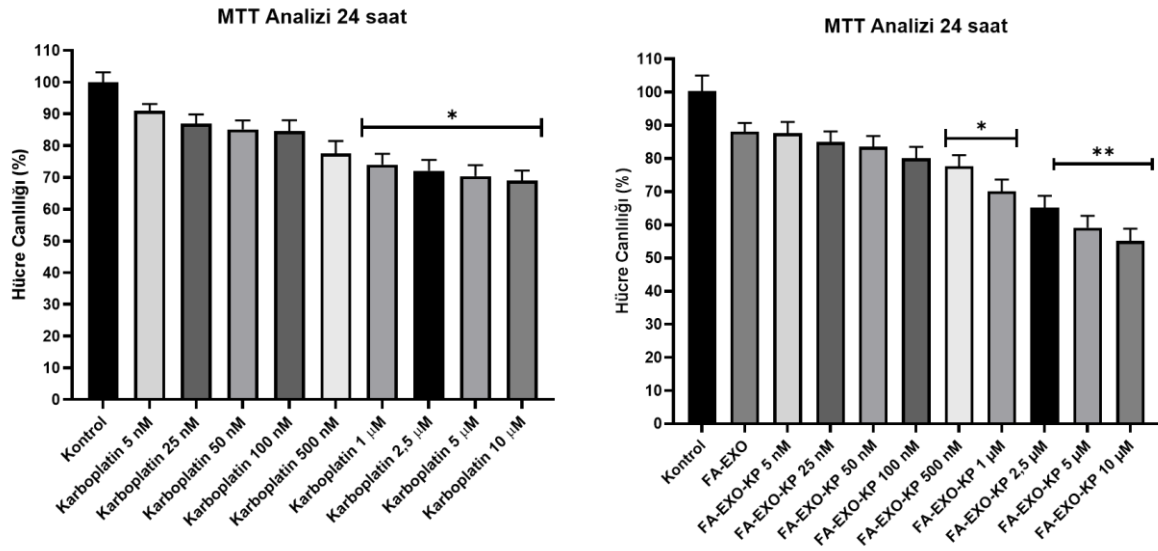
MTT kimyasalı hücre içine girer ve aktif mitokondrinin varlığı sonucunda formazan kristallerine indirgenir. Bu indirgenme ortamdaki sarı rengi, mor-mavi renge dönüştürür. Gerçekleşen renk değişimi spektrofotometrik bir cihazla tespit edilir. Renk yoğunluğu, canlılıkla doğru orantılı kabul edilir.

MDA-MB-231 hücrelerinde karboplatin monoterapisi ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının 24. ve 72. saatlerdeki canlılıkları MTT yöntemi ile değerlendirildi. Tüm analizlerde kontrol grubu 100 olarak kabul edildi.

24 saatlik canlılık sonuçları Şekil 15’te gösterilmiştir. Karboplatin monoterapisinde tüm gruplar kontrole göre değerlendirildi. Karboplatinin 5, 25, 50, 100 ve 500 nM dozlarında kontrole göre gerçekleşen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Ancak 1, 2.5, 5 ve 10 μ M dozlarındaki canlılığın diğer gruplara ve kontrole oranla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). FA-EXO-KP 24 saatlik analiz sonuçlarında ise tüm gruplar kontrole

göre değerlendirildi. FA-EXO-KP 500 nM ve FA-EXO-KP 1 μ M dozlarındaki canlılık oranı kontrole göre sırasıyla %30 ve %35 azalırken ($p<0.05$), FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M dozları hem kontrole ($\sim$ %40) hem de FA-EXO grubuna göre ($\sim$ %35) canlılıkta önemli bir azalmaya yol açtı ($p<0.01$).

Deney tasarımı hedeflenen asıl nokta karboplatin monoterapisi ile FA-EXO-KP kombinasyonunun karşılaştırılmasıdır. Bu bağlamda tedavilerin uygulanmasından 24 saat sonra yapılan canlılık analizlerinde karboplatin monoterapisinin artan dozlarda toksik etki göstererek canlılığı azalttığı tespit edilse de bu etkinin FA-EXO-KP kombinasyonunda daha güçlü şekilde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.



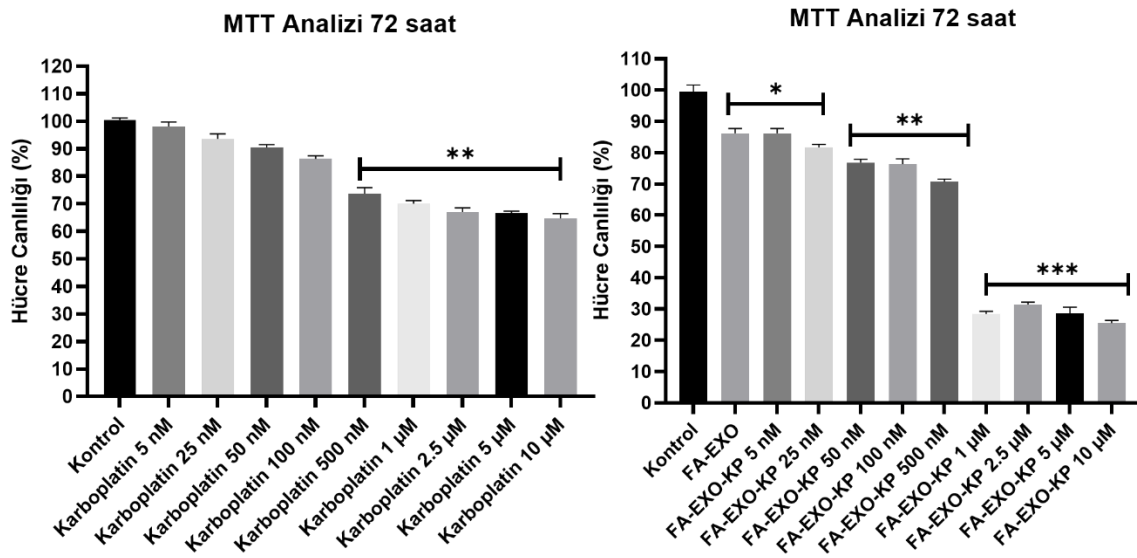
Şekil 15. Karboplatin monoterapisi (A) ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının (B) 24 saatlik MTT sonuçları. Monoterapilerle kombine tedaviler arasında canlılıkta yaklaşık %4-12'lik bir değişim tespit edilmiştir.

72 saatlik canlılık sonuçları Şekil 16'da verilmiştir. Karboplatin monoterapisinde tüm gruplar kontrole göre değerlendirildi. Karboplatinin 5, 25, 50 ve 100 nM dozlarında kontrole oranla bir azalma tespit edilmiş; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). 500 nM, 1, 2.5, 5 ve 10 μ M dozlarında ise canlılığın diğer tedavi gruplarına ve kontrole oranla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.01$).

FA-EXO-KP 72 saatlik analiz sonuçlarında tüm gruplar kontrole kıyaslanmıştır. FA-EXO kontrolüne göre %32 azalma göstermiştir ($p<0.01$). Kompleks gruplarında (FA-EXO-KP 1, 2.5 ve 5 ve 10 μ M) azalan canlılık seviyeleri kontrole göre anlamlıydı ($\sim$ %70, $p<0.001$). Diğer kompleks gruplar ise (FA-EXO-KP 50, 100, 500 nM) kontrole göre $\sim$ %25 azalmıştır

($p<0.01$), FA-EXO-KP 5 ve 25 nM gruplarında ise en düşük canlılık seviyeleri elde edilmiştir ($p<0.05$).

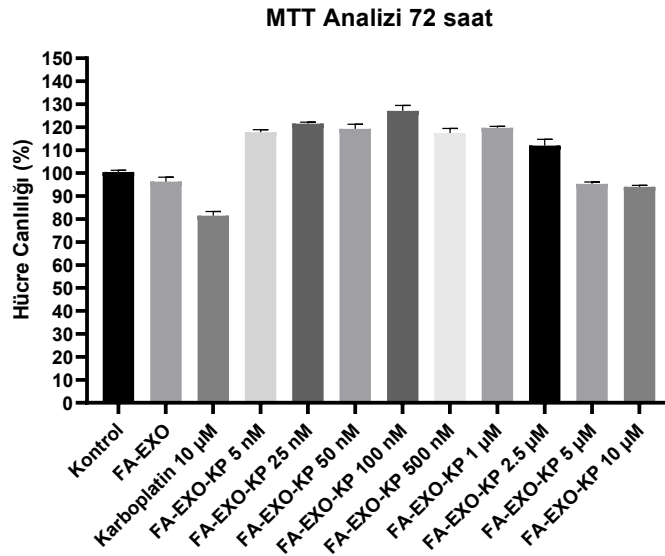
Karboplatin monoterapileri ve FA-EXO-KP grupları karşılaştırıldığında, karboplatinin tek başına MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir; ancak bu etkinin FA-EXO-KP gruplarına kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Özellikle her doz kendi arasında değerlendirilmiş ve her doz için gruplar arası fark 24 saat sonunda yaklaşık %4-13 arasında tespit edilirken, bu oran 72 saat sonunda %12-40 olarak belirlenmiştir.



Şekil 16. Karboplatin monoterapisi (A) ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının (B) 72 saatlik MTT sonuçları. Monoterapilerle kombine tedaviler arasında canlılıkta yaklaşık %12-40'lık bir değişim tespit edildi.

Tasarlanan kompleks molekülün sağlıklı hücreler üzerindeki in vitro toksisitesini tespit etmek amacıyla, L929 hücreleri kullanıldı. Fibroblast hücrelerine uygulanan tedavi 72 saat sonra canlılık tespiti için MTT testi ile değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 17'de verilmiştir. Kontrol grubunda canlılık 100 olarak kabul edildi ve tüm gruplar kontrol grubuna göre değerlendirildi. FA-EXO-KP grupları ise karboplatin monoterapisine kıyasla değerlendirildi. Bu kapsamda, karboplatin monoterapisinde kontrol grubuna göre canlılıkta azalma tespit edildi, ancak bu azalma çok düşük seviyelerdeydi. Benzer bir durum, FA-EXO-KP 10 µM dozunda da tespit edildi. Diğer grupların hepsi, kontrole kıyasla canlılık oranında yüksek bir artış gösterdi. Özellikle FA-EXO-KP 25 ve 500 nM gruplarında canlılık oranlarının kontrole göre 3 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen verilere bakıldığında, karboplatinin tek başına hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etki göstermediği, bunun ise uygulanan karboplatin dozlarının yetersiz düzeyde olmasına bağlı olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca kompleks yapılarda kontrole göre yüksek canlılık oranlarının tespit edilmesi folik asidin hücre canlılığını artırarak proliferasyonu desteklediğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, tez amacını destekler biçimde, MDA-MB-231 eksozomlarının hücre içerisine penetre olamayarak karboplatinin antikanser etkinliğini azalttığı düşünülmektedir. Ancak FA-EXO-KP 2.5, 5 ve 10 μ M gruplarında canlılığın diğer kompleks gruplara göre giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumda, eksozomların zaman içinde yapı bütünlüğünü kaybederek karboplatinin etkinliğini ortaya koymasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu azalmaya rağmen yine de kompleks grupları arasında kontrole göre en düşük canlılık gösteren FA-EXO-KP 10 μ M grubu yaklaşık %30 artış sağlamıştır.



Şekil 17. Fibroblast hücrelerinde karboplatin monoterapisi ve FA-EXO-KP kombinasyonlarının 72 saatlik MTT analizi sonuçları.

24 ve 72 saatlik MDA-MB-231 MTT sonuçlarından sonra elde verilere göre deneyin devam analizleri için kullanılacak gruplar belirlendi;

- Kontrol,
- Karboplatin 10 μ M,
- FA-EXO, FA-EXO-KP 500 nM,
- FA-EXO-KP 1 μ M,
- FA-EXO-KP 2.5 μ M,

- FA-EXO-KP 5 μ M,
- FA-EXO-KP 10 μ M.

4.4. İmmünofloresan Analizleri

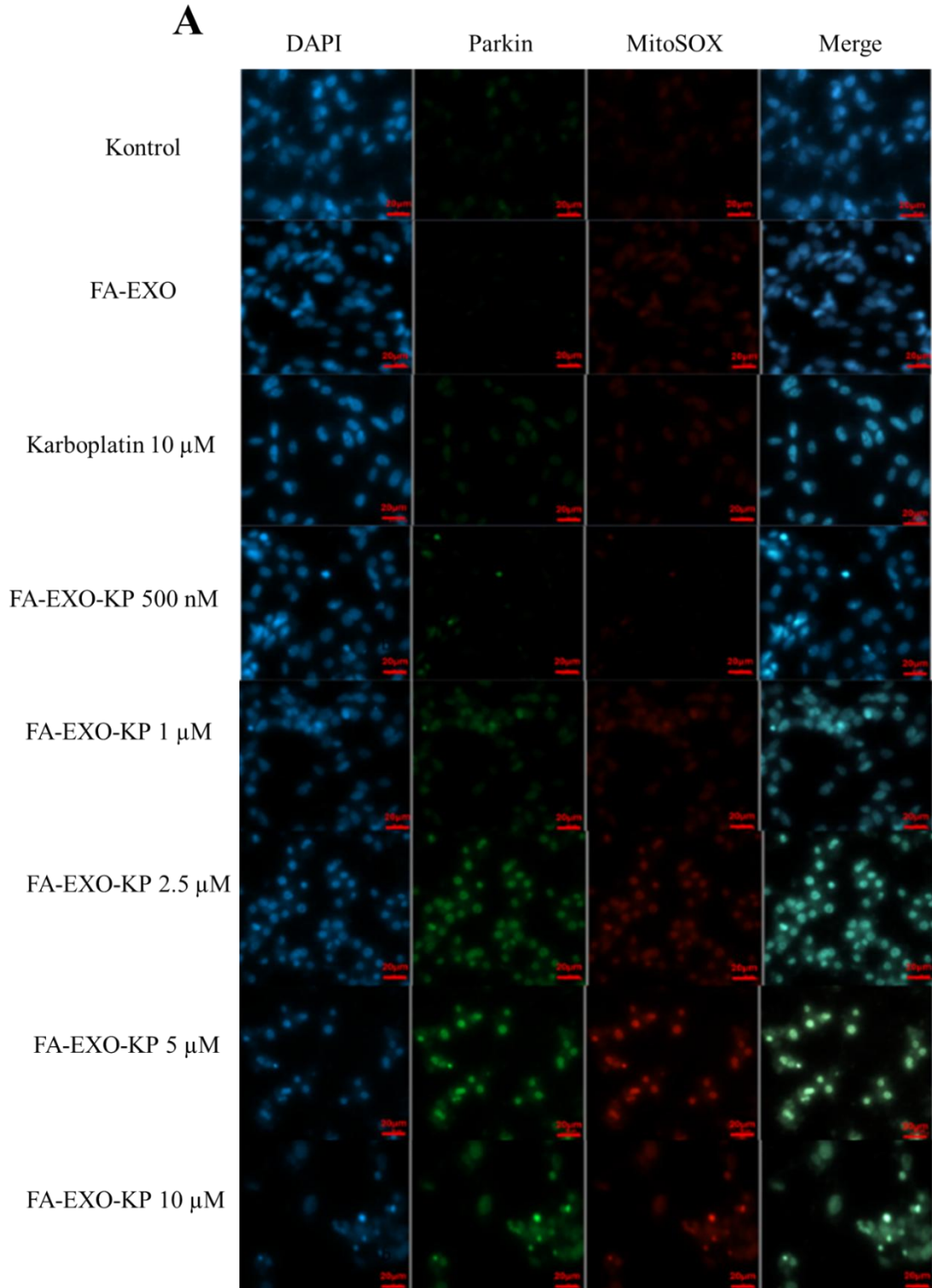
İmmünofloresan boyama sonuçları Şekil 18’de gösterilmektedir. Parkin immünofloresan görüntülerinde kontrol, FA-EXO, Karboplatin 10 μ M ve FA-EXO-KP 500 nM gruplarında Parkin ekspresyonunun oldukça düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Ancak FA-EXO-KP 1, 2.5, 5 ve 10 μ M uygulanan gruplarda Parkin floresans yoğunluğunda belirgin artış tespit edilmiştir. En yüksek Parkin ekspresyonu FA-EXO-KP 2.5 μ M grubunda gözlenirken, 5 ve 10 μ M dozlarında artan sitotoksosite ve buna bağlı canlı hücre sayısındaki azalma nedeniyle floresan yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir.

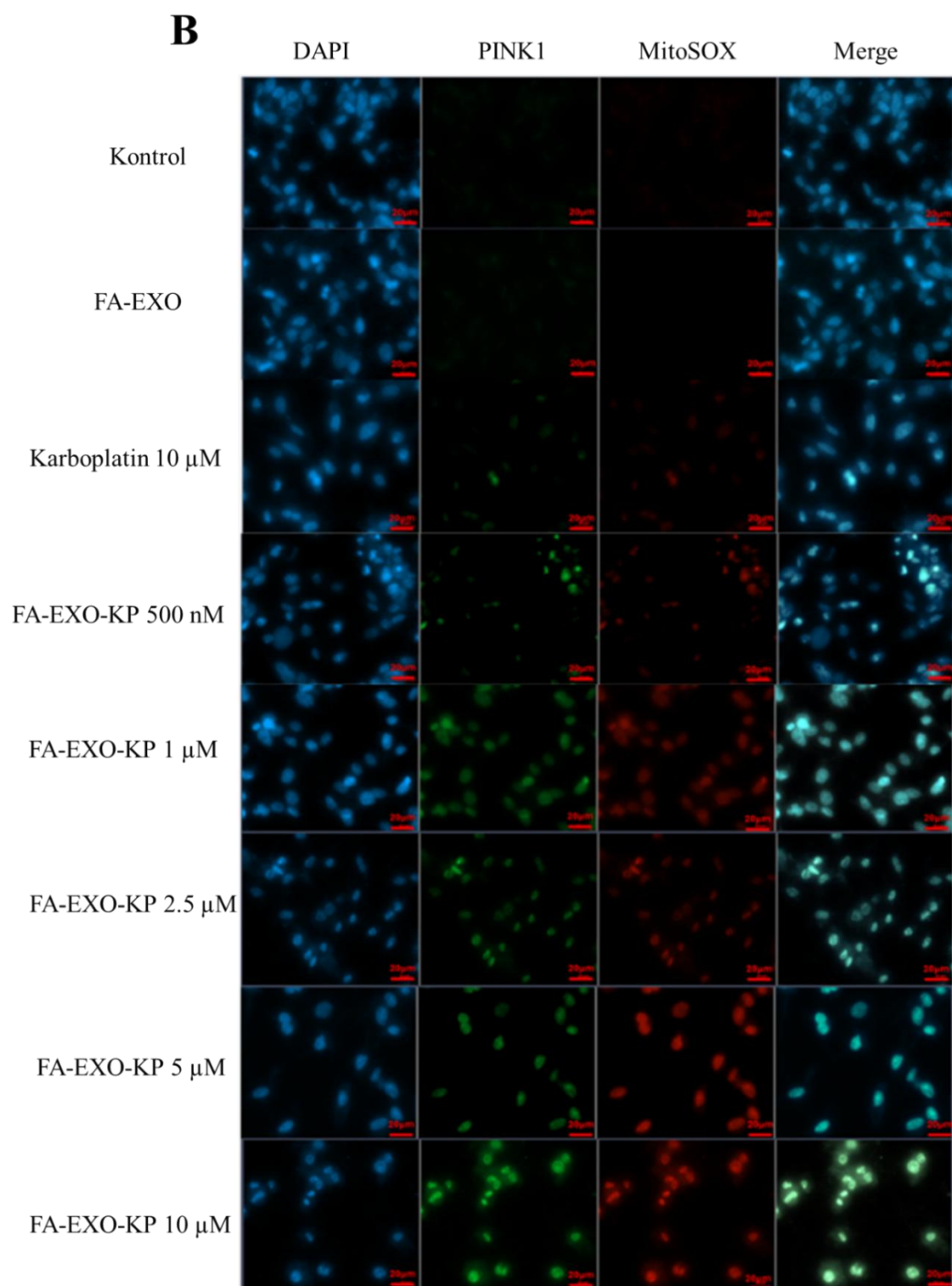
PINK1 immünofloresan görüntülerinde ise kontrol grubunda ekspresyonun oldukça düşük olduğu, FA-EXO uygulaması ile sınırlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Karboplatin 10 μ M grubunda PINK1 ekspresyonunda artış gözlenirken, FA-EXO-KP uygulanan gruplarda bu artışın daha belirgin olduğu saptanmıştır. PINK1 floresans yoğunluğunun en yüksek olduğu grup FA-EXO-KP 5 μ M olarak belirlenmiştir. FA-EXO-KP 10 μ M grubunda ise artan hücre ölümü nedeniyle canlı hücre sayısının azalmasına bağlı olarak floresans yoğunluğunun 5 μ M grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Hem Parkin hem de PINK1 antikorlarının bulunduğu kuyucuklara MitoSOX boyası eklenmiş ve mitokondriyal ROS değerlendirilmiştir. Kontrol ve FA-EXO gruplarında mitokondriyal süperoksit üretiminin düşük düzeyde olduğu, karboplatin ve özellikle FA-EXO-KP uygulanan gruplarda ise MitoSOX floresans yoğunluğunun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. En belirgin MitoSOX sinyali FA-EXO-KP 5 μ M grubunda gözlenirken, 10 μ M grubunda canlı hücre sayısındaki belirgin azalma nedeniyle floresans yoğunluğunun nispeten azaldığı değerlendirilmiştir.

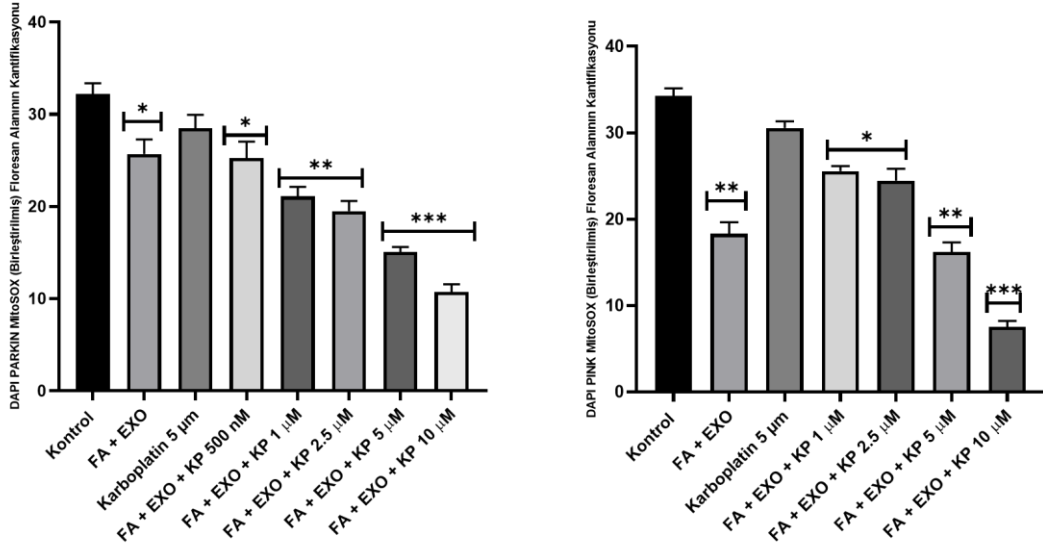
Genel olarak değerlendirildiğinde, FA-EXO-KP komplekslerinin karboplatin monoterapisine kıyasla hem Parkin hem de PINK1 ekspresyonunu daha güçlü şekilde artırdığı ve buna eşlik eden MitoSOX sinyalindeki artışın mitokondriyal oksidatif stresin yükseldiğini gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle kompleks gruplarda PINK1/Parkin sinyal yolunun aktivasyonu ile birlikte mitokondriyal süperoksit üretimindeki artış, hasar görmüş mitokondrilerin eliminasyonuna yönelik mitofaji mekanizmasının uyarıldığını

düşündürmektedir. Elde edilen bu bulgular, folik asit hedefli karboplatin yüklü eksozomların mitokondri üzerinde daha güçlü bir etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir.





C



Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrasında Parkin (A) ve PINK1 (B) protein ekspresyonlarının immünfloresan mikroskopi ile değerlendirilmesi. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile, Parkin ve PINK1 proteinleri Alexa Fluor 488 konjuge sekonder antikor (yeşil) ile, mitokondriyal süperoksit üretimi ise MitoSOX Red (kırmızı) ile görüntülenmiştir. Merge görüntüleri, DAPI, Parkin/PINK1 ve MitoSOX Red sinyallerinin birleştirilmiş görüntülerini göstermektedir. İmmünfloresan görüntülerine ait kantitatif analiz sonuçları grafikler halinde sunulmuştur (C). Ölçek çubuğu = 20 µm.

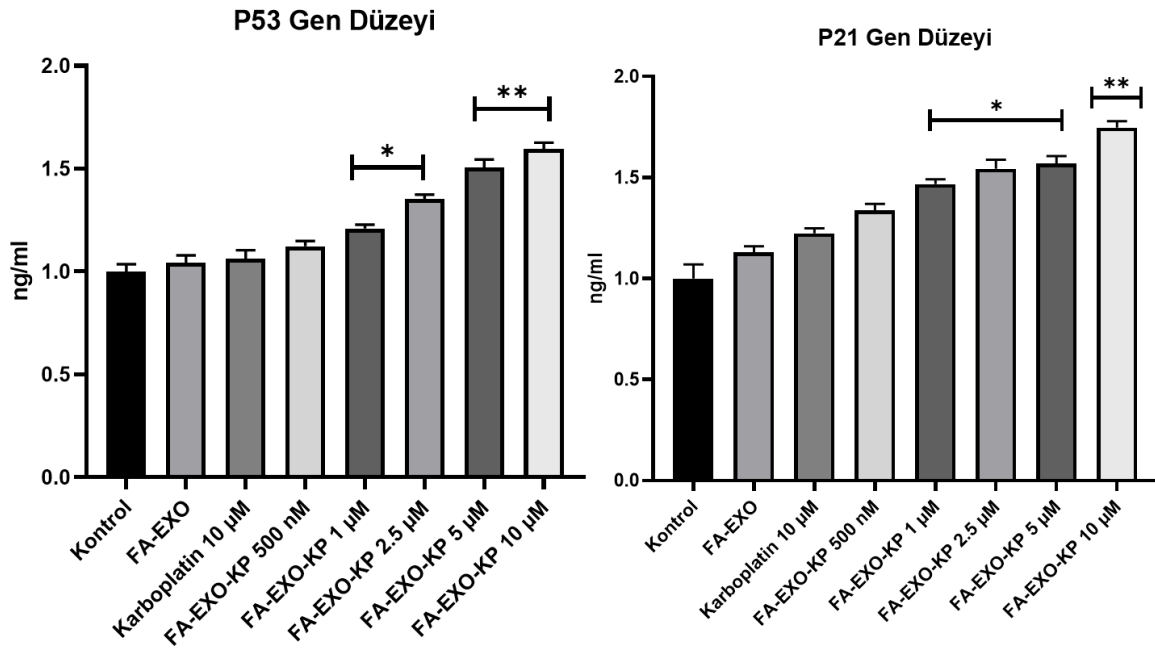
4.5. qRT-PCR Analizleri

MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan tedavi 72 saat sonra hücreler toplanarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra apoptotik yolda görev alan bazı önemli genlerin (p53, p21, BAX, BCL-2, BCL-x1 ve Kaspaz-3) ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile tespit edilmiştir. Tüm FA-EXO ve Karboplatin 10 µM grupları kontrole göre, diğer tedavi grupları ise Karboplatin monoterapisine göre değerlendirildi.

P53 ve P21, hücrenin kontrolsüz bölünmesini ve kanserleşmesini engelleyen en önemli tümör baskılayıcı sistemlerdir. Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde, bir "fren sistemi" gibi çalışarak mutasyonlu hücrelerin çoğalmasını durdurur. P53, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşir ve P21'i aktive eder. P21 ise hücre bölünmesinde görev alan siklus proteinlerini inaktive eder. Böylece hücre bölünmesi durur ve hücre apoptoza uğrar.

72 saatlik tedavi süresi sonrasında elde edilen P21 ve P53 gen düzeyleri Şekil 19'da verilmiştir. FA-EXO, Karboplatin 10 µM, FA-EXO-KP 500 nM ve 1 µM dozlarında P53 seviyelerinde kontrole oranla artış tespit edilmiş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. FA-EXO-KP 1 μ M, FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M dozlarında karboplatin monoterapisine oranla sırasıyla %14, %27 ($p<0.05$), %41 ve %50'lik ($p<0.01$) artış gözlemlenmiştir. P21 ekspresyon seviyeleri P53 ile korelasyon göstermektedir. Bu bağlamda, karboplatin monoterapisine göre en yüksek artış gösteren grup %42'lik bir değişim ile FA-EXO-KP 10 μ M olarak tespit edilmiştir ($p<0.01$). P53 ve P21 seviyelerindeki artış, uygulanan terapinin TNBC hücre hattında karboplatin kaynaklı DNA hasarının onarılmaya çalışıldığının önemli bir göstergesidir.



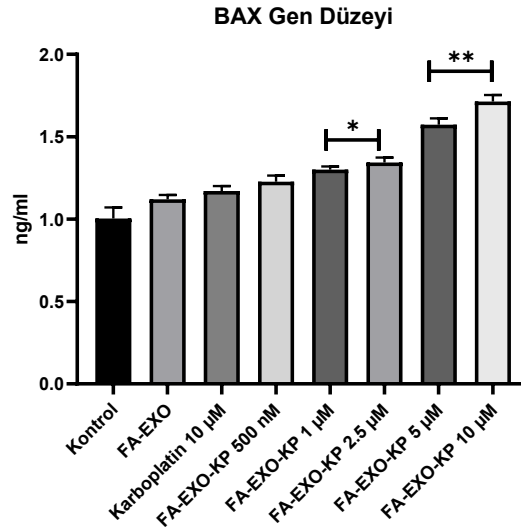
Şekil 19. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında P53 ve P21 gen ekspresyon düzeyleri. FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M gruplarında kontrol grubuna kıyasla P53 ve P21 gen ekspresyonlarında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, FA-EXO-KP kombinasyonu ile her iki genin ekspresyon düzeylerinde doza bağlı artış gözlenmiştir (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL, hücrenin mitokondri zarında lokalize olup hücrenin yaşayıp yaşamayacağına karar veren Bcl-2 protein ailesinin üyelerindendir. Bu proteinler kendi aralarında pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki gruba ayrılır. Aralarındaki denge, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinde önemli bir rol oynamaktadır.

BAX (pro-apoptotik), hücrede ölüm sinyali geldiğinde mitokondri zarında birikerek porlar oluşturur. Bu porlardan hücre içine sitokrom c salınır. Bu salınım Caspase-3'ü aktifleştirerek hücreyi kesin olarak apoptoza sokar.

72 saatlik tedavi süresi sonrasında elde edilen BAX seviyeleri Şekil 20'de verilmiştir. FA-EXO, Karboplatin 10 μ M ve FA-EXO-KP 500 nM dozlarında BAX seviyelerinde kontrole

oranla artış tespit edilmiş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. FA-EXO-KP 1 μ M, FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M dozlarında, karboplatin monoterapisine kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 1 μ M grubunda: %14 ($p<0.05$), 2.5 μ M grubunda: %27 ($p<0.05$), 5 μ M grubunda: %41 ($p<0.01$) ve 10 μ M grubunda: %50 ($p<0.01$).



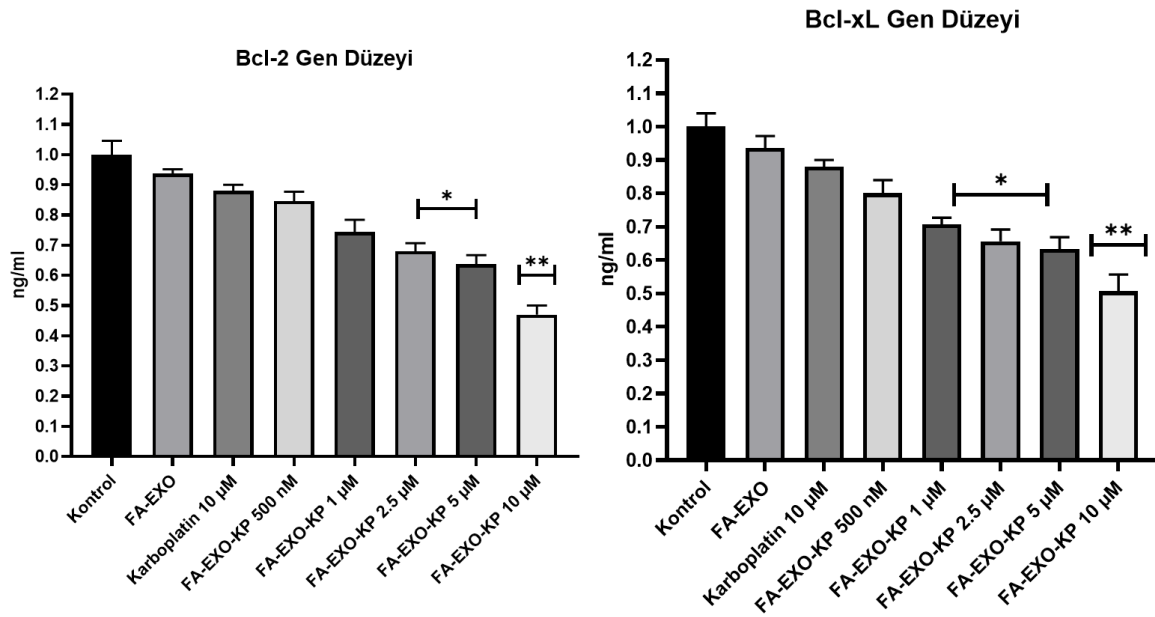
Şekil 20. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında BAX gen ekspresyon düzeyleri. FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, FA-EXO-KP kombinasyonu ile BAX gen ekspresyonunda doza bağlı bir artış meydana gelmiştir. Özellikle 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M kombinasyon gruplarında BAX gen ekspresyonu daha düşük dozlara göre anlamlı olarak yükselmiştir (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri hücrede antiapoptotik etki gösteren ve BAX'ı dengeleyen önemli proteinlerdir. Görevleri BAX'a bağlanarak inhibasyonunu sağlamaktadır. Böylece BAX mitokondri zarında por oluşumunu sağlayamayacak ve sitokrom C salınımı gerçekleşmeyecektir. Sitokrom C salınımının engellenmesi kaspaz inaktivasyonuna ve akabinde apoptozun baskılanmasına yol açacaktır.

Bcl-2 ve Bcl-xL gen düzeyleri Şekil 21'de verilmiştir. Bcl-2 seviyeleri, 72 saatlik tedavi sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağlı olarak azalmıştır. Tüm gruplarda kontrole göre Bcl-2 seviyelerinde azalma tespit edilmiş; ancak FA-EXO, Karboplatin 10 μ M, FA-EXO-KP 500 nM ve FA-EXO-KP 1 μ M grupları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M gruplarında karboplatin monoterapisine göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu azalmalar arasında en önemlisi FA-EXO-KP 10 μ M grubu olarak belirlenmiştir. Bu grup, karboplatin monoterapisine göre %47 azalma göstermiştir ($p<0.01$). Anlamlılık gösteren diğer gruplarda ise bu oran, artan doza göre

sırasıyla %22 ve %28 olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Bcl-2 seviyeleri ile korelasyon gösteren Bcl-xL ekspresyon seviyelerinde, Bcl-2'ye ek olarak FA-EXO-KP 1 μ M grubunda da karboplatin monoterapisine göre %20 oranında azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Bcl-xL seviyelerinde en önemli azalma yine %43 ile FA-EXO-KP 10 μ M grubunda tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Pro-apoptotik BAX seviyesinde doza bağlı artış tespiti ve BAX inaktivasyonundan sorumlu antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL seviyelerinin yine doza bağlı azalma göstermesi uygulanan tedavilerin TNBC hücre hattı apoptozu desteklediğini göstermektedir.

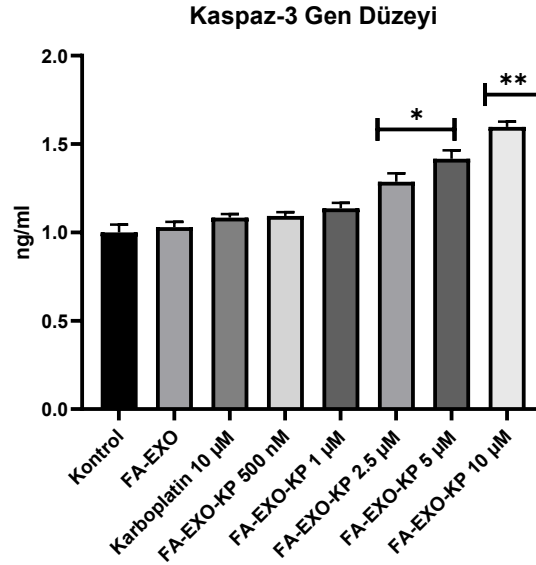


Şekil 21. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Bcl-2 ve Bcl-xL gen ekspresyon düzeyleri. FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, FA-EXO-KP kombinasyonu ile her iki genin ekspresyon düzeylerinde doza bağlı bir azalma gözlenmiştir. Özellikle 5 μ M ve 10 μ M kombinasyon gruplarında Bcl-2 gen ekspresyonu daha düşük dozlara göre anlamlı olarak azalmıştır. Benzer şekilde, Bcl-xL gen ekspresyonu da 2.5 μ M, 5 μ M ve özellikle 10 μ M kombinasyon gruplarında anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Kaspaz-3, apoptotik sürecin kabulünün sonunda hücrel metabolitleri parçalayan önemli bir enzimdir. Sitokrom C salınımı sonrası apoptosom adlı bir kompleks oluşur ve bu kompleks kaspaz-9'u, kaspaz-9 ise prokaspaz konumunda inaktif olarak bekleyen kaspaz-3'ü aktifleştirir. Kaspaz-3 seviyelerindeki artış hücrel parçalanmanın ve apoptozun önemli habercilerindendir.

72 saatlik deney süresinin sonunda analiz edilen Kaspaz-3 gen düzeyleri Şekil 22'de verilmiştir. FA-EXO, Karboplatin 10 μ M, FA-EXO-KP 500 nM ve FA-EXO-KP 1 μ M gruplarında Kaspaz-3 seviyelerinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. Fakat FA-EXO-KP 2.5, 5 ve 10 μ M gruplarında Kaspaz-3

seviyeleri Karboplatin 10 μM grubuna göre artış göstermiştir. FA-EXO-KP 2.5 μM ve FA-EXO-KP 5 μM grupları karboplatin monoterapisine göre yaklaşık sırasıyla %21 ve %30'luk bir artış göstermiştir ($p<0.05$). FA-EXO-KP 10 μM dozunda bu oran %48'lere kadar çıkmıştır ($p<0.01$).



Şekil 22. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri. FA-EXO ve Karboplatin 10 μM gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, FA-EXO-KP kombinasyonu ile Kaspaz-3 gen ekspresyonunda doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Özellikle 2.5 μM , 5 μM ve 10 μM kombinasyon gruplarında Kaspaz-3 gen ekspresyonu daha düşük dozlara göre anlamlı şekilde yükselmiştir (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

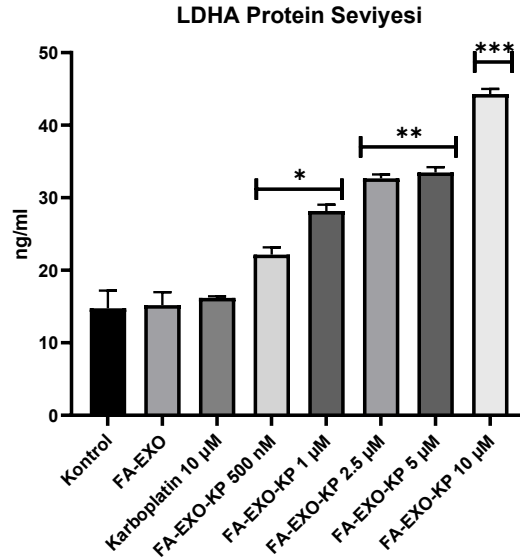
4.6. ELİZA Analizleri

72 saatlik tedavi sonrası hücre süspansiyonları toplandı ve LDH, MDA, KAT, IL-1 β , IL-6, IL-10, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 metabolitlerinin ölçümü için ELISA kitleri kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

LDH, hücrelerde bulunan ve şekerden enerji üretilmesini sağlayan önemli bir enzimdir. Hücresel solüsyonlarda yüksek miktarda bulunması, hücrenin deforme olarak sitoplazmasını dışarı saldıgını göstermektedir. Bu durum canlılık hakkında bilgi verir. Yüksek LDH seviyeleri canlılığın azaldığının göstergesidir.

72 saatlik deney süresi sonunda analiz edilen LDH seviyeleri Şekil 23'te verilmiştir. LDH seviyeleri analizi sonrasında, tüm gruplar kontrole göre değerlendirildi. Ayrıca FA-EXO-KP grupları karboplatin 10 μM dozuna göre karşılaştırıldı. FA-EXO ve karboplatin 10 μM dozlarında LDH seviyeleri kontrol grubuyla neredeyse aynıydı. Fakat FA-EXO-KP gruplarında

LDH seviyeleri hem kontrole hem de FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M dozlarına göre oldukça fazlaydı. FA-EXO-KP 2.5 μ M ve FA-EXO-KP 5 μ M dozları, karboplatin monoterapisine göre %103'lük bir artış gösterirken ($p<0.01$), FA-EXO-KP 10 μ M dozunda bu oran %170'lere kadar çıkmıştır ($p<0.001$).



Şekil 23. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında LDH protein seviyeleri. FA-EXO grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, FA-EXO-KP kombinasyonu ile LDH düzeylerinde doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Özellikle 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M kombinasyon gruplarında LDH seviyeleri daha düşük dozlara göre anlamlı olarak yükselmiştir (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

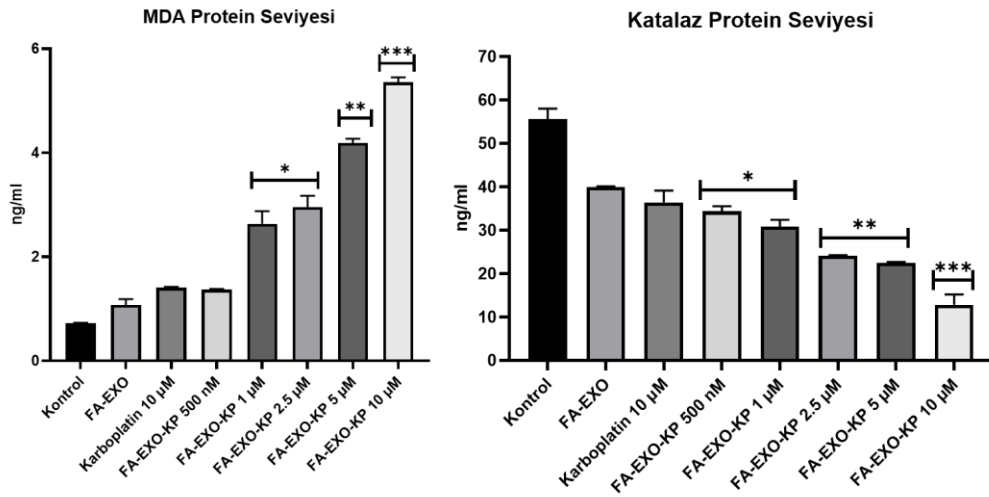
Tedavi sonrası oksidatif hasar değişimlerini belirlemek için MDA ve KAT seviyeleri analiz edildi. MDA, oluşan serbest radikaller nedeniyle gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan zararlı bir son üründür. Miktarındaki artış oksidatif hasar belirticidir. KAT, serbest radikallere karşı üretilen antioksidan enzimlerden biridir. Şiddetli veya kronik bir oksidatif stres durumunda, vücudun savunma mekanizması yetersiz kalır ve KAT enzim aktivitesi azalır. Yüksek KAT aktivitesi genellikle güçlü bir antioksidan savunmayı temsil eder.

MDA ve KAT seviyelerinin analizi sonrasında, tüm gruplar kontrole göre değerlendirildi (Şekil 24). FA-EXO-KP grupları karboplatin 10 μ M dozuna göre karşılaştırıldı.

FA-EXO, Karboplatin 10 μ M ve FA-EXO-KP 500 nM dozlarında MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Fakat FA-EXO-KP 1, 2.5, 5 ve 10 μ M gruplarında MDA seviyeleri hem kontrole hem de FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M dozlarına göre oldukça fazlaydı. FA-EXO-KP 5 μ M dozları, karboplatin monoterapisine göre yaklaşık %200'lük bir artış gösterirken ($p<0.01$), FA-EXO-

KP 10 μ M dozunda bu oran %280'lere kadar çıkmıştır ($p<0.001$). Bu durum FA-EXO-KP tedavilerinin uygulanması ile hücresel reaktif oksijen türlerinde aşırı artışı ve hücrenin oksidatif hasara maruziyetini göstermektedir.

FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M gruplarında KAT seviyelerinde kontrol grubuna göre azalış tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. FA-EXO-KP 2.5 μ M ve FA-EXO-KP 5 μ M grupları, karboplatin monoterapisine göre yaklaşık %36 oranında bir azalış gösterirken ($p<0.01$), FA-EXO-KP 10 μ M dozunda bu oran %65'e kadar çıkmıştır ($p<0.001$). Bu sonuçlara göre, hücrede FA-EXO-KP tedavileriyle birlikte oluşan aşırı oksidatif yükün antioksidan sistem tarafından yeterince bertaraf edilemediği düşünülmektedir.



Şekil 24. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında MDA ve KAT seviyeleri. FA-EXO-KP kombinasyonu ile MDA düzeyleri karboplatin dozuna bağlı olarak artarken, katalaz protein düzeyleri ise doza bağlı olarak azalmıştır. MDA düzeylerinde 1 μ M ile 2,5 μ M (* $p<0.05$), 2,5 μ M ile 5 μ M (** $p<0.01$) ve 5 μ M ile 10 μ M (*** $p<0.001$) kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Buna karşılık katalaz protein düzeylerinde 1 μ M ile 2,5 μ M (* $p<0.05$), 2,5 μ M ile 5 μ M (** $p<0.01$) ve 5 μ M ile 10 μ M (*** $p<0.001$) kombinasyon grupları arasında anlamlı azalma belirlenmiştir.

IL-1 β , IL-6 ve IL-10 bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve hücrelerin birbiriyle iletişim kurmasını sağlayan sitokinlerdir. Bu sitokinler bağışıklık yanıtını yöneterek hücre içi ve hücreler arası dengede önemli rol oynarlar. Üstlendikleri rollere göre proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkinlik gösterirler.

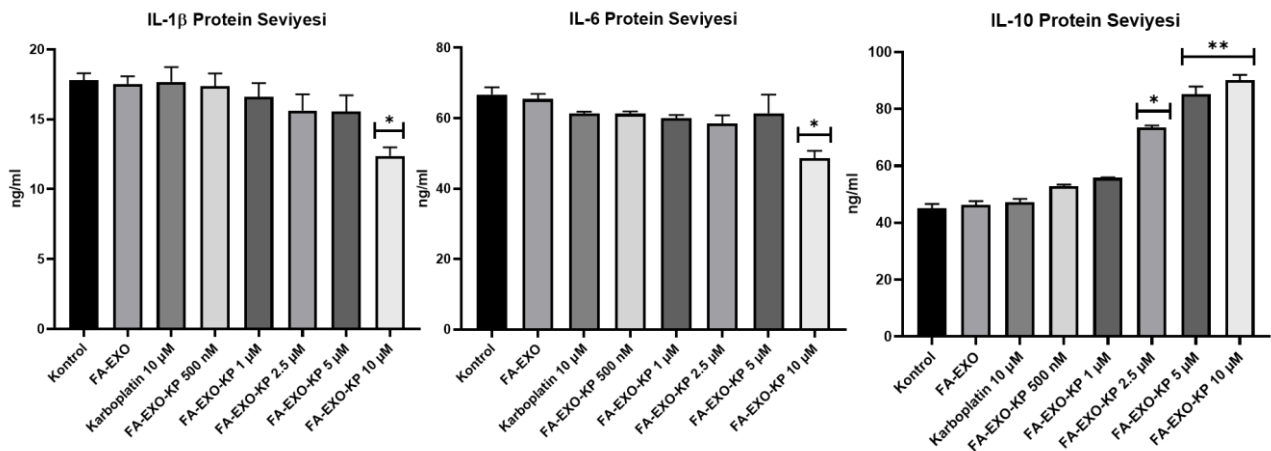
IL-1 β , proinflamatuvar belirteçlerinden en önemlisidir. Yükseliş inflamasyonun başlatıldığı anlamına gelir. İnflamasyonu başlatan en önemli etmenlerden biri, hücresel ortama yabancı olarak algılanan maddelerin girmesidir. Makrofajlar yabancı maddeyi algılayarak IL-1 β üretir. IL-1 β bağışıklık hücrelerine sinyal gönderir ve yabancı maddenin uzaklaştırılmasına yardımcı olur. IL-6 çift yönlü etki gösteren bir sitokindir. Ancak çoğunlukla IL-1 β gibi

davranarak inflamasyonun artmasına neden olur. IL-10 önemli bir antiinflamatuardır. Pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini baskılar. Bağışıklık yanıtını yavaşlatarak doku iyileşmesini ve tamirini başlatır.

72 saatlik deney süresi sonunda analiz edilen IL-1 β , IL-6 ve IL-10 seviyeleri Şekil 25'te verilmiştir. Tüm gruplarda kontrole göre IL-1 β seviyelerinde azalma tespit edilmiş; ancak FA-EXO-KP 10 μ M grubu hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmamıştır. FA-EXO-KP 10 μ M grubu, karboplatin monoterapisine göre %30 azalma göstermiştir ($p<0.05$). IL-6 seviyeleri ise IL-1 β ile korelasyon göstermektedir. FA-EXO-KP 10 μ M grubu dışındaki tüm gruplarda kontrole göre azalma gerçekleşmiş; ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. FA-EXO-KP 10 μ M grubunun IL-6 seviyeleri, karboplatin monoterapisine göre %20 azalmıştır ($p<0.05$).

IL-10 seviyeleri, FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M grupları dışındaki tüm gruplarda kontrolle benzer değerlerde tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen FA-EXO-KP 2.5 μ M, FA-EXO-KP 5 μ M ve FA-EXO-KP 10 μ M dozları, karboplatin monoterapisine göre sırasıyla %55 ($p<0.05$), %80 ve %90 ($p<0.01$) artış göstermiştir.

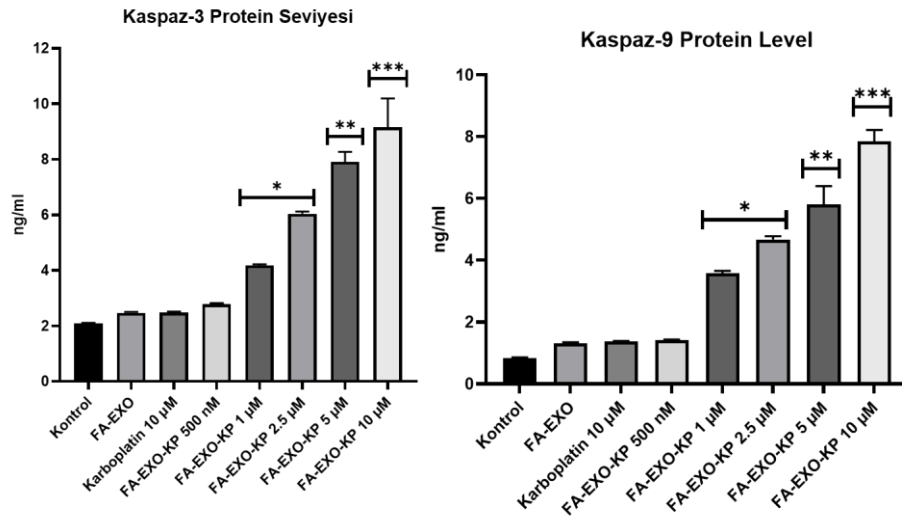
IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinde meydana gelen bu azalma, oluşturulan FA-EXO-KP kompleksinin yabancı olarak algılanmadığını ve inflamasyon sürecinin aktifleştirilmediğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, MDA-MB-231 kaynaklı eksozomların TNBC tedavisinde kullanımının, immün sistemden kaçış için yüksek potansiyel oluşturduğu öngörülmektedir.



Şekil 25. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında IL-1 β , IL-6 ve IL-10 seviyeleri. FA-EXO-KP kombinasyonu ile proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6 protein düzeylerinde karboplatin dozuna bağlı azalma, antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 protein düzeyinde ise doza bağlı artış gözlenmiştir. IL-1 β ve IL-6 protein düzeylerinde 5 μ M ile 10 μ M FA-EXO-KP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır (* $p<0.05$). IL-10 protein düzeyinde ise 2,5 μ M ile 5 μ M (* $p<0.05$) ve 5 μ M ile 10 μ M (** $p<0.01$) FA-EXO-KP grupları arasında anlamlı artış belirlenmiştir.

Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 apoptotik yolda görev alan önemli enzimlerdir. Yüksek oksidatif strese ve/veya onarılamayan DNA hasarı sonucunda, mitokondriden sitokrom C salınmaktadır. Sitokrom C, Apaf-1 ile birleşerek apoptozomu oluşturur. Oluşan apoptozom Kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 ise Kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetikler. Apoptozda kritik öneme sahip kaspaz-3 aktifleştikten sonra, hücresel metabolitler ve DNA parçalanmaya başlar, giderek hücre zarının bütünlüğü bozulur. Böylece hücre ölüm gerçekleşmiş olur.

72 saatlik deney süresinin sonunda analiz edilen Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 seviyeleri Şekil 26'da verilmiştir. FA-EXO, Karboplatin 10 μ M ve FA-EXO-KP 500 nM dozlarında Kaspaz-3 seviyelerinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. Fakat FA-EXO-KP 1, 2.5, 5 ve 10 μ M gruplarında Kaspaz-3 seviyeleri hem kontrole hem de FA-EXO ve Karboplatin 10 μ M dozlarına göre artış göstermiştir. FA-EXO-KP 5 μ M grubu, karboplatin monoterapisine göre yaklaşık %220'lik bir artış gösterirken ($p<0.01$), FA-EXO-KP 10 μ M dozunda bu oran %270'lere kadar çıkmıştır ($p<0.001$). Kaspaz-3 ile korelasyon gösteren Kaspaz-9 seviyelerinde ise karboplatin monoterapisine göre FA-EXO-KP 5 μ M ($p<0.01$) ve FA-EXO-KP 10 μ M ($p<0.001$) gruplarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MDA-MB-231 hücrelerinin tedaviden 72 saat sonra yüksek oranda apoptoza girdiğini göstermektedir.



Şekil 26. MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein seviyeleri. FA-EXO-KP kombinasyonu ile hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 protein düzeylerinde karboplatin dozuna bağlı artış gözlenmiştir. Kaspaz-3 protein düzeylerinde 1 μ M ile 2,5 μ M (* $p<0,05$), 2,5 μ M ile 5 μ M (** $p<0,01$) ve 5 μ M ile 10 μ M (** $p<0,001$) FA-EXO-KP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Kaspaz-9 sonuçları ise Kaspaz-3 sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir.

5. TARTIŞMA

TNBC, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonunun bulunmamasıyla karakterize, yüksek invazyon, metastaz ve nüks potansiyeline sahip heterojen bir meme kanseri alt tipidir (Bianchini et al., 2016). Bu moleküler özellikleri nedeniyle TNBC'de endokrin tedaviler ve HER2'yi hedefleyen tedaviler etkili değildir. Bu nedenle sitotoksik kemoterapiler günümüzde de tedavinin temel bileşenlerinden biri olarak yer almaktadır. Bu amaçla kullanılan platin türevi bir antineoplastik ajan olan karboplatin, DNA üzerinde zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozmakta ve hücre ölümünü tetiklemektedir (Gradishar et al., 2024). Bununla birlikte, tümör dokusuna sınırlı ve seçici olmayan dağılımı, sağlıklı dokularda oluşturduğu toksisite ve ilaç direncinin oluşması, karboplatinin klinik etkinliğini sınırlandırmaktadır (Dilruba & Kalayda, 2016). Bu sınırlılıkların aşılması amacıyla, ilacın tümör hücrelerine seçici olması ve hücre içi birikiminin artırılmasını sağlayabilecek ilaç taşıma sistemlerine yönelik araştırmalar giderek önem kazanmaktadır (Liu et al., 2016; Pourmadadi et al., 2023).

Eksozomlar, düşük immünojenite ve toksisite sergilemeleri, biyolojik uyumlulukları, proteinler, lipitler, deoksiribonükleik asit (DNA), küçük müdahale edici ribonükleik asit (siRNA), haberci RNA (mRNA), mikroRNA (miRNA) ve çeşitli sinyal molekülleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif yükler içermeleri ve kaynak hücreye özgü yüzey bileşenlerini kısmen koruyabilmeleri nedeniyle antikanser ilaçların taşınmasında umut vadeden doğal nanotaşıyıcılardır (Gutierrez-Millan et al., 2021). Özellikle tümör hücresi kaynaklı eksozomların homotipik hücrelerel etkileşimlerinden yararlanılması, terapötik yüklerin köken aldıkları tümör hücrelerine taşınmasını kolaylaştırabilecek bir sistem olarak değerlendirilmektedir (Li Qiao et al., 2020). Bunun yanında, eksozom yüzeyinin folik asit gibi hedefleyici ligandlarla modifiye edilmesi, folat reseptörü ekspresyonu yüksek tümör hücrelerine yönelik hücrelerel alımı ve tedavi seçiciliğini artırma potansiyeli taşımaktadır (Salunkhe et al., 2020). Ancak bu taşıma sistemlerinin terapötik üstünlüğünün ortaya konulabilmesi için fizikokimyasal özelliklerinin, sitotoksik etkilerinin ve hücre ölümüyle ilişkili moleküler mekanizmalarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomlara elektroporasyon yoluyla karboplatin yüklenmiş ve eksozom yüzeyi folik asitle modifiye edilerek FA-EXO-KP

kompleksi geliştirilmiştir. Hazırlanan kompleksin karakterizasyonu yapıldıktan sonra, sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkinliği L929 fibroblast hücrelerinde, antikanser etkinliği ise MDA-MB-231 hücrelerinde değerlendirilmiştir. FA-EXO-KP uygulamalarının hücre canlılığı ve sitotoksosite üzerindeki etkileri sırasıyla MTT ve LDH analizleriyle, oksidatif stres üzerindeki etkileri ise MDA ve KAT protein düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir. İnflamasyonla ilişkili hücresel yanıtların belirlenmesi amacıyla IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonları incelenmiştir. Ayrıca PINK1 ve Parkin proteinleri ile mitokondriyal süperoksit oluşumu MitoSOX kullanılarak değerlendirilmiş; P53/P21, BAX/BCL-2/BCL-xL ve kaspaz-9/kaspaz-3 gen düzeylerindeki değişimler analiz edilerek FA-EXO-KP tedavisinin mitokondriyal hasar, mitofajiyle ilişkili sinyalleşme ve intrinsik apoptotik yolak üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır.

Çalışmadan elde edilen bulgular, FA-EXO-KP kompleksinin serbest karboplatine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığı daha belirgin biçimde azalttığını, membran hasarını ve lipid peroksidasyonunu artırdığını ve hücresel antioksidan savunmayı baskıladığını göstermiştir. Ayrıca MitoSOX sinyalindeki artış, kompleks uygulamasının mitokondriyal süperoksit oluşumunu artırdığını ve belirgin bir mitokondriyal oksidatif stres oluşturduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte PINK1 ve Parkin immünofloresan sinyallerindeki artış, kompleks uygulamasının mitokondriyal hasar ve mitofajiyle ilişkili yanıtları uyarabildiğini göstermiştir. P53, P21 ve BAX, kaspaz-9 ve kaspaz-3 düzeylerindeki artış ile BCL-2 ve BCL-xL düzeylerindeki azalma ise FA-EXO-KP uygulamasının mitokondriyal aracılı intrinsik apoptotik sinyal kaskatını tetiklemiştir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, FA-EXO-KP kompleksinin TNBC hücrelerinde mitokondriyal oksidatif stresi artırdığı, PINK1/Parkin aracılı mitokondriyal yanıtı etkilediği ve intrinsik apoptotik sinyalleşmeyi serbest karboplatine kıyasla daha güçlü biçimde uyardığı düşünülmektedir.

5.1. MDA-MB-231 ve L929 Hücre Hatları

MDA-MB-231 hücre hattı, ER, PR ve HER2 ekspresyonlarının bulunmaması, yüksek invazyon kapasitesi ve mezenkimal özellikleri nedeniyle in vitro çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır (Arunasree, 2010; Razak et al., 2019; Yodkeeree et al., 2010). Plevral efüzyondan izole edilmiş olması, bu hücre hattının metastatik ve agresif bir fenotip taşıdığını göstermektedir. Bu özellikleri nedeniyle FA-EXO-KP kompleksinin antikanser etkinliğinin ve mitokondriyal hasar, oksidatif stres ve apoptotik yolak üzerindeki etkilerinin

araştırılması için uygun bir deneysel model olarak çalışmamızda MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. Bununla birlikte çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomların yeniden aynı hücre hattına uygulanması, bu eksozomların köken aldıkları hücrelerle gösterebileceği tercihli etkileşimden yararlanılarak karboplatinin tümör hücrelerine “Truva atı” benzeri bir mekanizmayla taşınmasını kolaylaştırmıştır.

FA-EXO-KP kompleksinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla L929 fibroblast benzeri hücre hattı kullanılmıştır. L929 hücreleri yüksek proliferasyon kapasitesi, kararlı kültür özellikleri ve sitotoksikite çalışmalarındaki yaygın kullanımı nedeniyle biyoyumluluk değerlendirmelerinde tercih edilen bir hücre hattıdır (Wiegand & Hipler, 2009). Bu nedenle L929 hücrelerinden elde ettiğimiz bulgular, kompleksin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisine ilişkin karşılaştırmalı bir ön değerlendirme sunmaktadır.

5.2. Eksozomların ve FA-EXO-KP Komplekslerinin Karakterizasyonu

Eksozomların doğru bir şekilde tanımlanması için morfolojik özelliklerin, parçacık boyutunun, yüzey yükünün ve eksozomlarla ilişkili protein belirteçlerinin tespiti gibi birbirini tamamlayan yöntemlerle karakterizasyonun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomlar; SEM, zeta potansiyeli analizi ve Western blot yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. SEM analizi ile eksozomların morfolojisi ve yaklaşık boyutları incelenmiş, zeta potansiyeli analizi ile süspansiyondaki elektrokinetik yüzey özelliklerinin değerlendirilmesi sağlanmış; Western blot analizi ile eksozomlarla ilişkili protein belirteçleri doğrulanmıştır. İlaç yüklenmemiş eksozomların SEM görüntülerinde yaklaşık 50,60–96,16 nm boyutlarında ve küresel morfolojiye sahip yapılar gözlenmiştir. İlaç yüklemesi sonrasında küresel yapı da korunmuştur. Elde edilen boyut aralığı, daha önce farklı tümör hücrelerinden ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomlar için bildirilen morfolojik bulgularla genel olarak uyumludur (Genc et al., 2023; Hannafon et al., 2016; Mahgoub & Abdella, 2023). Bununla birlikte, SEM analizinde uygulanan fiksasyon, kurutma ve kaplama işlemleri veziküllerin boyut ve morfolojisini etkileyebileceğinden, bu bulgular eksozomların sıvı ortamındaki gerçek hidrodinamik boyut dağılımını tek başına yansıtmayabilir (Mahgoub & Abdella, 2023). Bu nedenle Zeta potansiyeli ve Western Blot analizleri ile eksozom karakterizasyon işlemleri doğrulanmıştır.

Zeta potansiyeli analizinde boş eksozomların yüzey yükü $-28,9 \pm 5,01$ mV olarak belirlenmiştir. Eksozomların folik asitle modifiye edilmesinin ardından zeta potansiyelinin $-35,3 \pm 9,29$ mV'ye düşmesi, yüzey negatifliğinin arttığını göstermiştir. Bu değişim, folik asit modifikasyonu sonrasında eksozom yüzeyinin elektrokinetik özelliklerinde bir değişiklik olduğunu düşündürmektedir. Karboplatin yüklenmesinin ardından zeta potansiyeli $-31,8 \pm 7,73$ mV olarak ölçülmüş ve FA-EXO grubuna kıyasla daha az negatif özellik göstermiştir. Bununla birlikte, FA-EXO-KP kompleksinin yüzey yükü de boş eksozomlardan daha negatif bulunmuştur. Zeta potansiyeli ölçümünde meydana gelen bu değişim, folik asitle yüzey modifikasyonu ve karboplatin yüklenmesi sonrasında eksozomların yüzey özelliklerinde bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgular, literatürle kıyaslandığında her üç grupta da negatif yüzey yükünün ve tek baskın dağılım pikinin korunması, belirgin biçimde farklı yüklere sahip ikinci bir parçacık popülasyonunun gözlenmemesi ve komplekslerin koloidal kararlılıklarını koruyabilecek bir yüzey yüküne sahip olduğunu göstermektedir (Getnet Midekessa et al., 2020). Western blot analizinde eksozomlarla ilişkili CD63 ve CD81 proteinlerinin saptanması, izole edilen veziküllerin eksozomal özelliklerini desteklemiştir. Bu bulgular, eksozom karakterizasyonunda CD9, CD63, CD81 ve HSP70 gibi proteinlerin kullanıldığı önceki çalışmalarla uyumludur (G. Midekessa et al., 2020). SEM, zeta potansiyeli ve Western blot sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen yapıların eksozomlarla uyumlu morfolojik, yüzeysel ve protein temelli özellikler taşıdığı görülmüştür.

5.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

MTT reaktifi hücre içerisine girerek mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak formazan kristallerine indirgenmektedir. Bu nedenle elde edilen absorbans değerleri, doğrudan hücre sayısından ziyade hücre metabolik aktivitenin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilir ve elde edilen absorbans değeri hücre canlılığı ile doğru orantılı kabul edilir (Ghasemi et al., 2021). Bu nedenle MTT analizi, serbest antikanser ajanlar ile ilaç taşıyıcı sistemlerin konsantrasyon ve zamana bağlı sitotoksik etkilerinin karşılaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kong et al., 2018; Walker et al., 2019). Bu çalışmada, FA-EXO-KP kompleksinin antikanser etkinliği, MDA-MB-231 hücrelerinde 24 ve 72 saatlik uygulamaların ardından MTT analiziyle değerlendirilmiştir. Karboplatin monoterapisi grupları kontrol grubuna göre değerlendirilirken, FA-EXO-KP grupları ise karboplatin monoterapileri ile karşılaştırılmıştır. Literatürde, eksozom temelli ilaç taşıma sistemlerinin serbest kemoterapötik ajanlara kıyasla daha yüksek

hücre içi birikim sağlayarak sitotoksik etkinliği artırdığı bildirilmektedir (Cai & He, 2024; L. Qiao et al., 2020; Saari et al., 2015). Benzer şekilde, Hashemi ve arkadaşları, doğal öldürücü hücrelerden elde edilen eksozomlara yüklenen doksorubisinin, meme kanseri hücrelerinde serbest doksorubisine göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir (Hashemi et al., 2024). Çalışmamızda serbest karboplatin uygulaması, özellikle yüksek konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığın azalmasına neden olurken, aynı dozlarda uygulanan FA-EXO-KP kompleksinin sitotoksik etkinliğinin daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Uygulama grupları konsantrasyona bağlı olarak, sitotoksik etkinlik 24. saatte yaklaşık %4–13 arasında değişirken, bu farkın 72. saatte %12–40'a ulaştığı görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen bu bulgular, literatürle uyumlu olarak FA ile hedeflendirilmiş eksozomların karboplatinin antikanser etkinliğini artırabildiğini göstermektedir. Featherstone ve arkadaşları da karboplatinin düşük konsantrasyonlarda sağlıklı hücrelerde sınırlı toksisite oluşturduğunu, belirgin sitotoksik etkinin ise daha yüksek dozlarda ortaya çıktığını bildirmiştir (Featherstone et al., 1991). Bu nedenle antikanser etkinliğinin yanı sıra, FA-EXO-KP kompleksinin kanser dışı hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, L929 fibroblast benzeri hücrelerine uygulanmış ve 72 saat sonunda hücre canlılık seviyesi MTT ile analiz edilmiştir. Serbest karboplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla sınırlı bir azalma gözlenirken, FA-EXO-KP gruplarının büyük bölümünde MTT sinyalinin kontrol düzeyinin üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Özellikle 25 ve 500 nM gruplarında yaklaşık üç kat artışın gözlenmesi, kompleksin bu konsantrasyonlarda L929 hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığını göstermektedir.

Eksozom temelli taşıma sistemleri sayesinde serbest kemoterapötiklere kıyasla sağlıklı hücrelerde toksisitenin azaldığı, terapötik yükün vezikül içerisinde korunduğu, hücre dışı ortamda serbest ilaç miktarının azaldığı ve eksozomların kaynak veya hedef hücrelere gösterebildiği afinitelerinin arttığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Genç et al., 2021; Li Qiao et al., 2020). Qiao ve arkadaşları, tümör hücresi kaynaklı eksozomların köken aldıkları hücrelere tercihli yönelim gösterebildiğini ve bu özelliğin antikanser ajanların “Truva atı” benzeri bir mekanizmayla taşınmasında kullanılabileceğini göstermiştir (Li Qiao et al., 2020). Lee ve arkadaşları ise selumetinib yüklü glioblastoma kaynaklı eksozomların normal beyin hücrelerinde toksisite oluşturmadan antikanser etkinliği gösterdiğini bildirmiştir (Lee et al., 2022). Benzer şekilde, Bi ve arkadaşları tümör kaynaklı hücre dışı veziküllerin antikanser ilaçların hedef hücrelerde birikimini artırarak hedef dışı etkileri sınırlandırma potansiyeli taşıdığını bildirmiştir (Bi et al., 2024). Bu veriler, MDA-MB-231 kaynaklı eksozomların

karboplatinin L929 hücrelerindeki serbest maruziyetini sınırlandırmış olabileceğini göstermektedir.

MTT analizlerinden elde edilen bulguların doğrulanması amacıyla hücre membran bütünlüğünün göstergesi olan LDH düzeyleri de değerlendirilmiştir. Hücre zarının bozulmasıyla sitoplazmadan hücre dışına salınan LDH, hücre hasarını gösteren biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir (Jurisic et al., 2015). LDH, tümör hücrelerinde hücre zarında meydana getirdiği hasar nedeniyle hücre içi enzimleri salgılar; bunun sonucunda hücre içi mitokondriyal mekanizmanın bozulmasına ve apoptozun aktivasyonuna neden olur (Jurisic et al., 2015). Benzer şekilde, Kim ve arkadaşları doğal öldürücü hücre kaynaklı eksozomların farklı kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak LDH salınımını artırdığını ve bu artışın sitotoksosite ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (Kim et al., 2022). Çalışmamızda FA-EXO-KP 2,5, 5 ve 10 μ M gruplarında LDH düzeylerinin karboplatin monoterapisine göre belirgin şekilde artmıştır. MTT analizlerinde gözlenen hücre canlılığındaki azalmaya LDH düzeylerindeki artışın eşlik etmesi, FA-EXO-KP kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerinde serbest karboplatinden daha belirgin membran hasarı ve sitotoksosite oluşturduğunu göstermektedir.

5.4. Oksidatif Hasar Belirteçlerinin (MDA, KAT, MitoSOX) Değerlendirilmesi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile hücresel antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkar. Artan ROS seviyeleri lipidler, proteinler, DNA ve mitokondriyal yapılar üzerinde hasara neden olur ve hücreleri apoptoza yönlendirir (Waris & Ahsan, 2006). Bu çalışmada FA-EXO-KP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen oksidatif hasarın tespit edilmesi amacıyla, lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA ve antioksidan savunmada görev alan KAT düzeyleri değerlendirilmiştir (Zorov et al., 2014). Mitokondriyal süperoksit oluşumunun tespiti, MitoSOX Red floresan boyası kullanılarak analiz edilmiştir.

FA-EXO-KP ile tedavi sonrasında, tedavi gruplarında MDA düzeyleri, serbest karboplatin grubuna kıyasla, konsantrasyona bağlı olarak artmıştır. FA-EXO-KP 5 μ M grubunda MDA düzeyi karboplatine göre yaklaşık %200 artarken, 10 μ M grubunda bu artış yaklaşık %280'e ulaşmıştır. MDA düzeyindeki bu belirgin yükselme, FA-EXO-KP uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde lipid peroksidasyonunu serbest karboplatinden daha fazla artırdığını göstermektedir. Hücre arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada,

karboplatinin hücre içi ROS birikimini artırarak mitokondriyal apoptotik yanıtı güçlendirdiği ve antioksidan uygulamasının bu etkileri kısmen baskıladığı gösterilmiştir (P. J. He et al., 2018). Benzer şekilde, hidroperoksit metabolizmasının baskılanmasının meme ve akciğer kanseri hücrelerini karboplatine karşı duyarlı hâle getirdiğinin gösterilmesi, hücrel redoks dengesinin karboplatin etkinliğinde önemli bir belirleyici olduğunu desteklemektedir (Grotto et al., 2009; Sciegienka et al., 2017). Çalışmamızda kullandığımız FA-EXO-KP kompleksi, serbest karboplatine kıyasla MDA düzeylerinde belirgin bir artışa neden olmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular eksozom aracılı taşımanın karboplatinin hücre içi etkinliğini artırarak antioksidan savunma kapasitesinin aşılmasına ve daha yoğun lipid peroksidasyonunun oluşmasına yol açtığını göstermektedir.

Ökaryotik hücrelerde, enzimatik (SOD, KAT ve GPX) ve enzimatik olmayan antioksidanlar da dahil olmak üzere çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu nedenle, ROS üretimi ve temizlenmesi arasındaki hücrel denge fizyolojik koşullar altında işler (Arsova-Sarafinowska et al., 2009; Diehn et al., 2009; Sant et al., 2018). Katalaz, hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürerek hücre içi H_2O_2 birikimini ve hidroperoksit kaynaklı oksidatif hasarı sınırlandıran temel antioksidan enzimlerden biridir (Ighodaro & Akinloye, 2018). Bu nedenle KAT düzeyindeki azalma, kompleksin oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücrel antioksidan savunmanın yetersiz kalmasına ve lipid peroksidasyonunun artmasına, yol açmaktadır. Bu nedenle meme kanseri hücreleri, yüksek bazal oksidatif stres koşullarında canlılıklarını sürdürebilmek için katalaz ve diğer antioksidan sistemlere bağımlı olabilir. Bu savunma sistemlerinin güçlenmesi, özellikle TNBC hücrelerinde ROS aracılı hasarı sınırlandırarak tedavi direncinin gelişmesine neden olurken, katalaz kapasitesinin azalması hücreleri prooksidan antikanser tedavilere karşı daha duyarlı hâle getirebilir ve apoptoza yönlendirebilir (Bressenot et al., 2009; Walsh et al., 2008). MDA sonuçlarının aksine, KAT seviyelerinde konsantrasyona bağlı azalma FA-EXO-KP tarafından oluşturulan serbest oksidan radikallerinin hücrel antioksidan savunma kapasitesini ortadan kaldırdığına işaret etmektedir. KAT düzeyleri karboplatine göre FA-EXO-KP 2,5 ve 5 μM gruplarında yaklaşık %36, FA-EXO-KP 10 μM grubunda ise yaklaşık %65 azalmıştır. MDA artışı ve KAT azalmasının birlikte görülmesi, FA-EXO-KP kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerinde prooksidan–antioksidan dengeyi oksidatif hasar yönünde değiştirdiğini desteklemektedir. Bu bulgular, folik asitle modifiye edilmiş ve erastin yüklenmiş eksozomların MDA-MB-231 hücrelerinde MDA düzeyini artırırken antioksidan savunmanın önemli bir bileşeni olan glutasyonu azalttığını bildiren Yu ve arkadaşlarının sonuçlarıyla genel olarak uyumludur (Yu et al., 2019).

Bu doğrultuda, çalışmamızda KAT düzeyindeki azalmaya MDA ve MitoSOX sinyallerindeki artışın eşlik etmesi, FA-EXO-KP kompleksinin mitokondriyal oksidan üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırırken antioksidan savunmayı zayıflattığını, böylece hücrel redoks dengesini oksidatif hasar yönünde değiştirdiğini desteklemektedir. Oluşan oksidatif hasar, FA-EXO-KP kompleksinin serbest karboplatine göre daha güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini desteklemektedir.

5.5. İnflamatuvar Etkinliğin Tespit Edilmesi

Sitokinler, meme kanserinde tümör hücreleri ile stromal ve immün hücreler arasındaki iletişimi düzenleyerek tümör oluşumundan metastatik kolonizasyona kadar uzanan birçok aşamada rol oynamaktadır. Méndez-García ve arkadaşları, sitokinlerin yalnızca bağışıklık hücrelerinden salgılanan inflamatuvar aracılar olmadığını; tümör ve stromal hücreler tarafından da üretilbildiğini ve otokrin/parakrin mekanizmalar aracılığıyla proliferasyon, migrasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastatik niş oluşumunu etkileyebildiğini vurgulamıştır (Mendez-Garcia et al., 2019). Bu değerlendirmeye göre sitokinler ve büyüme faktörleri, TNBC'nin gelişimi, invazyonu, metastazı ve tedavi direncinde belirleyici rol oynayan biyolojik süreçlerden biridir (Mendez-Garcia et al., 2019). Tümör hücreleri ile stromal ve immün hücreler arasında gerçekleşen sitokin aracılı iletişim, tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesini ve kanser hücrelerinin değişen çevresel koşullara uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır (Abubakar et al., 2023). IL-1 β , IL-6 ve IL-10 sitokin aracılı iletişimin önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. IL-1 β ve IL-6 genellikle proinflamatuvar ve tümör destekleyici etkilerle ilişkilendirilirken, IL-10 başlıca immün düzenleyici ve antiinflamatuvar özellikler göstermektedir (Kany et al., 2019). Bununla birlikte, bu sitokinlerin biyolojik etkileri hücrel kaynaklarına, konsantrasyonlarına, maruziyet süresine ve tümör mikroçevresindeki diğer sinyallerle etkileşimlerine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Habanjar et al., 2023; Kany et al., 2019; Landskron et al., 2014). Çalışmamızda IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonlarındaki değişiklikler doğrudan TNBC hücrelerinin FA-EXO-KP tedavisine karşı geliştirdiği inflamasyonla ilişkili moleküler yanıt olarak değerlendirildi. Kanser hücreleri, klasik immün hücrelerin yokluğunda da sitokin sentezleyebilir. Bu nedenle otokrin veya parakrin sinyalleşme yoluyla proliferasyon, sağkalım, migrasyon ve tedavi direncinin gelişmesinde rol oynar (Turlej et al., 2025). Dolayısıyla elde ettiğimiz sonuçlar tümör mikroçevresindeki tam inflamatuvar yanıtı temsil etmemekle birlikte, FA-EXO-KP

kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerine özgü sitokin ekspresyon profilini nasıl değiştirdiğine ilişkin bilgi sunmaktadır.

Çalışmamızda, 72 saatlik tedavi sonrasında FA-EXO-KP 10 μ M grubunda IL-1 β gen ekspresyonu, eşdeğer serbest karboplatin grubuna kıyasla yaklaşık %30 azalmıştır. IL-1 β , fibroblastlar, makrofajlar, endotel hücreleri ve diğer immün hücrelerle kurulan iletişimi düzenleyerek anjiyogenez ve metastaza uygun bir mikroçevrenin oluşmasına katkıda bulunabilmektedir. Nisar ve arkadaşları, IL-1 β uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde p38/MAPK ve PI3K/AKT yollarını aktive ettiğini; VEGFR-1, MMP-2 ve MMP-9 gibi vasküler benzerlik ve invazyonla ilişkili belirteçleri artırdığını göstermiştir (Nisar et al., 2021). Scordamaglia ve arkadaşları, IL-1 β /IL-1R1 ekseninin MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyonu, üç boyutlu sferoid büyümesini ve motiliteyi desteklediğini göstermiştir (Scordamaglia et al., 2025). Çalışmamızda IL-1 β ekspresyonunun azaldığı ve FA-EXO-KP kompleksinin, serbest karboplatine göre daha etkili biçimde IL-1 β aracılı sinyalleşmeyi baskıladığı tespit edilmiştir.

IL-1 β ile benzer şekilde, FA-EXO-KP 10 μ M grubunda IL-6 gen ekspresyonu serbest karboplatine kıyasla yaklaşık %20 azalmıştır. IL-6, TNBC’de özellikle JAK/STAT3, PI3K/AKT ve MAPK/ERK yolları aracılığıyla hücre proliferasyonuna, invazyona ve tedavi direncine yol açan bir sitokindir. Sürekli IL-6/JAK/STAT3 aktivasyonu, antiapoptotik genlerin ekspresyonunu ve kanser kök hücresi özelliklerini güçlendirirken tümör hücrelerinin sitotoksik tedavilere duyarlılığını azaltabilmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde IL-6 ekspresyonunun diğer bazı meme kanseri hücrelerine göre daha yüksek olduğu ve IL-6’nın baskılanmasının proliferasyon ile invaziv fenotipi sınırlandırabildiği gösterilmiştir (Luan et al., 2017). Güncel bir çalışmada IL-6 uygulamasının invaziv MDA-MB-231 hücrelerinde MCT-1, IL-6R, PD-L1, CXCL7/CXCR2 ve fosforile EGFR düzeylerini konsantrasyona bağlı olarak artırdığı; IL-6’nın susturulmasının ise bu tümör destekleyici molekülleri baskıladığı bildirilmiştir (Haq et al., 2024). Qu ve arkadaşları, onkojenik K-Ras ile oluşturulan deneysel akciğer kanseri modelinde IL-6’nın tümör başlangıcı ve ilerlemesi üzerinde birbirine zıt etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Çalışmada IL-6 erken dönemde tümörün başlamasını sınırlandırırken, oluşmuş tümörlerin sonraki büyümesine ve ilerlemesine neden olduğu tespit edilmiştir (Qu et al., 2015). Bu bulgular, IL-6’nın yalnızca inflamatuvar yanıtı değil, aynı zamanda metabolik adaptasyonu, sitokinleri ve metastatik özellikleri de düzenleyebildiğini göstermektedir. Bu nedenle, çalışmamızda IL-6 gen ekspresyonunun azalması, FA-EXO-KP kompleksinin inflamasyonla

bağlantılı tümör destekleyici sinyalleşmeyi serbest karboplatine kıyasla baskıladığını göstermektedir.

IL-10 ise genellikle inflamasyonu baskılayan ve bağışıklık yanıtını düzenleyen sitokinlerden biridir (Moore et al., 2001; Stevens Barron et al., 2023). Ayrıca protümöral inflamatuvar yanıtların sınırlandırılması ve tümörle ilişkili anjiyogenezin düzenlenmesi gibi kanser biyolojisiyle ilişkili süreçlerde de görev almaktadır (Dennis et al., 2013). IL-10, kronik protümöral inflamasyonu ve inflamasyonla ilişkili doku hasarını azaltarak tümör ilerlemesini sınırlayabilir. Buna karşılık, antijen sunan hücrelerin, sitotoksik T lenfositlerinin ve NK hücrelerinin etkinliğini baskılayarak tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasına da katkıda bulunabilir. Méndez-García ve arkadaşları da IL-10'un meme kanseri metastazındaki etkisinin tek yönlü olmadığını; sitokinin hücresel kaynağına, konsantrasyonuna, reseptör dağılımına ve tümör mikroçevresindeki diğer sinyallere göre antitümör veya protümör özellik gösterebildiğini vurgulamıştır (Mendez-Garcia et al., 2019). Moore ve arkadaşları, IL-10'un monosit ve makrofajlarda IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayabildiğini; ayrıca MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak antijen sunumunu sınırlandırabildiğini bildirmiştir (Moore et al., 2001). Bu nedenle çalışmamızdaki IL-10 artışına IL-1 β ve IL-6 azalmasının eşlik etmesi, bu sitokinler arasında IL-10 ile uyumlu bir karşı düzenleyici ilişki bulunabileceğini düşündürmektedir. IL-1 β ve IL-6 sonuçlarının aksine, IL-10 gen ekspresyonu FA-EXO-KP 2,5, 5 ve 10 μ M gruplarında anlamlı olarak artmış; en belirgin artışın 10 μ M grubunda yaklaşık %90 olduğu tespit edilmiştir. IL-10 seviyesinde meydana gelen bu artış, FA-EXO-KP uygulaması sonrasında gelişen antiinflamatuvar veya hücresel stresle ilişkili düzenleyici bir yanıt olarak değerlendirilebilir (Stevens Barrón et al., 2023).

Sonuç olarak, bulgularımız FA-EXO-KP kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerinde IL-1 β , IL-6 ve IL-10 ekspresyonunu değiştirerek inflamasyonla ilişkili moleküler yanıtı düzenlediğini göstermektedir. Sitokin ekspresyonundaki bu değişiklikler, FA-EXO-KP kompleksinin doğrudan düzenleyici etkisinin yanı sıra serbest karboplatine göre daha güçlü sitotoksikite ve oksidatif stres oluşturmaya da ilişkili olabilir. Özellikle 72. saatte hücre hasarının ve canlılık kaybının belirginleşmesi, gözlenen değişikliklerin kısmen hücresel stresin veya tedaviye duyarlı hücrelerin kaybının ikincil sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

5.6. Mitofaji ve Apoptozun PINK1, Parkin, P21, P53, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Ekspresyonları Üzerinden Değerlendirilmesi

Karboplatin başta DNA olmak üzere çeşitli hücrel yapılar da hasar meydana getirirken mitokondriyal ROS üretimini de artırabilmektedir. ROS üretiminde meydana gelen bu artış, hücrede DNA hasarına yol açar ve hasarın tamir edilmesi için DNA tamir mekanizmalarıyla ilgili moleküllerin ortaya çıkmasına neden olur. Oluşan DNA hasarı ATM (ataxia telangiectasia mutated) ve ATR (ATM and Rad3-related) kinazları tarafından algılanarak P53 proteinini fosforile ederek stabilizasyonunu sağlamaktadır (Shiloh, 2001). Aktive olan p53, oluşan hasarın şiddetine ve süresine bağlı olarak hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, senesens veya apoptoz arasında hücrel karar verilmesinde merkezi rol oynamaktadır. p53'ün önemli transkripsiyonel hedeflerinden biri olan P21, siklin bağımlı kinazları (CDK2, CDK4 ve CDK6) inhibe ederek siklin-CDK komplekslerinin aktivitesini baskılar ve hücre döngüsünü özellikle G1/S kontrol noktasında durdurur. Hücre döngüsünün geçici olarak durdurulması, DNA onarım mekanizmalarına zaman kazandırarak hasarın giderilmesine olanak sağlar (Phan & Rezaeian, 2021). Bununla birlikte, hasarın onarılamayacak düzeye ulaşması durumunda p53, BAX gibi proapoptotik genlerin ekspresyonunu artırırken Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinlerin etkisini sınırlandırarak mitokondri aracılı intrinsik apoptotik yolu aktive eder (Mirzayans et al., 2012).

Oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına ve hasarlı mitokondrilerin birikmesine neden olabilmektedir. Sağlıklı mitokondrilerde PINK1, iç mitokondriyal membrana taşındıktan sonra proteolitik olarak parçalanır. Hasarlı hücrelerde ise mitokondriyal membran potansiyelinin kaybıyla PINK1 parçalanamaz ve mitokondri dış membranında aşırı miktarda birikim gösterir. Biriken PINK1, E3 ubiquitin ligazı olan Parkin'i sitozolden mitokondri yüzeyine çekerek aktive eder (Bingol & Sheng, 2016; Zhao et al., 2019). Aktif Parkin, çok sayıda dış membran proteinini ubiquitinleyerek hasarlı mitokondrilerin otofagozomlar tarafından tanınmasını sağlar ve seçici mitofaji sürecini başlatır. Artan mitofajik yük intrinsik yolları aktive eder (Narendra et al., 2008). Bu aktivasyon, Bcl-2 protein ailesi üyeleri arasındaki dengeyi değiştirir. Normal koşullarda Bcl-2 ve Bcl-xL, BAX'a bağlanarak aktivasyonunu ve mitokondri dış membranında oligomerleşmesini engeller. Böylece mitokondriyal dış membran geçirgenliği korunur ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması önlenir. Ancak homeostazın bozulmasıyla BAX ekspresyonu artarken Bcl-2 ve Bcl-xL düzeyleri azalır veya fonksiyonel olarak baskılanmaya başlar. Sonuç olarak, BAX dimerleşerek

mitokondri zarında porlar oluşturur. Mitokondri dış membranında oluşan bu porlardan sitokrom c sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve ATP/dATP ile birleşerek apoptosomu oluşturur. Apoptosom, kaspaz ailesinden başlatıcı prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9'a dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9, yürütücü kaspazlardan biri olan prokaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır. Aktif kaspaz-3; PARP, nükleer laminler ve hücre iskeleti proteinleri gibi çok sayıda hücrel substratı parçalayarak kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, hücrel yapının bozulması ve apoptotik cisimciklerin oluşması gibi apoptoza özgü değişikliklerin gelişmesine aracılık etmektedir. Bu nedenle kaspaz-9 ve kaspaz-3 düzeylerinin birlikte artması, mitokondri aracılı intrinsik apoptotik yolun uyarıldığına işaret etmektedir (Budihardjo et al., 1999; Zimmermann & Green, 2001).

Çalışmamızda elde edilen bulgular, oksidatif stres ile mitokondriyal membran hasarı arasındaki etkileşim aracılığıyla intrinsik apoptotik yolun aktive edildiğini göstermektedir. Yetmiş iki saatlik FA-EXO-KP uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde oksidatif stresi artırdığı, MDA ve MitoSOX sinyallerini yükselttiği ve katalaz düzeyini azalttığı belirlenmiştir. Bu değişikliklere PINK1 ve Parkin floresans sinyallerindeki konsantrasyona bağlı artışın eşlik etmesi, FA-EXO-KP'nin oluşturduğu oksidatif yükün mitokondriyal hasara neden olduğunu ve bu hasara karşı PINK1/Parkin ile ilişkili mitofaji yanıtının uyarıldığını düşündürmektedir. PINK1 ve Parkin sinyallerinin eşdeğer serbest karboplatin gruplarından daha yüksek olması, eksozomal kompleksimizin mitofaji yanıtını uyarıldığını göstermektedir. Benzer şekilde, Varangalon'un mitokondriyal apoptozu indüklediğini gösteren bir çalışmada meme kanseri hücrelerinde 12 saat boyunca Varangalon ile tedavi edilmiş ve PINK1/Parkin aracılı mitofajinin aktive olduğu gösterilmiştir (Mao et al., 2021). Çalışmamızda PINK1 ve Parkin seviyeleri immüno Floresan yöntemlerle incelenmiştir. Elde edilen görüntülerde PINK1 ışımalarının kontrol grubunda minimal seviyede olduğu tespit edilirken, kompleks gruplarda bu oran doza bağlı olarak artış göstermektedir. Karboplatin monoterapisine göre kompleks gruplardaki PINK1 ışımaları daha yüksektir. Parkin sonuçları ise PINK1 bulgularıyla korelasyon göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgular Yin ve arkadaşlarının doksorubisinin kardiyotoksitesinin mitofaji üzerindeki etkisini değerlendirdikleri ve PINK1 ve Parkin düzeylerinin arttığını bildirdikleri çalışmayla da uyumludur (Yin et al., 2018).

TNBC'ler belirgin moleküler heterojeniteye ve tedavi direncine sahip olduğundan, kabul edilebilir bir toksisite profiliyle birden fazla hücrel mekanizmayı hedefleyebilen tedavi

yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bazal benzeri TNBC'lerin yaklaşık %60'ında TP53 mutasyonlarının bulunduğu ve bu mutasyonların büyük bölümünün p53 proteininin DNA bağlanma bölgesinde meydana geldiği bildirilmiştir (Shah et al., 2012) . Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 hücreleri de p53'ün DNA bağlanma bölgesinde yer alan R280K yanlış anlamlı mutasyonunu taşımaktadır. Mutant p53'ün bazı kanser hücrelerinde nükleotid eksizyon onarım mekanizmalarını bozabileceği ve platin ajanlarının oluşturduğu DNA çapraz bağlarının giderilmesini sınırlandırarak bu hücrelerin platin temelli tedavilere duyarlılığını artırmaya çalışılmıştır (Guo et al., 2025; Sengupta & Harris, 2005). DNA hasarı ve hücre döngüsü yanıtıyla ilişkili belirteçler değerlendirildiğinde, p53 düzeylerinin FA-EXO-KP 1, 2,5, 5 ve 10 µM gruplarında eşdeğer serbest karboplatin gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %14, %27, %41 ve %50 arttığı belirlenmiştir. p21 düzeyleri de p53 ile paralel bir değişim göstermiş ve en belirgin artış FA-EXO-KP 10 µM grubunda yaklaşık %42 olarak saptanmıştır. Konsantrasyona bağlı bu değişiklikler, özellikle 5 ve 10 µM FA-EXO-KP uygulamalarının DNA hasarı ve hücre döngüsü kontrolüyle ilişkili stres yanıtını serbest karboplatinden daha güçlü biçimde uyardığını düşündürmektedir. p21 artışının da yalnızca p53 aracılı bir yanıt tetiklediğini göstermektedir. p21, klasik olarak yabancı tip p53'ün transkripsiyonel hedeflerinden biri olmakla birlikte, TGF-β, Sp1, STAT, BRCA1 ve çeşitli stresle ilişkili sinyal mekanizmaları üzerinden p53'ten bağımsız olarak da düzenlenebilmektedir. Nitekim MDA-MB-231 hücrelerinde p53'ten bağımsız p21 indüksiyonu ve bunun büyüme ile sağkalım yanıtları üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Maiti et al., 2017).

Yetmiş iki saatlik tedavi sonrasında FA-EXO-KP 1, 2,5, 5 ve 10 µM gruplarında BAX seviyelerinin karboplatin monoterapisine göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. En yüksek artış FA-EXO-KP 10 µM grubunda gözlenmiş olup yaklaşık %50 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, Bcl-2 seviyeleri tedavi dozuna bağlı olarak azalmıştır. Özellikle FA-EXO-KP 2,5, 5 ve 10 µM gruplarında, karboplatin monoterapisine göre belirgin bir düşüş saptanmıştır. En fazla azalma, FA-EXO-KP 10 µM grubunda gerçekleşmiştir (%47). Bcl-2 ile benzer şekilde değişim gösteren Bcl-xL ekspresyonunda da doza bağlı bir azalma saptanmıştır. Bcl-2'den farklı olarak, FA-EXO-KP 1 µM grubunda da karboplatin monoterapisine göre yaklaşık %20 oranında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. En belirgin azalma yine FA-EXO-KP 10 µM grubunda tespit edilmiş ve yaklaşık %43 olarak hesaplanmıştır.

Proapoptotik BAX ekspresyonundaki doza bağlı artış ile antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL seviyelerindeki azalma birlikte değerlendirildiğinde, FA-EXO-KP tedavisinin intrinsik

apoptotik yolu karboplatin monoterapisine göre daha güçlü şekilde aktive ettiği gör÷lmektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatürle uyumlu görünmektedir. Uslu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada trombosit kaynaklı eksozomlara doksorubisin yüklenmiş ve MDA-MB-231 hücre hattında antikanser etkinliği değeriendirilmiştir. Bulgularında ise tedaviyle birlikte BAX seviyelerinde azalma, Bcl-2 seviyelerinde artış tespit edilmiştir (Uslu et al., 2024).

Apoptotik süreçte önemli rol oynayan kaspaz ailesinin etkinliklerinin değeriendirilmesi amacıyla Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeyleri analiz edilmiştir. 72 saatlik tedavi sonunda FA-EXO-KP 1, 2,5, 5 ve 10 µM gruplarında Kaspaz-3 seviyelerinin hem kontrol grubuna hem de FA-EXO ve karboplatin 10 µM gruplarına göre arttığı belirlenmiştir. Özellikle FA-EXO-KP 10 µM grubunda Kaspaz-3 seviyesi karboplatin monoterapisine göre yaklaşık %270 artış göstermiştir. Elde edilen bulgular, Tang ve arkadaşlarının M1 makrofaj kaynaklı eksozomlara yüklenen gempitabinin mesane kanseri hücrelerinde kaspaz-3 protein ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığını bildirdikleri çalışma ile korelasyon göstermektedir (Tang et al., 2022).

Kaspaz-9 seviyeleri de Kaspaz-3 ile uyumlu bir değışim göstermiştir. Karboplatin monoterapisine göre FA-EXO-KP 5 µM ve FA-EXO-KP 10 µM gruplarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 düzeylerinde birlikte gözlenen bu artış, mitokondri aracılı intrinsik apoptotik yolun aktive olduğunu ve hücrelerin programlı hücre ölümüne yönlendirildiğini göstermektedir. Bu bulgular, eksozom aracılı antikanser ajan taşınımının apoptozu güçlendirdiğini gösteren literatürle uyumludur. Nitekim yapılan bir çalışmada, süt kaynaklı eksozomlara yüklenen kurkumin ve resveratrolün meme kanseri hücrelerinde kaspaz-9 aktivasyonunu anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir (Gonzalez-Sarrias et al., 2022).

6. SONUÇ

Çalışmada elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, folik asit (FA) ile hedeflendirilmiş ve karboplatin yüklü homotipik eksozomların (FA-EXO-KP), TNBC hücrelerinde karboplatin monoterapisine kıyasla yaklaşık %12–40 oranında daha yüksek antikanser etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Geliştirilen kompleks yapı, hücre canlılığını azaltmış, oksidatif stresi artırmış, inflamatuvar yanıtı baskılamış ve DNA hasarını indüklemiştir. Bunun yanı sıra, PINK1/Parkin aracılı mitofajiyi aktive ettiği, artan dozlara bağlı olarak BAX ekspresyonunu artırırken Bcl-2 ve Bcl-xL düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle FA-EXO-KP'nin 5 μ M ve 10 μ M dozlarında P53 ve P21 aktivasyonunun arttığını ve buna bağlı olarak DNA hasar yanıtının uyarılmasının sağlandığını göstermiştir. Pro-apoptotik BAX ekspresyonundaki artış ile anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL düzeylerindeki azalma, hücre içi dengenin apoptotik yönde değiştiğini ortaya koymuştur. Bu değişimlere paralel olarak kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunun artması, hedeflendirilmiş karboplatin yüklü eksozomların intrinsik apoptotik mekanizmayı karboplatin monoterapisine göre daha etkin biçimde uyardığını göstermektedir.

Her ne kadar terapötik etkinlikte gözlenen artış sınırlı düzeyde olsa da, hücresel ve moleküler düzeyde elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen hedeflendirilmiş eksozomal taşıma sisteminin karboplatinin antikanser etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmanın dikkat çekici bulgularından biri, geliştirilen sistemin sağlıklı hücrelerde düşük toksisite profili göstermesidir. L929 fibroblast hücrelerinde elde edilen canlılık sonuçları, FA-EXO-KP gruplarının büyük çoğunluğunda belirgin bir sitotoksisite oluşturmadığını göstermiştir. Hatta düşük doz FA-EXO-KP uygulamalarında hücre canlılığının kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat arttığı belirlenmiştir.

Kanser tedavisindeki temel hedeflerden biri, tümör hücrelerinde terapötik etkinliği artırırken normal dokular üzerindeki yan etkileri en aza indirmektir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen, folik asit ile fonksiyonelleştirilmiş ve karboplatin yüklü homotipik eksozomların, karboplatin monoterapisine göre daha yüksek antitümör etkinlik göstermesi ve sağlıklı hücrelere yönelik toksisiteyi azaltması, geliştirilen sistemin önemli bir avantajını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, MDA-MB-231 kaynaklı, folik asit ile hedeflendirilmiş karboplatin yüklü homotipik eksozomlar, TNBC tedavisinde hedefe yönelik bir ilaç taşıma sistemi olarak umut vadeden bir yaklaşıml sunmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen bulguların in vivo çalışmalarla doğrulanması, farmakokinetik, farmakodinamik ve biyodağılım analizleriyle desteklenmesi, geliştirilen sistemin klinik uygulanabilirliğinin ortaya konulması açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- ATCC (2026), *L929*. [Erişim: 20.07.2026, <https://www.atcc.org/products/ccl-1>]
- DSMZ (2026), *MDA-MB-231*. [Erişim: 20.07.2026, <https://www.webshop.dsmz.de/en/human-animal-cell-lines/MDA-MB-231.html?utm>]
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2026), *Breast Cancer*. [Erişim: 18.05.2026, <https://www.iarc.DSÖ.int/news-events/breast-cancer-cases-and-deaths-are-projected-to-rise-globally/?utm>]
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2024), *1-31 Ekim Meme Kanseri Farkındalık Ayı*. [Erişim: 06.07.2026, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler-kanser/1-31-ekim-meme-kanseri-farkindalik-ayi.html>].
- Türkiye Kanser Enstitüsü (TKE) (2026), *1-31 Ekim Meme Kanseri Farkındalık Ayı*. [Erişim: 06.07.2026, <https://tke.tuseb.gov.tr/tr/haberler/1-31-ekim-meme-kanseri-farkindalik-ayi-20251022>]
- World Health Organization (DSÖ) (2026), *Breast Cancer*. [Erişim: 29.03.2026, <https://www.DSÖ.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>]
- World Health Organization (DSÖ) (2026), *DSÖ Classification of Tumours online*. [Erişim: 09.07.2026, <https://tumourclassification.iarc.DSÖ.int/welcome/#>]
- Abubakar, M., Rasool, H. F., Javed, I., Raza, S., Abang, L., Hashim, M. M. A., Saleem, Z., Abdullah, R. M., Faraz, M. A., Hassan, K. M., & Bhat, R. R. (2023). Comparative Roles of IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22, IL-33, and IL-37 in Various Cardiovascular Diseases With Potential Insights for Targeted Immunotherapy [Review]. *Cureus*, 15(7), e42494.
- Admoun, C., & Mayrovitz, H. N. (2022). The etiology of breast cancer.
- Ahlatcı, A., Yıldızhan, K., Keleş, Ö. F., Bayir, M. H., & Çınar, R. (2026). The effect of hesperidin on trigeminal nerve damage in an NTG-induced migraine model: the role of the TRPV1 channel. *Molecular biology reports*, 53(1), 1-12.
- Ahmadi, M., Ritter, C. A., von Woedtke, T., Bekeschus, S., & Wende, K. (2024). Package delivered: folate receptor-mediated transporters in cancer therapy and diagnosis. *Chemical Science*, 15(6), 1966-2006.
- Al Shehadat, S., Gorduysus, M. O., Hamid, S. S. A., Abdullah, N. A., Samsudin, A. R., & Ahmad, A. (2018). Optimization of scanning electron microscope technique for amniotic membrane investigation: A preliminary study. *European journal of dentistry*, 12(04), 574-578.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341-345.
- Amptoulach, S., & Tsavaris, N. (2011). Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemotherapy research and practice*, 2011(1), 843019.
- Andreopoulou, E., & Sparano, J. A. (2013). Chemotherapy in patients with anthracycline and taxane-pretreated metastatic breast cancer: an overview. *Current breast cancer reports*, 5(1), 42-50.
- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., & Siesling, S. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The breast*, 66, 15-23.

- Arsova-Sarafinovska, Z., Eken, A., Matevska, N., Erdem, O., Sayal, A., Savaser, A., Banev, S., Petrovski, D., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Ozgok, Y., Suturkova, L., Dimovski, A. J., & Aydin, A. (2009). Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Biochem*, 42(12), 1228-1235.
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588.
- Augusto, T. A. S. V. (2021). *Aromatase inhibitors in breast cancer: drug discovery and strategies to overcome acquired resistance* Universidade do Porto (Portugal)].
- Awwad, M., & North, R. J. (1988). Cyclophosphamide (Cy) Facilitated Adoptive Immunotherapy of a Cy-Resistant Tumor - Evidence That Cy Permits the Expression of Adoptive T-Cell Mediated Immunity by Removing Suppressor T-Cells Rather Than by Reducing Tumor Burden. *Immunology*, 65(1), 87-92. <Go to ISI>://WOS:A1988Q173100014
- Bagnoli, M., Tomassetti, A., Figini, M., Flati, S., Dolo, V., Canevari, S., & Miotti, S. (2000). Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to α -folate receptor overexpression. *Oncogene*, 19(41), 4754-4763.
- Batra, H., Mouabbi, J. A., Ding, Q., Sahin, A. A., & Raso, M. G. (2023). Lobular carcinoma of the breast: a comprehensive review with translational insights. *Cancers*, 15(22), 5491.
- Benacka, R., Szabóová, D., Gulasová, Z., Hertelyová, Z., & Radonák, J. (2022). Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*, 14(21).
- Bi, Y., Chen, J., Li, Q., Li, Y., Zhang, L., Zhida, L., Yuan, F., & Zhang, R. (2024). Tumor-derived extracellular vesicle drug delivery system for chemo-photothermal-immune combination cancer treatment. *Iscience*, 27(2).
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(11), 674-690.
- Bingol, B., & Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 210-222.
- Bombonati, A., & Sgroi, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of pathology*, 223(2), 308-318.
- Bou Zerdan, M., Ghorayeb, T., Saliba, F., Allam, S., Bou Zerdan, M., Yaghi, M., Bilani, N., Jaafar, R., & Nahleh, Z. (2022). Triple negative breast cancer: updates on classification and treatment in 2021. *Cancers*, 14(5), 1253.
- Bouchkouj, N., Kasamon, Y. L., De Claro, R. A., George, B., Lin, X., Lee, S., Blumenthal, G. M., Bryan, W., McKee, A. E., & Pazdur, R. (2019). FDA approval summary: axicabtagene ciloleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1702-1708.
- Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., & Plenat, F. (2009). Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J Histochem Cytochem*, 57(4), 289-300.
- Buchdunger, E., O'Reilley, T., & Wood, J. (2002). Pharmacology of imatinib (STI571). *European journal of cancer*, 38, S28-S36.

- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 269-290.
- Bulut, M., & Akar, E. (2012). Dendrimerlerin önemi ve kullanım alanları. *Teknik Bilimler Dergisi*, 2(1), 5-11.
- Burke, E. E., Kodumudi, K., Ramamoorthi, G., & Czerniecki, B. J. (2019). Vaccine therapies for breast cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 28(3), 353-367.
- Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C., & Kaelin, C. M. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *New England Journal of Medicine*, 350(14), 1430-1441.
- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., & Chang, J. C. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1688-1698.
- Cai, W., & He, D. (2024). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes improve cancer drug delivery in human cell lines and a mouse osteosarcoma model. *Frontiers in Oncology*, 14, 1482087.
- Calvert, A., Harland, S., Newell, D., Siddik, Z., Jones, A., McElwain, T., Raju, S., Wiltshaw, E., Smith, I., & Baker, J. (1982). Early clinical studies with cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 9(3), 140-147.
- Celebi, D., Baser, S., Mahmoudnezhad, A., Ari, B., Celebi, O., Genc, S., Nigde, E., Karabulut, K., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2026). Redox-mediated activation of PI3K/PTEN pathways by A. baumannii OMV-V. myrtillus conjugate in pancreatic cancer cells. *Archives of Microbiology*, 208(8), 378.
- Cengiz, M., & Sezer, C. V. (2024). Yeni nesil kanser terapisinde hedefleme stratejileri ve ligandları. *Turkish Journal of Applied Sciences and Technology*, 5(1), 39-52.
- Ceylan, C., & Dönmez, N. (2025). Mitophagy Mechanism and Its Relationship With Diseases. *Akademik Perspektiften Sağlık Bilimleri*.
- Chen, C.-j., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Roninson, I. B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47(3), 381-389.
- Christgen, M., Cserni, G., Floris, G., Marchio, C., Djerroudi, L., Kreipe, H., Derksen, P. W., & Vincent-Salomon, A. (2021). Lobular breast cancer: histomorphology and different concepts of a special spectrum of tumors. *Cancers*, 13(15), 3695.
- Cicio, D., Balta, A. G., Homorozan, T. L., Ciornei, V., Russu, O. M., Benea, H. R., & Pavel, M. (2025). Electrocautery vs. Cold Cutting in Modified Radical Mastectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 14(18), 6437.
- Consortium, B. C. A., Mavaddat, N., Dorling, L., Carvalho, S., Allen, J., González-Neira, A., Keeman, R., Bolla, M. K., Dennis, J., & Wang, Q. (2022). Pathology of tumors associated with pathogenic germline variants in 9 breast cancer susceptibility genes. *JAMA oncology*, 8(3), e216744.
- Creighton, C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 289-297.

- Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*, 112(1), 25.
- da Costa, R., Passos, G. F., Quintão, N. L., Fernandes, E. S., Maia, J. R. L., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2020). Taxane-induced neurotoxicity: pathophysiology and therapeutic perspectives. *British journal of pharmacology*, 177(14), 3127-3146.
- Danckwerts, M., & Fassihi, A. (1991). Implantable controlled release drug delivery systems: a review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(11), 1465-1502.
- Dash, A., & Cudworth II, G. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 40(1), 1-12.
- Dennis, K. L., Blatner, N. R., Gounari, F., & Khazaie, K. (2013). Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current opinion in oncology*, 25(6), 637.
- Derman, S., Kızılbey, K., & Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31(1), 107-120.
- Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M. J., Wapnir, I., Dirbas, F. M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S. K., . . . Clarke, M. F. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 458(7239), 780-783.
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103-1124.
- Dorling, L., Carvalho, S., Allen, J., González-Neira, A., Luccarini, C., Wahlström, C., Pooley, K. A., Parsons, M. T., Fortunato, C., & Wang, Q. (2021). Breast cancer risk genes—association analysis in more than 113,000 women. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 428-439.
- Dutertre, M., & Smith, C. L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295(2), 431-437.
- Effiong, E. B., Nweke, B. C., Okereke, A. H., & Pius, A. N. O. (2022). Breast cancer—review. *J. Glob. Biosci*, 11, 9248-9257.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Fabbri, A., Carcangiu, M. L., & Carbone, A. (2008). Histological classification of breast cancer. In *Breast Cancer: Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options* (pp. 3-14). Springer.
- Falvo, P., Orecchioni, S., Hillje, R., Raveane, A., Mancuso, P., Camisaschi, C., Luzi, L., Pelicci, P., & Bertolini, F. (2021). Cyclophosphamide and vinorelbine activate stem-like CD8⁺ T cells and improve anti-PD-1 efficacy in triple-negative breast cancer. *Cancer research*, 81(3), 685-697.
- Featherstone, J., Dykes, P. J., & Marks, R. (1991). The effect of platinum complexes on human skin cells in vivo and in vitro. *Skin Pharmacol*, 4(3), 169-174.
- Feng, C., Xiong, Z., Wang, C., Xiao, W., Xiao, H., Xie, K., Chen, K., Liang, H., Zhang, X., & Yang, H. (2021). Folic acid-modified Exosome-PH20 enhances the efficiency of

- therapy via modulation of the tumor microenvironment and directly inhibits tumor cell metastasis. *Bioactive materials*, 6(4), 963-974.
- Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(1), 3-23.
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America*, 27(1), 95.
- Fuertes, M. A., Alonso, C., & Pérez, J. M. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*, 103(3), 645-662.
- Fung, L. K., & Saltzman, W. M. (1997). Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 26(2-3), 209-230.
- Gallas, A. E., Morenikeji, G. O., King, R. E., Adegaju, M. S., Ayoola, A., Taiwo, G., & Morenikeji, O. B. (2025). An overview of invasive ductal carcinoma (IDC) in women's breast cancer. *Current molecular medicine*.
- Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal a breast cancer and molecular assays: a review. *The oncologist*, 23(5), 556-565.
- Gecili, İ., Genç, S., Hacımüftüoğlu, A., Güner, A., Niğde, E., Karabulut, K., Okan Yıllar, D., Taghizadehghalehjoughi, A., & Abdelaty Hassibelnaby, A. M. (2026). Combined in vitro effects of temozolomide and erucic acid on U87 MG cell viability, oxidative stress, and expression of genes involved in apoptotic signalling. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 77(2), 123-130.
- Genc, S., Nadaroglu, H., Cinar, R., Nigde, E., Karabulut, K., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2025). New Anti-Cancer Impact of Cerium Oxide, Lithium, and Sn-38 Synergy via DNA Methylation-Mediated Reduction of MMP-2 and Modulation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Pharmaceuticals*, 18(11), 1725.
- Genc, S., Yagci, T., Vageli, D. P., Dundar, R., Doukas, P. G., Doukas, S. G., Tolia, M., Chatzakis, N., Tsatsakis, A., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2023). Exosomal MicroRNA-223, MicroRNA-146, and MicroRNA-21 Profiles and Biochemical Changes in Laryngeal Cancer. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 6(5), 820-828.
- Genç, S., Çakır, Z., Taghizadehghalehjoughi, A., Yeni, Y., Jalili, K., & Hacımüftüoğlu, A. (2021). Investigation of the exosome-based drug delivery system potential in the treatment of glioblastoma in vitro experimental models. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 451-467.
- Genç, S., Karabulut, K., Niğde, E., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2024). Hydrocortisone and vitamin B12 protect SHSY-5Y cells against glutamate excitotoxicity by altering VIP and GAL levels. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 9(4), 754-761.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23).
- Gonullu, B., Angeli, E., Pamoukdjian, F., & Bousquet, G. (2023). HER2 amplification level predicts pathological complete response in the neoadjuvant setting of HER2-overexpressing breast cancer: a meta-analysis and systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3590.

- Gonzalez-Sarrias, A., Iglesias-Aguirre, C. E., Cortes-Martin, A., Vallejo, F., Cattivelli, A., Del Pozo-Acebo, L., Del Saz, A., Lopez de Las Hazas, M. C., Davalos, A., & Espin, J. C. (2022). Milk-Derived Exosomes as Nanocarriers to Deliver Curcumin and Resveratrol in Breast Tissue and Enhance Their Anticancer Activity. *Int J Mol Sci*, 23(5).
- Gore, P. R., Prajapati, C. P., Mahajan, U. B., Goyal, S. N., Belemkar, S., Ojha, S., & Patil, C. R. (2016). Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis through inhibiting DNA damage and upregulation of Nrf2 expression. *International Journal of Biological Sciences*, 12(8), 944.
- Gottesman, M., Ambudkar, S., Ni, B., Aran, J., Sugimoto, Y., Cardarelli, C., & Pastan, I. (1994). Exploiting multidrug resistance to treat cancer. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology,
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53(1), 615-627.
- Gradishar, W. J., Moran, M. S., Abraham, J., Abramson, V., Aft, R., Agnese, D., Allison, K. H., Anderson, B., Bailey, J., & Burstein, H. J. (2024). Breast cancer, version 3.2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 22(5), 331-357.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., Pomblum, V. J., Rocha, J. B. T., & Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169-174.
- Group, E. B. C. T. C. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 365(9472), 1687-1717.
- Guo, Z., Li, G., Shen, L., Pan, J., Dou, D., Gong, Y., Shi, W., Sun, Y., Zhang, Y., Ma, K., Cui, C., Li, W., Liu, Q., & Zhu, X. (2025). Ginger-Derived Exosome-Like Nanoparticles Loaded With Indocyanine Green Enhances Phototherapy Efficacy for Breast Cancer. *Int J Nanomedicine*, 20, 1147-1169.
- Gupta, M., & Goyal, N. (2022). Applied anatomy of breast cancer. In *Breast Cancer: Comprehensive Management* (pp. 23-35). Springer.
- Gutierrez-Millan, C., Calvo Díaz, C., Lanao, J. M., & Colino, C. I. (2021). Advances in exosomes-based drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 21(1), 2000269.
- Habanjar, O., Bingula, R., Decombat, C., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2023). Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 4002.
- Han, Y., Jones, T. W., Dutta, S., Zhu, Y., Wang, X., Narayanan, S. P., Fagan, S. C., & Zhang, D. (2021). Overview and update on methods for cargo loading into extracellular vesicles. *Processes*, 9(2), 356.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
- Hannafon, B. N., Trigoso, Y. D., Calloway, C. L., Zhao, Y. D., Lum, D. H., Welm, A. L., Zhao, Z. J., Blick, K. E., Dooley, W. C., & Ding, W. (2016). Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast cancer research*, 18(1), 90.
- Haq, A. T. A., Yang, P. P., Jin, C., Shih, J. H., Chen, L. M., Tseng, H. Y., Chen, Y. A., Weng, Y. S., Wang, L. H., Snyder, M. P., & Hsu, H. L. (2024). Immunotherapeutic IL-6R and

- targeting the MCT-1/IL-6/CXCL7/PD-L1 circuit prevent relapse and metastasis of triple-negative breast cancer [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Theranostics*, 14(5), 2167-2189.
- Hartmann, L. C., Keeney, G. L., Lingle, W. L., Christianson, T. J. H., Varghese, B., Hillman, D., Oberg, A. L., & Low, P. S. (2007). Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *International journal of cancer*, 121(5), 938-942.
- Hashemi, Z. S., Ghavami, M., Mohammadi, F., Shokrollahi Barough, M., Shokati, F., Asghari, S., Khalili, S., Akbari Yekta, M., Ghavamzadeh, A., & Sarrami Forooshani, R. (2024). Doxorubicin-loaded NK exosomes enable cytotoxicity against triple-negative breast cancer spheroids. *Iran J Basic Med Sci*, 27(12), 1604-1615.
- He, P. J., Ge, R. F., Mao, W. J., Chung, P. S., Ahn, J. C., & Wu, H. T. (2018). Oxidative stress induced by carboplatin promotes apoptosis and inhibits migration of HN-3 cells. *Oncol Lett*, 16(6), 7131-7138.
- He, Y., Jiang, Z., Chen, C., & Wang, X. (2018). Classification of triple-negative breast cancers based on Immunogenomic profiling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 327.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Howell, A., Osborne, C. K., Morris, C., & Wakeling, A. E. (2000). ICI 182,780 (Faslodex™) development of a novel, “pure” antiestrogen. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 89(4), 817-825.
- Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Ignatiadis, M., & Sotiriou, C. (2013). Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nature reviews Clinical oncology*, 10(9), 494-506.
- Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular biology international*, 2014(1), 852748.
- Isakoff, S. J., Mayer, E. L., He, L., Traina, T. A., Carey, L. A., Krag, K. J., Rugo, H. S., Liu, M. C., Stearns, V., & Come, S. E. (2015). TBCRC009: a multicenter phase II clinical trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 33(17), 1902-1909.
- Johnson, M., & Keyes, D. (2024). Anthracycline toxicity. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Jones, S. E. (2008). Metastatic breast cancer: the treatment challenge. *Clinical breast cancer*, 8(3), 224-233.
- Juriscic, V., Radenkovic, S., & Konjevic, G. (2015). The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects. *Advances in cancer biomarkers: from biochemistry to clinic for a critical revision*, 115-124.
- Kahveci, K., & Türkoğlu, M. (2019). İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri Ctlα-4 ve Pd-1/Pd-11'in İmmünoterapideki Yeri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 210-218.

- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1208-1215.
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6008.
- Kelemen, L. E. (2006). The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *International journal of cancer*, 119(2), 243-250.
- Khan, M., Alam, Z., Siddiqui, S. A., Akram, M., & Alam, M. S. (2022). Outcomes of Triple-Negative Breast Cancer Patients in Response to Taxane and Nontaxane-Based Neoadjuvant Chemotherapies. *Asian J. Oncol.*
- Kim, H. Y., Min, H. K., Song, H. W., Yoo, A., Lee, S., Kim, K. P., Park, J. O., Choi, Y. H., & Choi, E. (2022). Delivery of human natural killer cell-derived exosomes for liver cancer therapy: an in vivo study in subcutaneous and orthotopic animal models. *Drug Deliv*, 29(1), 2897-2911.
- Kong, T., Hao, L., Wei, Y., Cai, X., & Zhu, B. (2018). Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug delivery system for human breast cancer therapy. *Cell proliferation*, 51(5), e12488.
- Kumar, S., Bal, A., Das, A., Loriya, I., Khare, S., Bhattacharya, S., & Singh, G. (2021). Spectrum of PIK3CA/AKT mutations across molecular subtypes of triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 187(3), 625-633.
- Kuwahara, A., Yamamori, M., Nishiguchi, K., Okuno, T., Chayahara, N., Miki, I., Tamura, T., Kadoyama, K., Inokuma, T., & Takemoto, Y. (2010). Effect of dose-escalation of 5-fluorouracil on circadian variability of its pharmacokinetics in Japanese patients with Stage III/IVa esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of medical sciences*, 7(1), 48.
- Kwak, Y., Jang, S. Y., Choi, J. Y., Lee, H., Shin, D. S., Park, Y. H., Kim, J.-Y., Ahn, J.-S., Chae, B. J., & Yu, J. (2023). Progesterone receptor expression level predicts prognosis of estrogen receptor-positive/HER2-negative young breast cancer: a single-center prospective cohort study. *Cancers*, 15(13), 3435.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014(1), 149185.
- Leamon, C. P., Reddy, J. A., Vlahov, I. R., Westrick, E., Dawson, A., Dorton, R., Vetzal, M., Santhapuram, H. K., & Wang, Y. (2007). Preclinical antitumor activity of a novel folate-targeted dual drug conjugate. *Molecular pharmaceuticals*, 4(5), 659-667.
- Lee, H., Bae, K., Baek, A. R., Kwon, E. B., Kim, Y. H., Nam, S. W., Lee, G. H., & Chang, Y. (2022). Glioblastoma-Derived Exosomes as Nanopharmaceuticals for Improved Glioma Treatment. *Pharmaceutics*, 14(5).
- Lee, J. S., Yost, S. E., & Yuan, Y. (2020). Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: recent progresses and challenges. *Cancers*, 12(6), 1404.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietersen, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.

- Li, J., Sausville, E. A., Klein, P. J., Morgenstern, D., Leamon, C. P., Messmann, R. A., & LoRusso, P. (2009). Clinical Pharmacokinetics and Exposure-Toxicity Relationship of a Folate-Vinca Alkaloid Conjugate EC145 in Cancer Patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 49(12), 1467-1476.
- Liang, Y., Liu, X., Yun, Z., Li, K., & Li, H. (2024). Endocrine therapy plus HER2-targeted therapy, another favorable option for HR+/HER2+ advanced breast cancer patients. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 16, 17588359231220501.
- Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 6(9), 1306.
- Liu, G., Yang, L., Chen, G., Xu, F., Yang, F., Yu, H., Li, L., Dong, X., Han, J., & Cao, C. (2021). A review on drug delivery system for tumor therapy. *Frontiers in pharmacology*, 12, 735446.
- Low, P. S., Henne, W. A., & Doorneweerd, D. D. (2008). Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of chemical research*, 41(1), 120-129.
- Low, P. S., & Kularatne, S. A. (2009). Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Current opinion in chemical biology*, 13(3), 256-262.
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*, 38(6), 754-763.
- Mahgoub, E. O., & Abdella, G. M. (2023). Improved exosome isolation methods from non-small lung cancer cells (NC1975) and their characterization using morphological and surface protein biomarker methods. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(10), 7505-7514.
- Maiti, A., Takabe, K., & Hait, N. C. (2017). Metastatic triple-negative breast cancer is dependent on SphKs/S1P signaling for growth and survival [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Cell Signal*, 32, 85-92.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955-960.
- Manish, G., & Vimukta, S. (2011). Targeted drug delivery system: a review. *Res J Chem Sci*, 1(2), 135-138.
- Mao, L., Liu, H., Zhang, R., Deng, Y., Hao, Y., Liao, W., Yuan, M., & Sun, S. (2021). PINK1/Parkin-mediated mitophagy inhibits warangalone-induced mitochondrial apoptosis in breast cancer cells [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Aging (Albany NY)*, 13(9), 12955-12972.
- Marrazzo, E., Frusone, F., Milana, F., Sagona, A., Gatzemeier, W., Barbieri, E., Bottini, A., Canavese, G., Rubino, A. O., & Eboli, M. G. (2020). Mucinous breast cancer: a narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. *The breast*, 49, 87-92.
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American family physician*, 81(11), 1339-1346.
- McCurdy, S. R., & Luznik, L. (2019). How we perform haploidentical stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2019(1), 513-521.

- McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: mechanisms of uptake. *Journal of circulating biomarkers*, 4, 7.
- McWhinney, S. R., Goldberg, R. M., & McLeod, H. L. (2009). Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(1), 10-16.
- Memişoğlu, E. (2020). Meme Kanserinde Tani ve Klinik Evreleme. *Meme kanseri cerrahisi (ss. 147–163)*.
- Mendez-Garcia, L. A., Nava-Castro, K. E., Ochoa-Mercado, T. L., Palacios-Arreola, M. I., Ruiz-Manzano, R. A., Segovia-Mendoza, M., Solleiro-Villavicencio, H., Cazarez-Martinez, C., & Morales-Montor, J. (2019). Breast Cancer Metastasis: Are Cytokines Important Players During Its Development and Progression? [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Interferon Cytokine Res*, 39(1), 39-55.
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lattekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., & Bhattacharjee, S. (2020). Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability. *ACS omega*, 5(27), 16701-16710.
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lattekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinken, T., & Fazeli, A. (2020). Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS omega*, 5(27), 16701-16710.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., & Murray, D. (2012). New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 170325.
- Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of breast cancer therapy. *PET clinics*, 13(3), 339.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19(1), 683-765.
- Mosca, L., Ilari, A., Fazi, F., Assaraf, Y. G., & Colotti, G. (2021). Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resistance Updates*, 54, 100742.
- Nahta, R., & Esteva, F. J. (2006). HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research*, 8(6), 215.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183(5), 795-803.
- Nierengarten, M. B. (2024). FDA approves capivasertib with fulvestrant for breast cancer. *Cancer (0008543X)*, 130(6).
- O'Shannessy, D. J., Somers, E. B., Maltzman, J., Smale, R., & Fu, Y. S. (2012). Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *Springerplus*, 1.
- Oksvold, M. P., Kullmann, A., Forfang, L., Kierulf, B., Li, M., Brech, A., Vlassov, A. V., Smeland, E. B., Neurauter, A., & Pedersen, K. W. (2014). Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clinical therapeutics*, 36(6), 847-862. e841.
- Orecchioni, S., Talarico, G., Labanca, V., Calleri, A., Mancuso, P., & Bertolini, F. (2018). Vinorelbine, cyclophosphamide and 5-FU effects on the circulating and intratumoural

- landscape of immune cells improve anti-PD-L1 efficacy in preclinical models of breast cancer and lymphoma. *British journal of cancer*, 118(10), 1329-1336.
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of breast cancer. *Breast Cancer [Internet]*.
- Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., DeGeest, K., Hartenbach, E. M., & Baergen, R. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), 3194-3200.
- Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., & Leamon, C. P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 284-293.
- Pasi, D., Aswathy, B., Das, M., & Agrawal, P. (2026). Breast cancer pathogenesis, diagnosis and treatment: a comprehensive review. *Frontiers in Oncology*, 16.
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88(1), 487-514.
- Perez-Tomas, R. (2006). Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current medicinal chemistry*, 13(16), 1859-1876.
- Phan, L. M., & Rezaeian, A. H. (2021). ATM: Main Features, Signaling Pathways, and Its Diverse Roles in DNA Damage Response, Tumor Suppression, and Cancer Development. *Genes (Basel)*, 12(6).
- Pourmadadi, M., Eshaghi, M. M., Shaghaghi, M., Das, S. S., Arshad, R., Ghotekar, S., Rahdar, A., Manicum, A.-L. E., & Pandey, S. (2023). Nano-scale drug delivery systems for carboplatin: A comprehensive review. *OpenNano*, 13, 100175.
- Pourmasoumi, P., Abdouss, M., Farhadi, M., Jameie, S. B., & Khonakdar, H. A. (2024). Co-delivery of temozolomide and quercetin with folic acid-conjugated exosomes in glioblastoma treatment. *Nanomedicine*, 19(27), 2271-2287.
- Prat, A., Pascual, T., & Adamo, B. (2017). Intrinsic molecular subtypes of HER2+ breast cancer. *Oncotarget*, 8(43), 73362.
- Pritchard, K. I., Shepherd, L. E., O'Malley, F. P., Andrulis, I. L., Tu, D., Bramwell, V. H., & Levine, M. N. (2006). HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 354(20), 2103-2111.
- Puligundla, K. C., & Annamaneni, S. (2024). Sai Charitha Mullaguri, Sathish Kumar Mungamuri. *Biomedical Aspects of Solid Cancers*, 15.
- Purdie, C., Quinlan, P., Jordan, L., Ashfield, A., Ogston, S., Dewar, J., & Thompson, A. (2014). Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *British journal of cancer*, 110(3), 565-572.
- Qiao, L., Hu, S., Huang, K., Su, T., Li, Z., Vandergriff, A., Cores, J., Dinh, P.-U., Allen, T., & Shen, D. (2020). Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs. *Theranostics*, 10(8), 3474.
- Qiao, L., Hu, S., Huang, K., Su, T., Li, Z., Vandergriff, A., Cores, J., Dinh, P. U., Allen, T., Shen, D., Liang, H., Li, Y., & Cheng, K. (2020). Tumor cell-derived exosomes home to

- their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs. *Theranostics*, 10(8), 3474-3487.
- Qu, Z., Sun, F., Zhou, J., Li, L., Shapiro, S. D., & Xiao, G. (2015). Interleukin-6 Prevents the Initiation but Enhances the Progression of Lung Cancer [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cancer Res*, 75(16), 3209-3215.
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9-23.
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 120(2), 293-308.
- Razak, N. A., Abu, N., Ho, W. Y., Zambari, N. R., Tan, S. W., Alitheen, N. B., Long, K., & Yeap, S. K. (2019). Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Sci Rep*, 9(1), 1514.
- Reddy, L. H., & Bazile, D. (2014). Drug delivery design for intravenous route with integrated physicochemistry, pharmacokinetics and pharmacodynamics: illustration with the case of taxane therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 34-57.
- Reed, A. E. M., Kutasovic, J. R., Lakhani, S. R., & Simpson, P. T. (2015). Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*, 17(1), 12.
- Reinhardt, K., Stückerath, K., Hartung, C., Kaufhold, S., Uleer, C., Hanf, V., Lantzsche, T., Peschel, S., John, J., & Pöhler, M. (2022). PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 196(3), 483-493.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699.
- Ross, J. F., Chaudhuri, P. K., & Ratnam, M. (1994). Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer*, 73(9), 2432-2443.
- Roy, M., Fowler, A. M., Ulaner, G. A., & Mahajan, A. (2023). Molecular classification of breast cancer. *PET clinics*, 18(4), 441-458.
- Royce, M. E., & Osman, D. (2015). Everolimus in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast cancer: basic and clinical research*, 9, BCBCR. S29268.
- Saari, H., Lazaro-Ibanez, E., Viitala, T., Vuorimaa-Laukkanen, E., Siljander, P., & Yliperttula, M. (2015). Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J Control Release*, 220(Pt B), 727-737.
- Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H. R., Viens, P., Caldas, C., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2014). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 6(7), 5449.
- Salunkhe, S., Basak, M., Chitkara, D., & Mittal, A. (2020). Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance. *Journal of controlled release*, 326, 599-614.
- Sant, D. W., Mustafi, S., Gustafson, C. B., Chen, J., Slingerland, J. M., & Wang, G. (2018). Vitamin C promotes apoptosis in breast cancer cells by increasing TRAIL expression

- [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Scientific Reports*, 8(1), 5306.
- Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in non-viral gene delivery: Role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*, 10(4), 444.
- Sciegienka, S. J., Solst, S. R., Falls, K. C., Schoenfeld, J. D., Klinger, A. R., Ross, N. L., Rodman, S. N., Spitz, D. R., & Fath, M. A. (2017). D-penicillamine combined with inhibitors of hydroperoxide metabolism enhances lung and breast cancer cell responses to radiation and carboplatin via H₂O₂-mediated oxidative stress [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Free Radic Biol Med*, 108, 354-361.
- Scordamaglia, D., Talia, M., Cirillo, F., Zicarelli, A., Mondino, A. A., De Rosis, S., Di Dio, M., Silvestri, F., Meliti, C., Miglietta, A. M., Capalbo, C., De Francesco, E. M., Belfiore, A., Maggiolini, M., & Lappano, R. (2025). Interleukin-1 β mediates a tumor-supporting environment prompted by IGF1 in triple-negative breast cancer (TNBC). *J Transl Med*, 23(1), 660.
- Sencan, S., & Celik Onar, H. (2025). A novel anticancer candidate, coumarin-3-carboxamide derivative inhibits cell proliferation and migration in MDA-MB-231 cell line. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 45(4), 230-236.
- Sengupta, S., & Harris, C. C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(1), 44-55.
- Shah, S. P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., & Haffari, G. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403), 395-399.
- Sharma, P., López-Tarruella, S., García-Saenz, J. A., Ward, C., Connor, C. S., Gómez, H. L., Prat, A., Moreno, F., Jerez-Gilarranz, Y., & Barnadas, A. (2017). Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple-negative breast cancer: combined analysis of two cohorts. *Clinical Cancer Research*, 23(3), 649-657.
- Sheppard, D. G., Whitman, G. J., Fornage, B. D., Stelling, C. B., Huynh, P. T., & Sahin, A. A. (2000). Tubular carcinoma of the breast: mammographic and sonographic features. *American Journal of Roentgenology*, 174(1), 253-257.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current opinion in genetics & development*, 11(1), 71-77.
- Silindir, M., Erdoğan, S., Özer, A. Y., Doğan, A. L., Tuncel, M., Uğur, Ö., & Torchilin, V. P. (2013). Nanosized multifunctional liposomes for tumor diagnosis and molecular imaging by SPECT/CT. *Journal of Liposome Research*, 23(1), 20-27.
- Singh, R., & Lillard Jr, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P. A., Eppler, M., & Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), 146-150.
- Stage, I., Stage, I., Stage, I., Stage, I., Stage, I., Stage, I., & Stage, I. (2009). Breast cancer staging. *American joint committee on cancer*.

- Stevens Barron, J. C., Chapa Gonzalez, C., Alvarez Parrilla, E., & De la Rosa, L. A. (2023). Nanoparticle-Mediated Delivery of Flavonoids: Impact on Proinflammatory Cytokine Production: A Systematic Review. *Biomolecules*, 13(7).
- Stevens Barrón, J. C., Chapa González, C., Álvarez Parrilla, E., & De la Rosa, L. A. (2023). Nanoparticle-mediated delivery of flavonoids: impact on proinflammatory cytokine production: a systematic review. *Biomolecules*, 13(7), 1158.
- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(1), 12-31.
- Şakalar, Ç., İzgi, K., & Canatan, H. (2013). Kanser immün terapi ve monoklonal antikorlar. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg*, 27(2), 105-110.
- Tang, Z., Tang, C., Sun, C., Ying, X., & Shen, R. (2022). M1 macrophage-derived exosomes synergistically enhance the anti- bladder cancer effect of gemcitabine. *Aging (Albany NY)*, 14(18), 7364-7377.
- Teichgraeber, D. C., Guirguis, M. S., & Whitman, G. J. (2021). Breast cancer staging: Updates in the AJCC cancer staging manual, and current challenges for radiologists, from the AJR special series on cancer staging. *American Journal of Roentgenology*, 217(2), 278-290.
- Tian, Y., Lei, Y., Wang, Y., Lai, J., Wang, J., & Xia, F. (2023). Mechanism of multidrug resistance to chemotherapy mediated by P-glycoprotein. *International journal of oncology*, 63(5), 119.
- Tong, L., Yu, X., Wang, S., Chen, L., & Wu, Y. (2023). Research progress on molecular subtyping and modern treatment of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 647-658.
- Tran, B., & Bedard, P. L. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research*, 13(6), 221.
- Turlej, E., Domaradzka, A., Radzka, J., Drulis-Fajdasz, D., Kulbacka, J., & Gizak, A. (2025). Cross-Talk Between Cancer and Its Cellular Environment-A Role in Cancer Progression [Review]. *Cells*, 14(6).
- Tutt, A., Tovey, H., Cheang, M. C. U., Kernaghan, S., Kilburn, L., Gazinska, P., Owen, J., Abraham, J., Barrett, S., & Barrett-Lee, P. (2018). A randomised phase III trial of carboplatin compared with docetaxel in BRCA1/2 mutated and pre-specified triple negative breast cancer “BRCAness” subgroups: the TNT Trial. *Nature medicine*, 24(5), 628.
- Tüylek, Z. (2017). İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- Uslu, D., Abas, B. I., Demirbolat, G. M., & Cevik, O. (2024). Effect of platelet exosomes loaded with doxorubicin as a targeted therapy on triple-negative breast cancer cells. *Mol Divers*, 28(2), 449-460.
- Vaz-Luis, I., Winer, E., & Lin, N. (2013). Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Annals of Oncology*, 24(2), 283-291.
- Von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J. U., Jackisch, C., Paepke, S., & Gerber, B. (2014). Neoadjuvant carboplatin in patients

- with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 15(7), 747-756.
- Walker, S., Busatto, S., Pham, A., Tian, M., Suh, A., Carson, K., Quintero, A., Lafrence, M., Malik, H., & Santana, M. X. (2019). Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Theranostics*, 9(26), 8001.
- Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Luthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12815-12819.
- Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., Roach, K. C., Mandell, J., Lee, M. K., & Ciernikova, S. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama*, 295(12), 1379-1388.
- Wang, Y., Huo, Y., Zhao, C., Liu, H., Shao, Y., Zhu, C., An, L., Chen, X., & Chen, Z. (2024). Engineered exosomes with enhanced stability and delivery efficiency for glioblastoma therapy. *Journal of controlled release*, 368, 170-183.
- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, 5, 14.
- Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *Jaapa*, 32(10), 13-17.
- Wei, J. X., Qu, F. J., Jiang, T. H., & Xu, C. Z. (2026). Diagnosis and treatment of breast cancer during pregnancy: a comprehensive review. *Frontiers in Medicine*, 13.
- Wei, S. (2023). Hormone receptors in breast cancer: An update on the uncommon subtypes. *Pathology-Research and Practice*, 250, 154791.
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton transactions*, 39(35), 8113-8127.
- Wiegand, C., & Hipler, U. C. (2009). Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures. *Skin Pharmacol Physiol*, 22(2), 74-82.
- Xia, W., & Low, P. S. (2010). Folate-targeted therapies for cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 53(19), 6811-6824.
- Yadav, B. S., Sharma, S. C., Chanana, P., & Jhamb, S. (2014). Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 5(2), 125.
- Yang, J., Chen, H., Vlahov, I. R., Cheng, J.-X., & Low, P. S. (2007). Characterization of the pH of folate receptor-containing endosomes and the rate of hydrolysis of internalized acid-labile folate-drug conjugates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321(2), 462-468.
- Yardley, D., Coleman, R., Conte, P., Cortes, J., Brufsky, A., Shtivelband, M., Young, R., Bengala, C., Ali, H., & Eakel, J. (2018). nab-Paclitaxel plus carboplatin or gemcitabine versus gemcitabine plus carboplatin as first-line treatment of patients with triple-negative metastatic breast cancer: results from the tnAcity trial. *Annals of Oncology*, 29(8), 1763-1770.
- Yeni, Y., Genc, S., Ertugrul, M. S., Nadaroglu, H., Gezer, A., Mendil, A. S., & Hacimuftuoglu, A. (2024). Neuroprotective effects of L-Dopa-modified zinc oxide nanoparticles on the rat model of 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Scientific reports*, 14(1), 19077.

- Yeni, Y., Taghizadehghalehjoughi, A., Genc, S., Hacimuftuoglu, A., Yildirim, S., & Bolat, I. (2023). Glioblastoma cell-derived exosomes induce cell death and oxidative stress in primary cultures of olfactory neurons. Role of redox stress. *Molecular biology reports*, 50(5), 3999-4009.
- Yin, J., Guo, J., Zhang, Q., Cui, L., Zhang, L., Zhang, T., Zhao, J., Li, J., Middleton, A., Carmichael, P. L., & Peng, S. (2018). Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicol In Vitro*, 51, 1-10.
- Yodkeeree, S., Ampasavate, C., Sung, B., Aggarwal, B. B., & Limtrakul, P. (2010). Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol*, 627(1-3), 8-15.
- Yokoyama, T., Makino, H., Seki, N., Ueda, J., Hosone, M., Katayama, H., Takei, H., & Yoshida, H. (2020). Capecitabine plus Epirubicin plus Cyclophosphamide Combination Therapy (CEX Therapy) as Neoadjuvant Chemotherapy for HER-2-Negative Breast Cancer: A Retrospective, Single-Center Study. *Journal of Nippon Medical School*, 87(2), 73-79.
- Yu, M., Gai, C., Li, Z., Ding, D., Zheng, J., Zhang, W., Lv, S., & Li, W. (2019). Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancer Sci*, 110(10), 3173-3182.
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ breast cancer*, 8(1), 95.
- Zamagni, A., Luis, A. M., Mjaaland, I., Chirila, M. E., Ciervide, R., Machiels, M., Ratosa, I., Van Den Bongard, D. H., Aznar, M., & Boersma, L. J. (2025). ESTRO recommendations on preoperative radiation therapy in breast cancer: current and future perspectives. *Radiotherapy and Oncology*, 111236.
- Zangouri, V., Akrami, M., Tahmasebi, S., Talei, A., & Hesarooeih, A. G. (2018). Medullary breast carcinoma and invasive ductal carcinoma: a review study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 43(4), 365.
- Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langer, R., & Farokhzad, O. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 83(5), 761-769.
- Zhang, Z., Wang, J. M., Tacha, D. E., Li, P., Bremer, R. E., Chen, H. J., Wei, B., Xiao, X. L., Da, J. P., Skinner, K., Hicks, D. G., Bu, H., & Tang, P. (2014). Folate Receptor α Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(7), 890-895.
- Zhang, Z., Zhang, R., & Li, D. (2023). Molecular biology mechanisms and emerging therapeutics of triple-negative breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 113-128.
- Zhao, C., He, R., Shen, M., Zhu, F., Wang, M., Liu, Y., Chen, H., Li, X., & Qin, R. (2019). PINK1/Parkin-mediated mitophagy regulation by reactive oxygen species alleviates rocaglamide A-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 968.
- Zimmermann, K. C., & Green, D. R. (2001). How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4 Suppl), S99-103.

- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94(3), 909-950.
- Zucca-Matthes, G., Urban, C., & Vallejo, A. (2016). Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland surgery*, 5(1), 32.