

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TİMOL YÜKLÜ KİTOSAN/TiO₂ NANOKOMPOZİTLERİNİN A549 AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Heval KAYA

Danışman: Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

TEZ JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK
Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN
Doç. Dr. Sinem KARAKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ERZİNCAN, 2026

© 2026, [Heval KAYA]. Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK danışmanlığında, Heval KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 10.04.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği (3/3) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN İmza:

Üye : Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK İmza:

Üye : Doç. Dr. Sinem KARAKUŞ İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 20.... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR
Enstitü Müdür V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Timol Yüklü Kitosan/TiO₂ Nanokompozitlerinin A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattındaki Antiproliferatif Etkilerinin Değerlendirilmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 10/04/2026.

(İmza)

Heval KAYA

ÖZET

TİMOL YÜKLÜ KİTOSAN/TiO₂ NANOKOMPOZİTLERİNİN A549 AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Heval KAYA

**Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK
2026, 68 sayfa**

Nanotıp, kanser tedavisinde ilaçların hedefe yönelik taşınmasını ve terapötik etkinliğini artırmayı amaçlayan yenilikçi bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bir monoterpen fenol olan timol, antikanser potansiyeli ile dikkat çekmekle birlikte, düşük çözünürlük ve stabilite gibi sınırlamalara sahiptir. Bu çalışmada, timolün biyoyararlanımını ve hücre içi alımını artırmak amacıyla, iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak kitosan matriksi içerisinde enkapsüle edilmiş ve ardından TiO₂ nanopartikülleri ile birleştirilerek timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitleri elde edilmiştir. Elde edilen nanokompozitler çeşitli karakterizasyon teknikleri ile analiz edilmiş, biyolojik etkinlikleri ise A549 akciğer kanseri hücre hattında Trypan Blue ve XTT testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bulgular, timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde A549 hücre proliferasyonunu konsantrasyona ve zamana bağlı olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu nanokompozit sistemin timol için etkili bir ilaç taşıma sistemi olabileceğini ve kanser tedavisinde nanoteknoloji temelli yaklaşımların potansiyelini desteklediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: A549 akciğer kanseri hücre hattı, Antiproliferatif aktivite, İyonik jelasyon, Kitosan, Timol, Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozit

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF THYMOLE- LOADED CHITOSAN/TiO₂ NANOCOMPOSITES ON A549 LUNG CANCER CELL LINE

Heval KAYA

**Master's Thesis, Erzincan Binali Yıldırım University, Institute of Science and
Technology,**

Department of Genetics and Biotechnology

Advisor: Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

2026, 68 pages

Nanomedicine is emerging as an innovative approach to enhance the targeted delivery and therapeutic efficacy of drugs in cancer treatment. Thymol, a monoterpene phenol, has attracted attention for its anticancer potential; however, it is limited by low solubility and stability. In this study, to enhance the bioavailability and intracellular uptake of thymol, it was encapsulated in a chitosan matrix via ionic gelation and then combined with TiO₂ nanoparticles to produce thymol-loaded chitosan/TiO₂ nanocomposites. The resulting nanocomposites were characterized using various characterization techniques, and their biological activity was evaluated in the A549 lung cancer cell line using Trypan Blue and XTT assays. The findings revealed that thymol-loaded chitosan/ TiO₂ nanocomposites significantly inhibited A549 cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner. Consequently, these results suggest that this nanocomposite system could serve as an effective drug delivery system for thymol and support the potential of nanotechnology-based approaches in cancer treatment.

Keywords: A549 lung cancer cell line, Antiproliferative activity, Ionic gelation, Chitosan, Thymol, Thymol-loaded chitosan/ TiO₂ nanocomposite

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans çalışmalarımın başlangıcından itibaren bilimsel ve kişisel tercihlerime saygı duyarak kendi yolumu bulmama olanak tanıyan, bana duyduğu güvenle her aşamada destek olan ve karşılaştığımız tüm zorluklar karşısında beni cesaretlendirerek mücadele gücü kazanmamı sağlayan; öğrencisi olmaktan gurur ve onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK'a teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimleriyle desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burcu Meryem BEŞER'e, ayrıca süreç boyunca katkıları, yardımları ve destekleri için Sayın Dr. Tuğba ATICI ve Sayın Huriye ERKEN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan; sevgileriyle bana güç veren, en zor anlarımda bile inancını kaybetmeden beni destekleyen, sabırları ve anlayışlarıyla yolumu aydınlatan, bana emeğin, azmin ve dürüstlüğüün değerini öğreterek her adımda daha güçlü ilerlememi sağlayan canım annem Sayın Birgül KAYA'ya, babam Sayın Mesut KAYA'ya, kardeşlerim Sayın Ulaş KAYA ve Sayın Barış Mahir KAYA'ya minnettarım.

Bu zorlu süreçte sınıdığım, düştüğüm, vazgeçtiğim anlarım oldu. Tüm zorluklara rağmen inancını ve azmini kaybetmeden çalışmaya devam eden, öğrenmeye ve üretmeye olan tutkusunu her daim koruyan; bu uzun ve emek dolu süreci sabır, kararlılık ve özveriyle tamamlayan kendime de teşekkür ederim. Son olarak, bu tez çalışmasını; sesi kısılmaya çalışılan, görünmez kılınan, incitilen, susturulan, kimi zaman hayattan koparılan; buna rağmen iz bırakan, direnen ve varlığıyla dünyayı değiştiren tüm kadınlara atfediyorum. Yolumuz hep çiçek açsın.

Heval KAYA

Nisan, 2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Araştırmanın Amacı ve Önemi	2
1.2. Varsayımlar	3
1.3. Sınırlılıklar.....	4
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Kanser.....	5
2.1.1. Akciğer kanseri.....	7
2.2. Kanser Tedavisinde Hedefli İlaç Dağıtımı	9
2.2.1. Pasif hedefleme.....	10
2.2.2. Aktif hedefleme	11
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemlerinde Nanoteknoloji ve Nanopartiküller	11
2.3.1. Nanoteknoloji	11
2.3.2. Nanopartiküller.....	11
2.3.2.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması	12
2.3.2.2. Titanyum dioksit (TiO ₂) nanopartiküllerinin yapısı ve anti-kanser özellikleri	14
2.3.3. Nanokompozitler	16
2.3.4. Enkapsülasyon	17
2.3.4.1. İyonik jelasyon	18
2.3.5. Biyopolimerler.....	18
2.3.5.1. Biyomalzeme olarak kitosan	19
2.4. Bitkisel Kökenli Anti-Kanser Ajanlar ve Timol.....	20
2.4.1. Timol	21
3. YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Nanokompozit bileşiminde kullanılan kimyasallar	23

3.1.1.1. Timol	23
3.1.1.2. Titanyum dioksit.....	23
3.1.1.3. Kitosan.....	24
3.1.1.4. Sodyum tripolifosfat	24
3.1.2. Kullanılan diğ er kimyasal maddeler ve kitler.....	25
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar	26
3.1.4. A549 hücre hattı ve özellikleri	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin (T-CS/TiO ₂ NC) hazırlanması.....	27
3.2.2. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin karakterizasyon analizi.....	29
3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) analizi	30
3.2.2.2. X- ışını kırınımı (XRD) analizi	30
3.2.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	30
3.2.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	31
3.2.2.5. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesinin (LC) belirlenmesi.....	31
3.2.3. Hücre kültürü.....	32
3.2.3.1. A549 hücreleri için besiyeri hazırlanması	33
3.2.3.2. Hücrelerin çözdürülmesi.....	33
3.2.3.3. Hücrelerin pasajlanması	33
3.2.3.4. Hücrelerin dondurulması	34
3.2.4. <i>İn vitro</i> sitotoksisite çalışmaları.....	34
3.2.4.1. Trypan blue ile canlı hücre sayımı	34
3.2.4.2. XTT hücre canlılık testi.....	34
3.2.5. İstatistiksel yöntemler.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. Timol Yüklü Kitosan/TiO ₂ Nanokompozitlerinin Karakterizasyon Analizi.....	36
4.1.1. Tarama elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDX) analizi sonuçları	36
4.1.2. X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonuçları.....	37
4.1.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi sonuçları	38
4.1.4. Termogravimetrik analiz (TGA) sonuçları.....	39
4.1.5. Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) analizi sonuçları.....	40

4.2. T-CS/TiO ₂ NC'lerinin Antiproliferatif Etkileri	42
4.2.1. A549 hücre hattı için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi.....	42
4.2.2. T-CS/TiO ₂ NC'lerin A549 hücre hattında XTT analizi bulguları	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKÇA	52
EKLER	69
Ek 1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar.....	70

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ve kitler	25
Tablo 4. 1. T-CSNP ve T-CS/TiO ₂ NC sistemlerinde enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi	42
Tablo 4.2. T-CS/TiO ₂ NC'lerinin A549 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlerinde IC ₅₀ değerleri .	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri	6
Şekil 2. 2. Akciğer kanseri tedavisinde nanoteknolojinin araştırma ve uygulamaları	9
Şekil 2. 3. Organik nanopartiküller	13
Şekil 2. 4. Karbon bazlı nanopartiküller.....	13
Şekil 2. 5. İnorganik nanopartiküller	14
Şekil 2. 6. Kitosan üretim prosesi.....	19
Şekil 2. 7. TPP ile iyonik olarak çapraz bağlanmış kitosan	20
Şekil 2. 8. <i>Thymus vulgaris</i> (kekik) bitkisinden elde edilen timol	21
Şekil 3. 1. Timolün moleküler yapısı	23
Şekil 3. 2. TiO ₂ 'nin kristal fazları	24
Şekil 3. 3. Kitosanın moleküler yapısı.....	24
Şekil 3. 4. Sodyum tripolifosfatın moleküler yapısı.....	25
Şekil 3. 5. A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10X).....	27
Şekil 3. 6. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin sentez aşamaları.....	29
Şekil 4. 1. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin SEM görüntüleri ve EDX'leri.....	36
Şekil 4. 2. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin XRD deseni.....	37
Şekil 4. 3. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin FTIR görüntüleri.....	38
Şekil 4. 4. Timol yüklü kitosan/TiO ₂ nanokompozitlerinin TGA görüntüleri	39
Şekil 4. 5. T-CSNP'de timol için UV-Vis spektrofotometre kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 4. 6. T-CS/TiO ₂ NC'de timol ve TiO ₂ için UV-Vis spektrofotometre kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 4. 7. A549 hücrelerinde T-CS/TiO ₂ NC'lerin 24 saatlik XTT canlılık oranları.....	44
Şekil 4. 8. A549 hücrelerinde T-CS/TiO ₂ NC'lerin 48 saatlik XTT canlılık oranları.....	44
Şekil 4. 9. A549 hücrelerinde T-CS/TiO ₂ NC'lerin 72 saatlik XTT canlılık oranları.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
cm	Santimetre
cm ³	Santimetre küp
dk	Dakika
g	Gram
mL	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
°	Derece
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
µM	Mikro molar
p	Anlamlılık değeri

Kısaltmalar

3B	3 boyutlu
A549	İnsan akciğer adenokarsinomu hücre hattı
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ALK	Gliomada anaplastik lenfoma kinaz
ATR	Zayıflatılmış toplam yansıma
Bcl-2	B-hücreli lenfoma-2
CAT	Katalaz
CVD	Kimyasal buhar biriktirme
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EDX	Enerji dağılım X-ışını spektrometre
EE	Enkapsülasyon etkinliği
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EO	Eozinofil
EPR	Gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkisi

FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi
GPx	Glutasyon peroksidaz ailesi
GRAS	Genel olarak güvenli olarak kabul edilen
GSH	Glutasyon
HeLa	Serviks kanser hücre hattı
HT-22	Fare hipokampal (sinir) hücre hattı
HT-29	İnsan kolon (bağırsak) adenokarsinom hücre hattı
HTC116	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
IC	İnhibisyon konsantrasyonu
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
İnos	Nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu
JB6	Fare epidermal (deri) hücre hattı
Kaspaz-3	Sistein-aspartat proteaz-3
Kaspaz-9	Sistein-aspartat proteaz-9
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
LDCT	Düşük doz bilgisayarlı tomografi
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Östrojen reseptör pozitif insan meme kanseri hücre hattı)
MDA	3,4-Metilendioksiamfetamin
MPO	Miyeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NNI	Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
Np	Nanopartikül
PBS	Fosfat tamponlu salin
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı

PDT	Fotodinamik tedavi
PEG	Polietilen glikol
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
SqCC	Skvamöz hücreli akciğer kanseri
T-CS/TiO ₂ NC	Timol Yüklü Kitosan/TiO ₂ Nanokompoziti
T-CSNP	Timol Yüklü Kitosan Nanopartikülü
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
Ti	Titanyum
TiO ₂	Titanyum dioksit
TM4	Fare sertoli hücre hattı
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TPP	Sodyum tripolifosfat
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XRD	X-ışını kırınım yöntemi
XTT	Sodyum 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4- tetrazolyum]-bis(4-metoksi6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat)

1. GİRİŞ

Kanser, vücutta bir hücre grubunun anormal hücre büyümesi ve bölünmesi sonucunda aşırı ve kontrolsüz çoğalması ve bu hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılması (metastaz) şeklinde oluşur (Sucharitha ve Bhuvana, 2023). Genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle tetiklenen kanser, zamanla sağlıklı hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını engelleyerek yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilir (Vogelstein ve Kinzler, 2004). Akciğer kanseri dünya çapında en sık teşhis edilen kanser ve kansere bağlı ölümün önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri, 2022 yılında dünya çapında yaklaşık 2,5 milyon yeni vaka ile en sık teşhis edilen kanser olup, tüm kanserlerin yaklaşık sekizde birinden (%12,4) sorumlu olduğu görülmüştür (Bray vd., 2024).

Nanoteknoloji, yeni nanoyapılar tasarlamak ve sentezlemek ya da mevcut nano ölçekli malzemelere benzersiz ve gelişmiş özellikler kazandırarak bunların yenilikçi ve gelişmiş işlevsel sistemlerde uygulanmasını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir (Çıracı, 2006). Nanopartikül dağıtım sistemi, biyoaktif bileşikleri kapsüllemek ve bu bileşikleri ya aktif endositoz yoluyla gastrointestinal sistemde emilimlerini artırmak ya da spesifik hedefleme yoluyla vücut dolaşımında biyoaktivitelerini iyileştirmek için nanotaşıyıcıların kullanıldığı bir sistemdir (Müller vd., 2000). Polimerik nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, lipozomlar ve katı nanopartiküller dahil olmak üzere bu nanopartiküllerin potansiyel klinik uygulamalara sahip olduğu öne sürülmektedir. Klinik uygulanabilirlik, fizikokimyasal özellikler, ilaç yükleme verimliliği, salım davranışı ve en kritik olarak taşıyıcının düşük veya ihmal edilebilir düzeyde toksisite göstermesi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır (Ahmad vd., 2022). Yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, hasta sonuçlarının iyileştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri, biyoyararlanımlarını iyileştirerek, hedefleyerek ve hedef dışı etkileri azaltarak anti-kanser ajanlarının terapötik etkinliğini artırmak için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Dang ve Guan, 2020).

Doğal kaynaklı bileşikler, farklı hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak uzun yıllardır araştırılmaktadır. Bu kapsamda, fitokimyasallar geniş ölçüde incelenmiş ve hücresel çoğalma, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçleri düzenleyerek kanserin başlangıcını, büyümesini ve ilerlemesini baskılayan antikarsinojenik özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Li vd., 2018).

Thymus vulgaris (kekik) türlerinden elde edilen uçucu yağların başlıca fenolik bileşeni olan timol (5-metil-2-izopropilfenol), hücresel proteinlerle etkileşime girerek ve hücre zarının bütünlüğünü bozarak membran geçirgenliğini artırmakta ve bu mekanizma aracılığıyla güçlü bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Mirdehghan ve Valero, 2017). Bu çalışma, enkapsülasyon yöntemi ile sentezlenen timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin A549 hücre hattındaki antiproliferatif etkilerini değerlendirmek amacıyla, hücre canlılığı ve proliferasyonunu belirlemeye yönelik XTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.1. Araştırmanın Amacı ve Önemi

Kanser, hücrelerin normal büyüme ve bölünme mekanizmalarının bozulması sonucu kontrolsüz ve düzensiz çoğalma göstermesiyle ortaya çıkan bir hastalık grubudur. Bu anormal hücreler yalnızca köken aldıkları dokuyla sınırlı kalmayıp, farklı organ ve dokulara yayılma potansiyeline de sahiptir (Glaviano vd., 2015). Günümüzde genel tedavi protokolleri tanımlanmış olmakla birlikte, kanserin türüne ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı tanı ve tedavi stratejileri uygulanmaktadır. Her insanın farklı DNA yapısına sahip olması, çeşitli yaklaşımların oluşmasında büyük etkindir. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi girişimler, immünoterapi, hedefe yönelik tedaviler, hormon tedavileri ve gen temelli biyolojik yaklaşımlar, hastalığın tipine ve evresine bağlı olarak tek başına ya da kombine şekilde kullanılabilir (Liu vd., 2024).

Adenokarsinom kökenli bir hücre hattı olan A549 hücreleri, akciğer kanseri ve tedavi yaklaşımlarına yönelik *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, akciğerle ilişkili ancak malign olmayan hastalıklarda çeşitli biyoaktif bileşiklerin potansiyel etkilerinin incelenmesinde de tercih edilmektedir. Bir bileşiğin vücuda girişini ve etkisini artırmak için nanopartiküllerin kullanılması, bileşiğin hedeflenen etkisini artırmaktadır (Baykara, 2016).

Thymus vulgaris (kekik) esansiyel yağının temel bileşenlerinden biri timoldür (Huma vd., 1999). Fenolik bir bileşik olan timol, mikroorganizmalar üzerinde belirgin antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Güçlü antiseptik ve antifungal özelliklere sahip olan timolün fenole kıyasla yaklaşık 30 kat daha yüksek antiseptik etki sergilediği ve buna karşın yaklaşık dört kat daha düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Lukic, 1989).

Güncel çalışmalarda kemoterapötik ilaçlara ek olarak çeşitli bitkisel kaynaklı bileşiklerin de kullanıldığı görülmektedir. Özellikle fenolik bileşikler ve türevlerinin kullanımıyla antikanser etkinin artırılması ve sitotoksitenin azaltılması hedeflenmekte olup, bu alanda yoğun araştırmalar yürütülmektedir (Chen vd., 2025). Bu çalışmada, timolün iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan matrisi içinde enkapsüle edilmesi ve TiO₂ nanopartikülleri ile kombine edilerek nanokompozit oluşturulması, ardından elde edilen sistemin karakterizasyonu ve A549 akciğer kanseri hücre hattındaki antiproliferatif etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda, timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitleri sentezlenmiş ve elde edilen yapıların morfolojik ve kimyasal özellikleri SEM-EDX, XRD, FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, UV-Vis spektroskopisi kullanılarak enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi hesaplanmış, termal özellikleri TGA analizi ile değerlendirilmiştir. Nanokompozitlerin biyolojik etkinliğini belirlemek amacıyla, A549 hücre hattında *in vitro* sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiş; hücre canlılığı Trypan Blue yöntemi ve XTT testi ile analiz edilmiştir.

Bu kapsam doğrultusunda tez çalışmasının hedefleri aşağıda sıralanmıştır.

1. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlenmesi.
2. Elde edilen nanokompozitlerin morfolojik ve kimyasal özelliklerinin (SEM-EDX, XRD, FTIR) karakterize edilmesi.
3. Nanokompozitlerin termal özelliklerinin TGA analizi ile incelenmesi.
4. Nanokompozitlerin enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesinin UV-Vis spektroskopisi ile belirlenmesi.
5. A549 hücre hattında *in vitro* sitotoksite ve antiproliferatif etkilerinin Trypan Blue ve XTT testleri ile değerlendirilmesi.

1.2. Varsayımlar

Bu tez çalışması, belirlenen hedefler doğrultusunda aşağıdaki varsayımlara dayanılarak yürütülmüştür.

1. Timol, kitosan yapısının içerisine iyonik jelasyon yöntemi ile etkin ve stabil bir şekilde enkapsüle edilebilir; ardından TiO₂ ile birleştirilerek nanokompozit yapı oluşturulabilir.
2. Elde edilen nanokompozitler, SEM-EDX, XRD, FTIR analizleri ile doğrulanabilir belirgin morfolojik ve kimyasal özellikler sergiler.

3. Nanokompozitlerin termal stabilitesi TGA analizi ile ortaya konulabilir ve TiO₂ varlığı yapının ısıl dayanıklılığını artırır.
4. Nanokompozitlerin enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi, UV-Vis spektroskopisi ile yüksek doğrulukta belirlenebilir ve sistemin etkin ilaç taşıma potansiyeli vardır.
5. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitler, A549 akciğer kanser hücre hattında konsantrasyona ve zamana bağlı olarak anlamlı sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterir.

1.3. Sınırlılıklar

Bu tez çalışması, belirli sınırlılıklar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

1. Çalışma yalnızca *in vitro* koşullar ile sınırlı olup *in vivo* sistemlerde doğrulama yapılmamıştır.
2. Sitotoksikite analizleri yalnızca A549 akciğer kanser hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir.
3. Nanokompozitlerin biyolojik etkileri sadece Trypan Blue ve XTT testleri ile değerlendirilmiştir.
4. Enkapsülasyon verimliliği ve karakterizasyon çalışmaları belirli analitik yöntemlerle (SEM-EDX, XRD, FTIR, TGA ve UV-Vis) sınırlı tutulmuştur.
5. Çalışmada kullanılan deneysel koşullar (pH, sıcaklık, konsantrasyon aralıkları ve inkübasyon süreleri) belirli optimizasyon aralıkları ile sınırlandırılmıştır.

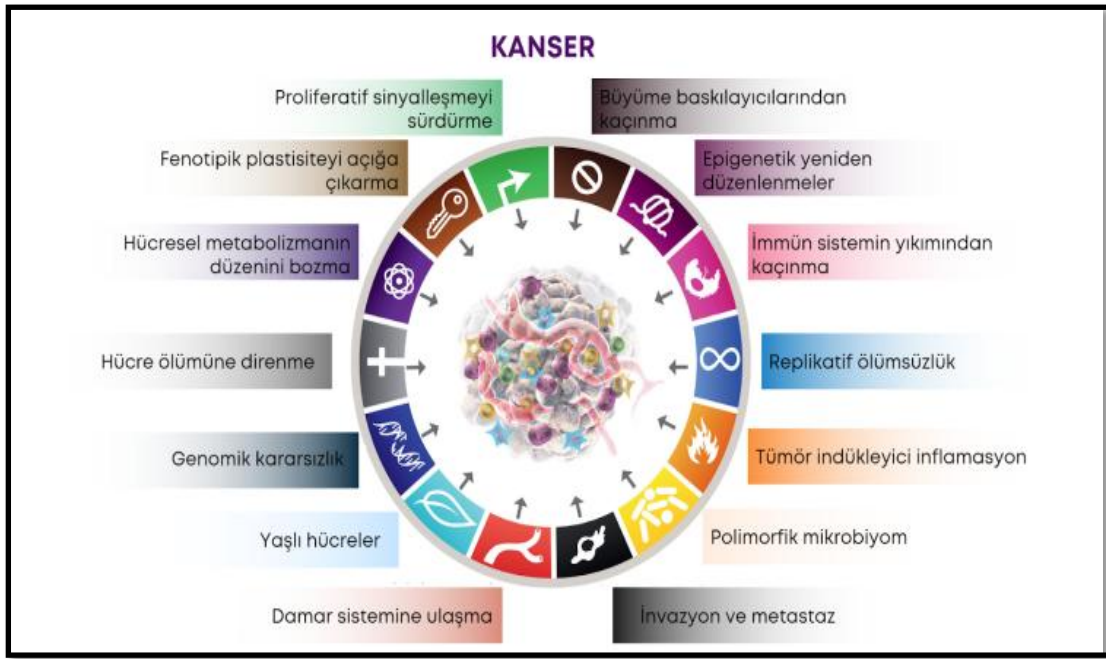
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Tarih boyunca kanser hem insanlarda hem de hayvanlarda yaygın olarak görülen önemli bir sağlık sorunu olmuştur. Kanser terimi, Latince “*cancer*” sözcüğünden türemiş olup kökeni Yunanca “*karkinos*” kavramına dayanır; Hipokratik metinlerde bu terim, MÖ 5. yüzyıl dolaylarında, yengece benzetilen sert ve anormal tümöral oluşumları tanımlamak için kullanılmıştır; Galen ise daha sonra “*onkos*” terimini genel olarak şişlik/kitle anlamında sistemleştirmiştir (Riva, 2015; Baykara, 2016).

Günümüzde kanser hem dünya genelinde hem de Türkiye’de kardiyovasküler hastalıkların ardından en sık görülen ikinci ölüm nedeni olarak yer almakta olup, insidansında sürekli bir artış gözlenmektedir (World Health Organization, 2022; Türkiye İstatistik Kurumu, 2024). Yüksek mortalite oranları, iş gücü kaybına neden olması, ileri evre vakalarda tedavi ve bakım maliyetlerinin artması ile ülke ekonomisi üzerindeki olumsuz etkileri, kanseri göz ardı edilemeyecek düzeyde önemli bir halk sağlığı problemi haline getirmektedir (Chen vd., 2023).

Çok hücreli organizmalarda organlar belirli bir boyuta ulaştığında, normalde hücre bölünmesi dururken, kanser hücreleri bu düzenleyici mekanizmalara rağmen kontrolsüz şekilde bölünmeye devam eder. Yüksek düzeyde adaptasyon yeteneğine sahip olan bu hücreler, çevrelerindeki normal hücrelerin yaşamını sonlandırarak kendi büyümelerini ve çoğalmalarını sürdürebilecekleri bir tümör mikroçevresi oluştururlar (Brown vd., 2023). Kanserin oluşumu multifaktöryel bir süreç olup, bakteriler, virüsler, iyonize radyasyon, genetik yatkınlık, çevresel etkenler, beslenme alışkanlıkları ve kimyasal maddeler gibi pek çok faktör bu süreçte rol oynamaktadır (Williams, 2001). Karsinogenez süreci boyunca kanser hücreleri, kendilerine özgü bazı biyolojik özellikler kazanarak normal hücrelerden ayrılmaktadır. Hanahan ve Weinberg (2011) tarafından tanımlanan bu temel özellikler (Şekil 2.1) arasında: genetik mutasyonların ortaya çıkması, kendi kendine büyüme faktörleri üretebilme, sürekli çoğalma kapasitesine sahip olma, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma, yeni damar oluşumunu (anjiyogenez) indükleme, çevre dokulara invazyon yapabilme ve metastaz oluşturma yeteneği yer almaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2. 1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Kanserleşme süreci, hücrel düzeyde ortaya çıkan genetik değişimlerin yanı sıra, bağışıklık sisteminin bu anormal hücrelerin tanınması ve elimine edilmesi kapasitesinin zayıflaması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Yılmaz ve Altunok, 2011). Mutasyona uğrayan tek bir hücrenin düzenleyici mekanizmalardan bağımsız biçimde proliferasyonu sonucunda oluşan ilk tümörler, genellikle yayılma özelliği göstermeyen iyi huylu (benign) tümörler olarak tanımlanır. Ancak süreç ilerledikçe bu hücreler farklı çevre dokulara infiltrasyon ve uzak organlara yayılım yeteneği kazanarak, kendi beslenme ve dolaşım ağlarını geliştirebilirler. Bu durum, kötü huylu (malign) tümörlerin oluşumuna ve ikincil tümörlerin gelişimine yol açmaktadır (Alberts vd., 2002; Yokota ve Kohno, 2004).

Kanser, primer dokuyla sınırlı kalmayıp metastatik kaskad aracılığıyla sistemik yayılım potansiyeline sahip, kompleks ve dinamik bir patolojik süreçtir. Günümüzde standart tedavi rejimleri uygulanmasına rağmen, hastalığın moleküler heterojenliği ve hastaların genetik polimorfizmleri, bireyselleştirilmiş terapötik müdahaleleri zorunlu kılmaktadır. Bireylerin genomik çeşitliliği ve DNA dizilimindeki varyasyonlar, onkolojik süreçlerin çok yönlü ve öngörülemez yapısının temelini oluşturur. Bu nedenle, “onkolojik hastalıklar” terimi, bu karmaşık ve heterojen hastalık grubunun biyolojik ve klinik çeşitliliğini tanımlamak için daha bütüncül ve kapsayıcı bir terminolojik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Fitzmaurice vd., 2015).

Onkoloji bilimi, kanserin tüm alt tiplerini kapsayan geniş bir disiplin olup yalnızca tedavi süreçlerini değil, aynı zamanda hastalığa neden olan faktörlerin belirlenmesini ve kanserin ortaya çıkmadan önce önlenmesini de amaçlamaktadır (Liu vd., 2021). Kanserın biyolojik, genetik, çevresel ve psikososyal yönleri göz önüne alındığında, bu hastalık oldukça karmaşık ve multidisipliner bir sağlık problemi niteliği taşımaktadır. Bu nedenle onkoloji, tedavi yaklaşımlarında radyoterapi, kemoterapi, cerrahi girişimler, immünoterapi, hormon temelli yaklaşımlar, hedefe özgü tedavi stratejileri ve gen temelli tedaviler gibi farklı biyolojik yöntemleri tek başına veya kombine biçimde kullanmaktadır. Günümüzde insan vücudunda gelişebilen 100'den fazla kanser türü tanımlanmış olup, bu durum kanser araştırmalarının ve tedavi stratejilerinin çeşitliliğini ortaya koymaktadır (Pavlopoulou vd., 2015).

2.1.1. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, Kuzey Amerika başta olmak üzere gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenini oluşturmaktadır (%12,4). Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN), 2022 yılına ait akciğer kanseri özel raporuna göre, her yıl yaklaşık 2,5 milyon yeni vaka ile dünya genelinde (her iki cinsiyeti kapsayacak şekilde) en çok teşhis edilen kanser türüdür. Küresel çabalar olmazsa, akciğer kanseri ölümlerinin 2035 yılına kadar %30 oranında artacağı tahmin edilmektedir (Bray vd., 2024).

Akciğer kanserine bağlı ölümlerin büyük bir kısmı, hastalığın genellikle ileri evrelere ulaşmadan önce tespit edilememesinden kaynaklanmaktadır (Maringe vd., 2020). Hastalığın patogenezinin ayrıntılı olarak aydınlatılması, erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve etkili tedavi ajanlarının kullanılması, akciğer kanserinin kontrol altına alınmasında belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, özellikle yüksek risk grubunda yer alan bireylerin (örneğin sigara kullananlar ile zararlı dumanlara, petrol ürünlerine veya toksik çalışma ortamlarına maruz kalanlar) erken dönemde taranması büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, erken evrede tanı koyulmasını sağlayacak duyarlı ve özgül biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik çalışmaların hızla ilerletilmesi gerekmektedir (Wadowska vd., 2020; Bi vd., 2025). Doğru ve zamanında tanı, akciğer kanseri hastalarına en uygun tedavi yaklaşımının uygulanabilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir (Zhang vd., 2022).

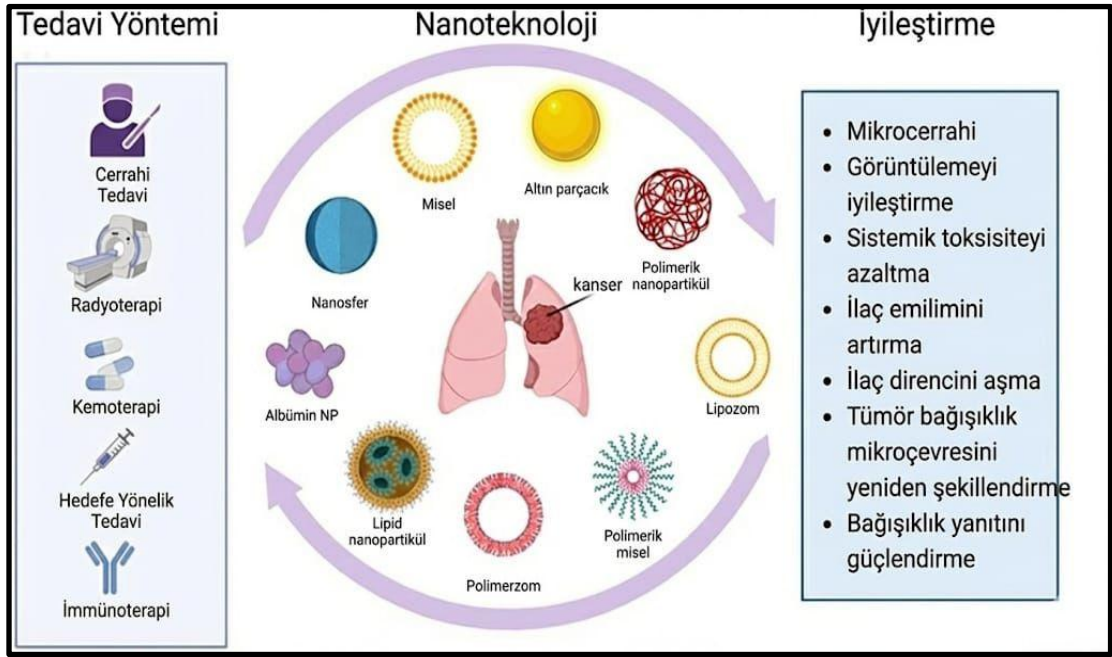
Akciğer kanserinin moleküler patogenezi son derece karmaşık ve heterojen bir yapı göstermektedir. Hastalığın gelişimi; nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, insersiyonlar,

delesyonlar ve translokasyonlar gibi çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin birikimi sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Bu süreç, çoğunlukla hücre proliferasyonunu destekleyen sinyal yollarının aşırı aktivasyonu ve tümör baskılayıcı mekanizmaların baskılanması ile ilişkilidir (Cooper vd., 2013).

Akciğer kanseri, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHDAK) olmak üzere iki temel alt grupta sınıflandırılmaktadır. KHDAK'lar tipik olarak adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom (SqCC) ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılır (Inamura, 2017). Akciğer kanseri olgularının yaklaşık %85'ini KHDAK grubu kapsamaktadır; KHAK grubu ise olguların yaklaşık %15'ini oluşturur (Herbst vd., 2018).

Yeni moleküler tanı yöntemleri, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve anaplastik lenfoma kinazı (ALK) gibi kanserle ilişkili tetikleyici değişikliklerin tespitini kolaylaştırmıştır (Khoo vd., 2015). Ayrıca, kanserin doğru evrenmesi, hastalar için tedavinin planlanması açısından önemlidir. Son zamanlarda, tetikleyici mutasyonlar ve immünoterapiler için hedefli tedaviler de dahil olmak üzere kişiselleştirilmiş bir tedavi yaklaşımı hastalar için kullanılmaktadır (Anagnostou ve Brahmer, 2015). Klinik tanı sürecinde akciğer kanserine yönelik yaklaşımlar genel olarak görüntüleme teknikleri ve patolojik değerlendirmeler olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. Görüntüleme temelli tanı yöntemleri, özellikle düşük doz bilgisayarlı tomografi (LDCT), invaziv olmayan yapısı sayesinde erken evre akciğer kanserinin taranmasında yaygın biçimde tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemler yüksek oranda yanlış pozitif sonuç verme olasılığı, sınırlı duyarlılık düzeyi ve radyasyon maruziyetiyle ilişkili riskler nedeniyle bazı kısıtlamalara sahiptir (Humphrey vd., 2013; Lindeman vd., 2013; Nooreldeen ve Bach, 2021).

Son yıllarda, hedefli tedavilerin ve immünoterapilerin geliştirilmesi, akciğer kanseri hastaları için yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Şekil 2.2). 21. yüzyıldan itibaren nanoteknolojide yaşanan hızlı ilerlemeler, çeşitli malign tümörlerin tanı ve tedavisinde önemli bir potansiyel ortaya koymuştur (Bogart vd., 2022). Boyutları 1 ila 100 nm arasında değişen katı partiküller olan nanopartiküller, yüksek hedeflenebilirlikleri ve kolay fonksiyoneleştirilebilir yapıları sayesinde kanser tanı ve tedavi alanında önemli bir yere sahiptir (Madamsetty vd., 2019).



Şekil 2. 2. Akciğer kanseri tedavisinde nanoteknolojinin araştırma ve uygulamaları

Tümörlerin tanı ve tedavisinde nanopartiküller, yüksek biyoyararlanım, gelişmiş çözünürlük, üstün *in vivo* stabilite, kontrollü salınım ve hedefe yönelik iletim gibi avantajlar sunan yenilikçi nano-taşıyıcı sistemler olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu sistemler, kemoterapötik ajanların veya doğal bileşiklerin doğrudan tümör dokusuna taşınmasını sağlayarak terapötik etkinliği artırmakta ve sistemik toksisiteyi azaltmaktadır (Cryer ve Thorley, 2019). Nanotaşıyıcılar aracılığıyla gerçekleştirilen bu hedefli iletim, tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkinin güçlenmesine katkıda bulunurken, aynı zamanda ilaç direncinin gelişimini de önemli ölçüde engellemektedir. Böylece nanopartikül temelli sistemler, klasik kemoterapi yaklaşımlarına kıyasla daha güvenli, etkili ve sürdürülebilir bir tedavi stratejisi sunmaktadır (Davodabadi vd., 2023).

2.2. Kanser Tedavisinde Hedefli İlaç Dağıtımı

Nanoteknoloji, çeşitli farmakolojik ajanların terapötik etkinliğini ve güvenliğini artırma potansiyeli sunan yenilikçi ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde umut verici bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Biyoaktif bileşiklerin nanopartiküller içinde kapsüllemesi, fizikokimyasal özelliklerini, biyoyararlanımlarını ve belirli etki alanlarına hedefli dağıtımlarını geliştirebildiği için büyük ilgi görmüştür. Bu yaklaşım, geleneksel ilaç dağıtım yöntemlerinin zayıf çözünürlük, düşük biyoyararlanım ve hedef dışı etkiler gibi sınırlamalarının üstesinden gelme ve böylece genel terapötik sonuçları iyileştirme yeteneğine sahiptir (Kazemi-Pasarvi vd.,

2020). Nanoparçacık tabanlı biyosensörler, spesifik biyobelirteçleri yüksek hassasiyet ve özgüllükle tespit ederek çeşitli hastalıkların erken teşhisini sağlayabilme gibi tıp alanında, nanopartiküller teşhis araçlarında kullanılarak hastalıkların daha hassas ve doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır (Yue vd., 2023). Ek olarak, nanomalzemelerin terapötik ilaçları istenen etki bölgesine seçici olarak taşıyabildikleri ve serbest bırakabildikleri, etkinliği artırdıkları ve yan etkileri azalttıkları hedefli ilaç dağıtımındaki potansiyelleri için araştırılmıştır (Pasinszki vd., 2017). Nanoteknolojideki hızlı ilerlemelerle birlikte, farmasötik ilaç dağıtım alanı geleneksel ilaç dağıtım sistemleriyle ilişkili zorlukların üstesinden gelmek için nanopartiküllerin benzersiz özelliklerinden ve yeteneklerinden yararlanarak dönüştürücü bir paradigma değişimine tanık olmuştur (Liu vd., 2024).

Modern ilaç dağıtım sistemleri, farmasötik bileşiklerin hassas, kontrollü ve verimli bir şekilde iletilmesini sağlayarak tedavi yaklaşımlarında devrim yaratmıştır (Ciftci vd., 2025). Bu tür dağıtım stratejileri nanoteknoloji kullanılarak gerçekleştirilebilir. Tipik olarak, nanopartikül bazlı ilaç dağıtımını aktif ve pasif ilaç dağıtımını olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Dang ve Guan, 2020).

2.2.1. Pasif hedefleme

Nanopartikül temelli ilaç taşıma platformlarının en önemli avantajlarından biri, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları, birden fazla ilacı aynı anda taşıyabilmeleri ve ilaçların bozunmasına karşı koruma sağlamalarıdır (Dağlıoğlu vd., 2018). Genel olarak, pasif hedefleme, ilaçların doğal fizyolojik süreçler ve faktörler yoluyla belirli bölgelere iletilmesidir. Pasif hedefleme, ilaçları gerekli bölgeye taşımak için normal ve patolojik dokular arasındaki anatomik farklılıkları kullanır. Araştırmalar, bazı durumlarda (örneğin tümör hücrelerinde) kan damarı duvarlarının geçirgenliğinin arttığını göstermiştir (Zhong, 2014). Bu kapsamda, lipozomlar, polimerik nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller gibi nano taşıyıcı sistemler, tümör dokularında *enhanced permeability and retention (EPR)*; gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi) yoluyla pasif hedefleme potansiyelleri nedeniyle son yıllarda yoğun araştırma ilgisine konu olmuştur (Alkaç vd., 2024). Ayrıca, suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların biyoyararlanımını artırmak amacıyla nanopartiküller, bu bileşikleri kapsülleyerek dolaşıma katılmalarını kolaylaştıran etkili platformlar sunar (Şeker, 2023). NP'lerin boyutları, yüzey özellikleri ve EPR etkisine katkıları sayesinde, ilaçların biyolojik yarı ömrü uzatılabilir ve tümör dokularında hedefli birikim sağlanabilir (Kalyane vd., 2019).

2.2.2. Aktif hedefleme

Aktif hedefleme, bir ilacın hedef noktaya özelleşmesini sağlayacak şekilde hedeflemeyi iyileştirir. Hastalıklı doku, onunla ilişkili hücrelerdeki reseptörlerin doğası bilinerek aktif olarak hedeflenebilir. Bu, ilacın ilgili reseptörlere sahip hücrelere spesifik olarak bağlanmasını sağlayan ligandların kullanımını mümkün kılar (Zhong vd., 2014). Aktif hedefleme, pasif hedeflemenin sınırlamalarının üstesinden gelmek ve ilaç direncini aşmak, ayrıca kemoterapötik ilaçların hedef dışı dağılımını en aza indirmek için kullanılır (Kirtane vd., 2013).

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemlerinde Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

2.3.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, özellikle son yıllarda tıp, biyoteknoloji ve mühendislik alanlarında hızla gelişen ve geniş uygulama alanı bulan önemli bir bilim dalıdır. Nanobilim teorisini, nanometre ölçeğinde maddeyi gözlemleyerek, ölçerek, işleyerek, birleştirerek, kontrol ederek ve üreterek yararlı uygulamalara dönüştürme yeteneğidir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), nanoteknolojiyi “kimyadan, fizikten ve biyolojiden tıp, mühendislik ve elektroniğe kadar çok çeşitli alanlarda yeni uygulamalara olanak tanıyan benzersiz fenomenlerin bulunduğu nanoskalada (1 ila 100 nm) yürütülen bir bilim, mühendislik ve teknoloji” olarak tanımlar (Keskin, 2011). Kavramsal olarak nanoteknolojinin ortaya çıkışı 1950’li yılların sonlarına dayanmaktadır. Bu alanın temelleri, Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman’ın 29 Aralık 1959 tarihinde Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü’nde malzeme ve cihazların moleküler ölçekte üretimine ilişkin öngörülerini paylaştığı “There is Plenty of Room at the Bottom” başlıklı ünlü konuşmasına dayandırılmaktadır. Türkçeye “Aşağıda Oldukça Yer Var” olarak çevrilen konuşmasında, Feynman minyatürize edilmiş enstrümanların ve nano yapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda kullanılabilceğinin altını çizmiştir (Feynman, 2018). Nanoteknoloji, enerji ve elektronikten tıp ve tarıma kadar çeşitli sektörlerde yaygın uygulamalar bulmuştur (Malik vd., 2023).

2.3.2. Nanopartiküller

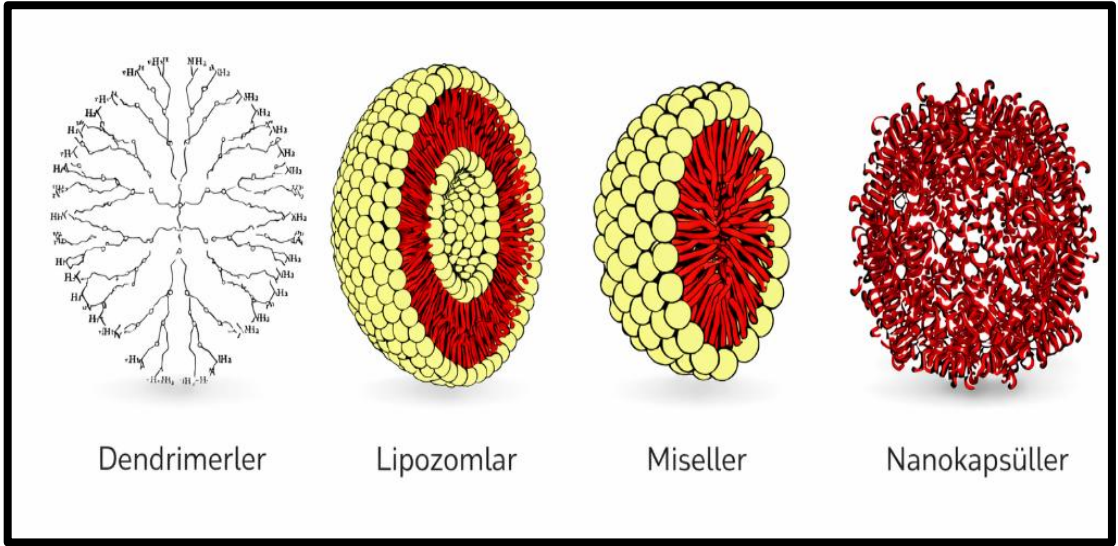
Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), nanopartikülleri, tüm dış boyutları nano ölçekte olan ve nano nesnenin en uzun ve en kısa eksenlerinin uzunlukları arasında önemli bir fark olmayan nano nesnelere olarak tanımlar. Boyutlar önemli ölçüde farklıysa (genellikle üç kattan fazla), nanofiberler veya nanoplakalar gibi terimler, nanopartikül (NP) terimi yerine tercih

edilebilir. Nanopartiküller genellikle bileşimlerine göre üç ana kategoriye ayrılır: organik, karbon bazlı ve inorganik nanopartiküller. Küresel, silindirik, konik, boru şeklinde, içi boş çekirdekli, spiral vb. veya düzensiz gibi farklı şekil, boyut ve yapılarda olabilir (Ealia ve Saravanakumar, 2017). 1 ila 100 nm arasında herhangi bir değerde olabilen nanopartiküllerin boyutu 1 nm'nin altına düşerse, genellikle atom kümeleri terimi tercih edilir. NP'ler, tek veya çok kristalli katılarla kristal veya amorf olabildikleri gibi gevşek veya kümelenmiş de olabilir (Ijaz vd., 2020). Homojen yapıda ya da birden fazla katmandan oluşabilen nanopartiküllerde, katmanlı yapı söz konusu olduğunda, küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler veya polimerlerden oluşabilen bir yüzey tabakası, çekirdekten kimyasal olarak farklı bir malzemeden meydana gelen bir kabuk tabakası ya da nanopartikülün merkezini oluşturan çekirdek kısmı yer alabilmektedir (Khan vd., 2019).

Parenteral uygulamanın ardından nanopartiküllerin boyutları ve yüzey özellikleri, pasif ve aktif hedefleme yaklaşımları kapsamında ilaçların hedef dokuya yönlendirilmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır (Mandl vd., 2019). Yüksek ilaç yükleme kapasitelerine sahip olan nanopartikül sistemler, terapötik ajanların herhangi bir kimyasal reaksiyona maruz kalmadan yapıya entegre edilmesine olanak tanıyarak, bu ajanların yapısal bütünlüğünün ve biyolojik etkinliğinin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bu sistemler; nazal, oral, parenteral ve oküler uygulama yolları dahil olmak üzere farklı farmasötik iletim rotalarında etkin bir şekilde kullanılabilir (Zhao vd., 2024). Nanopartiküller, ilacın vücuttan hızlı uzaklaştırılmasını ve organlar arasında düzensiz dağılımını sınırlandırarak hedef bölgede kontrollü ve sürdürülebilir salımını sağlamakta, böylece tedavi etkinliğini artırırken advers etkileri azaltmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006). Bunun yanı sıra, kontrollü salım ve partikül bozunma süreçleri, nanopartikül matrisini oluşturan bileşenlerin çeşitliliği sayesinde kolaylıkla düzenlenebilirken, belirli doku veya organlara yönelik hedefleme ise nanopartikül yüzeyine özgül ligandların kovalent ya da elektrostatik bağlarla konjuge edilmesi veya manyetik yönlendirme stratejilerinin uygulanmasıyla gerçekleştirilebilmektedir (Mandl vd., 2019).

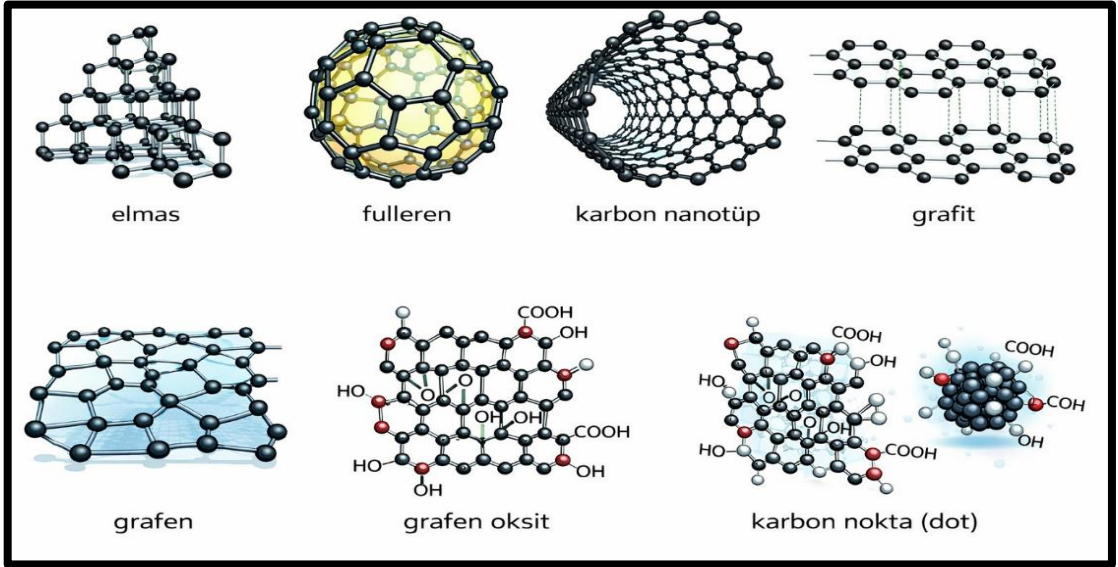
2.3.2.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması

Organik nanopartiküller, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, polimerler veya diğer organik bileşiklerden oluşan nanopartiküller bu kategoriye dahildir (Şekil 2.3). Bu nanopartiküller genellikle toksik değildir, biyolojik olarak parçalanabilir ve bazı durumlarda lipozomlar gibi içi boş bir çekirdek yapısına sahip olabilir (Pan ve Zhong, 2016).



Şekil 2. 3. Organik nanopartiküller (Joudeh ve Linke, 2022)

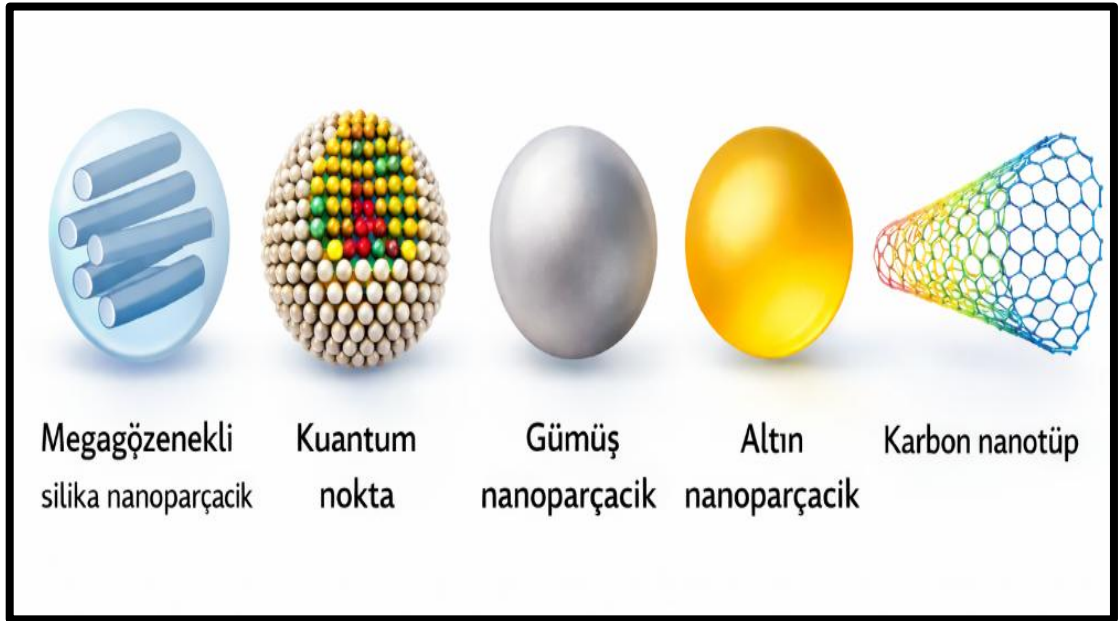
Karbon bazlı nanopartiküllerin bilinen örnekleri fullerenler, karbon siyahı NP'ler ve karbon kuantum noktalarıdır (Şekil 2.4). Bu sınıf yalnızca karbon atomlarından yapılmış NP'leri içerir (Ealia ve Saravanakumar, 2017). Karbon siyahı nanopartiküller, yüksek derecede aglomere olmuş küresel yapıdaki parçacıkların üzüm salkımını andıran kümeler halinde bir araya gelmesiyle karakterizedir (Yuan vd., 2019). Karbon kuantum noktaları, 10 nm'nin altındaki boyutlara sahip ayrı, yarı küresel karbon NP'lerinden oluşur (Lu vd., 2016).



Şekil 2. 4. Karbon bazlı nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller, hacimlerine kıyasla daha yüksek yüzey alanı avantajı sunar. Geniş ve kolay modifiye edilebilir yüzey konjugasyon kimyasına sahip olmaları ve hazırlanmalarının görece kolay olması önemli bir üstünlüktür (Unnikrishnan vd., 2023). İnorganik

nanopartiküller, özellikle metal ve metal oksit bazlı nanopartiküller, en popüler olanlar arasındadır. İlaç dağıtımı gibi çeşitli uygulamalarda, taşıyıcının kan dolaşımındaki iyi stabilitesi ve yarı ömrü, yeterli biyodağılım ve ilacın istenen hedef bölgeye hedeflenmiş dağıtımı ile karakterize edilir (Chandrakala vd., 2022). Tüm NP'ler arasında inorganik NP'ler en bol üretilen ve ticari olarak kullanılanlar arasındadır (Alam ve Qurashi, 2014). İnorganik NP'ler amorf, polikristalin, yoğun, gözenekli ve içi boş gibi çeşitli şekillerde olabilir (Şekil 2.5) ve ısı direnci ve dayanıklılık özellikleriyle bilinir. Gelişmiş ilaç etkinliği ve azaltılmış yan etkiler için tasarlanmış ilaç salım sistemleri, yeni malzemelerin geliştirilmesiyle birlikte gelişmiştir. Kanser karşıtı ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Lammari vd., 2020).



Şekil 2. 5. İnorganik nanopartiküller

2.3.2.2. Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerinin yapısı ve anti-kanser özellikleri

Titanyum dioksit (TiO₂), bilim ve teknoloji alanlarında yaygın biçimde kullanılan, geçiş metal oksitleri sınıfında yer alan bir yarı iletken materyaldir (Rahimi vd., 2016). TiO₂, dünyada en bol bulunan ve yaygın olarak kullanılan metal oksit nanomalzemelerden biridir (Zhang vd., 2015). TiO₂'nin fotokatalitik özellikleri, insan sağlığı alanında geniş bir araştırma alanı oluşturmuş ve özellikle kanser tedavisinde potansiyel kullanımları nedeniyle dikkat çekmiştir (Ghareeb vd., 2024). Toz halinde ve giderek artan bir şekilde nanopartikül formunda olmak üzere birçok uygulamada yaygın olarak kullanılır ve normalde kullanılan konsantrasyonlarda toksik olmadığı kabul edilir (Kabadayı, 2025). Titanyum dioksit rutil, anataz ve brokit olmak

üzere üç fazda bulunur (Braun vd., 1992). Bu kristal fazlar, altı oksijen anyonunun üç titanyum katyonu tarafından paylaşıldığı oktahedral birimlerden oluşur; bu nedenle $TiO_{6/3}$ şeklinde ifade edilen yapı, toplamda TiO_2 formülüne karşılık gelmektedir (Shand ve Anderson, 2013).

Üç boyutlu uzayda genişleme sürecinde, TiO_2 'nin temelini oluşturan oktahedral birimler her polimorf fazda farklı biçimlerde düzenlenir ve bozulur; bu durum, her bir fazın kendine özgü kristal yapısının oluşmasına neden olur (Shand ve Anderson, 2013). Bu nedenle TiO_2 'nin üç ana polimorfik formu olan rutil, anataz ve brookit formları şekil, kristal yapı, yoğunluk ve kırılma indisi bakımından belirgin farklılıklar gösterir (Braun vd., 1992). Rutil fazı, sentez ve kullanım süreçlerinde faz dönüşümüne nadiren uğraması nedeniyle, diğer fazlara kıyasla daha yüksek yapısal stabiliteye sahiptir. Buna karşın, metastabil özellik gösteren anataz ve brookit fazları, mineralin endüstriyel kullanım amacına veya işlem koşullarına bağlı olarak, termodinamik açıdan daha kararlı olan rutil fazına dönüşebilmektedir (Cihlar vd., 2021; Jing vd., 2013). Özellikle brookit, doğada nadir bulunan bir kristal faz olup, endüstriyel ölçekte sentezi ve üretimi oldukça zordur (Shand ve Anderson, 2013). Anataz ve rutil fazları tetragonal kristal yapıya sahipken, brookit fazı ortorombik kristal sistemde yer almaktadır. Bu fazlar arasındaki temel farklılık, atomlar arası bağlanma düzenlerinden kaynaklanmaktadır. Rutil fazı, düz zincirlerin bir araya gelmesiyle oluşan bir yapı sergiler ve bu zincirlerin köşelerinde yer alan oksijen atomlarının bağlanması sonucunda tetragonal kristal yapı meydana gelir. Anataz fazında ise köşe konumlarında oksijen atomları bulunmamakta olup yapı tamamen tetragonal özellik göstermektedir. Brookit kristal yapısı ise oktahedral birimlerin farklı bir dizilimiyle karakterize edilmektedir (Sadıa vd., 2024).

Titanyum dioksit nanopartikülleri, fotokatalizörler, ilaçlar, işlenmiş gıdalar ve ev ürünleri, kozmetik beyaz pigmentler, kumaşlar, boyalar ve güneş kremleri gibi uygulamalardaki çok yönlülükleri nedeniyle endüstride kullanılan en iyi beş nanopartikül arasında yer almaktadır (Kiss, 2009). Biyouyumlulukları nedeniyle TiO_2 antikanser ilaçlar ve genler için potansiyel taşıyıcı sistemler olarak araştırılmıştır (You vd., 2016). Mikro boyutlu partiküllerle karşılaştırıldığında, titanyum dioksit nanopartiküllerinin daha yüksek katalitik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Gopinath vd., 2020; Jing vd., 2013). Bu durum, partikül boyutunun küçülmesiyle birlikte katalitik reaksiyonlar için kullanılabilir yüzey alanının artmasından kaynaklanmaktadır (Shukla vd., 2011).

Son yıllarda, nano-TiO₂'nin antikanser ajan olarak değerlendirilmesiyle birlikte fotokatalitik uygulamaların tıp alanındaki kullanımlarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Balachandran vd., 2021). TiO₂ nanopartiküllerinin fotokatalitik aktivitesi, 1980'lerdeki atılımından bu yana güneş enerjisi, çevresel iyileştirme ve fotodinamik terapi (PDT) uygulamalarından dolayı kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Ramacharyulu vd., 2015; Qu ve Duan, 2013). Işık ışınımı altında, TiO₂'nin değerlik bandı elektronları (e⁻) uyarılır ve iletim bandına geçer, geriye pozitif yüklü boşluklar (h⁺) kalır. İletim bandındaki e⁻ ve h⁺ hücreyel reaktif oksijen türleri (ROS) üretme yeteneğine sahiptir (Yamaguchi vd., 2011). Bir fotosensitizatör tarafından ışıkla indüklenen ROS üretimi, PDT olarak adlandırılan çeşitli hastalıkların tedavisinde uygulanmıştır (Agostinis vd., 2011; Kushibiki vd., 2015). TiO₂ nanopartiküllerinin lösemi, servikal, karaciğer ve akciğer kanserleri gibi farklı kanser türleri için PDT'de uygulanma potansiyeli daha önce bildirilmiştir (Lagopati vd., 2014; Wang vd., 2015).

Nanobiyoteknoloji alanındaki modern gelişmeler, TiO₂ nanopartiküllerinin sentezi ve fonksiyonelleştirilmesinde de önemli ilerlemelere yol açmıştır. Nano-TiO₂ üretimi için çeşitli sentetik yaklaşımlar geliştirilmiş olsa da bu yöntemler genellikle yüksek maliyetler ve potansiyel çevresel sorunlarla ilişkilendirilmektedir (Irshad vd., 2021). Birçok çalışma TiO₂ NP'lerin inflamasyona, sitotoksositeye ve genotoksositeye neden olduğunu bulmuştur (Trouiller vd., 2009; Wu vd., 2009).

2.3.3. Nanokompozitler

Nanoteknolojinin önemli segmentlerinden biri, özelliklerini geliştirmek için nanopartikülleri geleneksel malzemelerle birleştirmektir. En az bir fazının boyutlarının nanometre ölçeğinde olduğu kompozitlere nanokompozitler denir (Hassan vd., 2021). Nanokompozitler, benzersiz bir özellik ve yapısal tasarım kombinasyonu sergileyerek yüksek performanslı uygulamalar için uygun hale gelirler. Mühendislik alanındaki artan büyüme ve talep ile birlikte, ambalajdan tıbbi uygulamalara kadar farklı alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptirler (Karki vd., 2021).

Kanserle ilgili tedavi ve ilaç dağıtımında süpramoleküler polimer nanokompozitlerin kullanılmasının birçok avantajı vardır. İlaç taşıyıcıları olarak, tipik uyarıcıya duyarlı davranış sergilerler ve çeşitli iç ve dış uyarıcılar (örneğin, pH, ışık, redoks ajanları, sıcaklık, elektrik alanı, enzim vb.) ile ilaçların hedeflenen ve isteğe bağlı salınımını kontrol etmek için akıllı taşıyıcılar olarak hizmet edebilirler (Merino vd., 2015).

En popüler kompozitler, farklı malzemelerin minik parçacıklarıyla güçlendirilmiş olanlardır. Tipik olarak, parçacıklar matrisin mukavemetini ve modülünü artırmak için eklenir. Parçacık boyutunu nano ölçeğe indirgeyerek yeni malzeme nitelikleri elde edilebilir (Thippeswamy vd., 2021). İşleme kolaylığı ve seri üretime uygunluğu nedeniyle, nanopartiküller yüksek performanslı kompozitler oluşturulurken sıklıkla dolgu maddesi olarak kullanılır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin matris içinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak esastır; bu, nanopartiküllerin daha güçlü çekim kuvvetleri nedeniyle kümelenme eğiliminde olmaları nedeniyle bazen zordur (Bokobza, 2023).

2.3.4. Enkapsülasyon

Son yıllarda, çeşitli matrisler kullanılarak ekstraktlar, uçucu yağlar veya saf doğal biyoaktif bileşikler gibi doğal ürünlerin kapsüllenmesi için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Munin ve Edwards-Lévy, 2011). Enkapsülasyon, katı, sıvı veya gaz formundaki maddelerin belirli amaçlar doğrultusunda koruyucu bir tabaka ya da kaplama materyali ile çevrelenmesi süreci olarak tanımlanmaktadır (Madene vd., 2006). Genel olarak enkapsülasyonun temel amacı, kararsız ve hassas biyoaktif bileşenleri olumsuz çevresel koşullara karşı korumaktır. Enkapsülasyon sürecinde kullanılan kaplama materyali “kabuk, duvar materyali, membran, dış faz, taşıyıcı ve kapsül ajanı”, kaplanacak materyal ise “iç faz, çekirdek materyali, enkapsülant, aktif materyal ve dolgu” gibi isimlerle adlandırılmaktadır (Mahdavi vd., 2014).

Kapsülleme sistemleri temel olarak iki ana yapıda sınıflandırılmaktadır: rezervuar tipi ve matriks tipi. Bu sistemlerde kapsül yapıları yalnızca küresel formda değil, aynı zamanda silindirik, oval ya da düzensiz geometrik şekillerde de oluşturulabilmektedir (Zuidam ve Nedovic, 2010). Rezervuar tipindeki enkapsülasyon yapılarında aktif bileşen, onu çevreleyen bir kabuk tabakası içinde yer alır. Bu tip kapsüller, tek çekirdekli veya kabuk-çekirdek tipi olarak da tanımlanabilir. Bazı durumlarda, tek bir kapsül içerisinde birden fazla çekirdek yapısının bulunduğu çoklu çekirdekli kapsüller de kullanılmaktadır. Matriks tipinde ise aktif madde, taşıyıcı faz içerisinde daha homojen bir biçimde dağılmıştır; bu sayede bileşenler küçük damlacıklar halinde veya kapsül matriksi boyunca eşit şekilde yayılmış olarak bulunabilir. Rezervuar tipinden farklı olarak, matriks sistemlerde aktif ajanlar genellikle yüzeye yakın konumlanır (Zuidam ve Nedovic, 2010). Bu iki kapsülleme yapısı, aktif bileşiğin kontrollü salım davranışını, biyoyararlanımını ve stabilitesini doğrudan etkileyerek uygulama performansını belirleyen önemli unsurlar arasında yer almaktadır (Zuidam ve Nedovic, 2010).

2.3.4.1. İyonik jelasyon

Çoğu durumda sulu polimer çözeltisi olarak bulunan kaplama malzemesi ve çekirdek materyali, bir dağıtıcı fazda (örneğin, bir elektrolit çözeltisi) küresel jel şeklinde nanopartiküllerin oluşumu ile sonuçlanan damlalara dönüştürülür. İyonik etkileşim nanokapsül oluşumunun temelini oluşturur. Nanokapsül oluşumunu sağlayan teknikler arasında yer alan iyonik jelasyon; organik çözücüler, farklı sıcaklık ve pH koşullarının kullanılabilmesi, proses koşullarının kontrol edilebilir olması, kararlı nano boyutta partiküllerin oluşumu gibi üstün özelliklere sahip olması nedeniyle dikkat çekmiştir (Suganya ve Anuradha, 2017; Fan vd., 2012). Genel olarak, iyonik jelleşme zıt yüklü moleküller arasında meydana gelir. Pozitif yüklü polimer zincirleri negatif yüklü iki değerlikli veya çok değerlikli iyonlarla reaksiyona girer. Elektrostatik reaksiyon, birbirine bağlı nanofibril ağlarına sahip mikroyapılı parçacıkların oluşmasına yol açar (Auriemma vd., 2020).

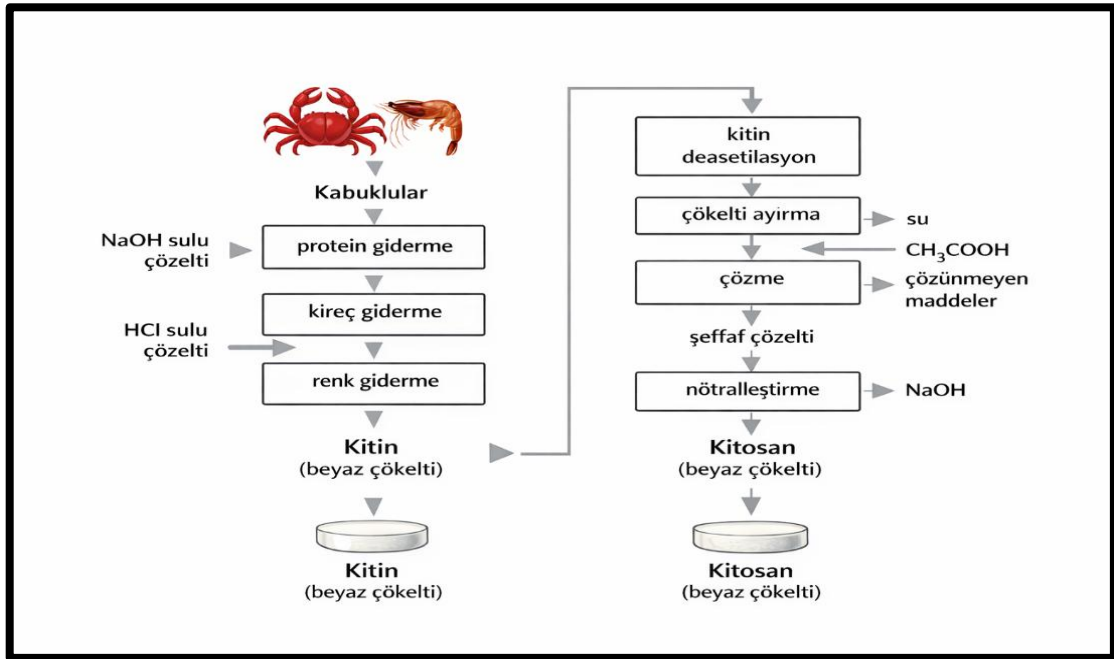
2.3.5. Biyopolimerler

Biyopolimer esaslı nanopartiküller/hidrojel, ilaç ve gen taşıyıcı, doku iskelesi ve yara iyileştirme materyali olarak kullanılır (Nitta ve Numata, 2013). Polisakkaritler, glikozidik bağlarla bir araya getirilmiş tekrarlanan monosakkarit birimlerinden oluşan uzun karbonhidrat molekülleridir. Kitin, aljinat, heparin, hiyalüronik asit, pullulan ve dekstran polisakkaritlere örnektir. Biyopolimerik nanopartiküller, biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, toksik olmamaları ve diğer avantajlı özellikleri nedeniyle çeşitli sağlık uygulamaları için uygundur (Kučuk vd., 2023).

Sürdürülebilir kalkınmanın amacı, çeşitli endüstriyel sektörlerde geleneksel petrol bazlı polimerlerin yerine daha çevre dostu malzemelerin kullanılmasıdır. Sonuç olarak, son yıllarda biyobazlı polimerlerin üretiminin ve kullanımının artması, biyopolimerleri bu hedefe ulaşmanın en umut verici yollarından biri haline getirmiştir. Tarımsal gıda atıklarının değerlendirilmesi, maya, alg veya bakteriyel fermantasyonla üretilen biyopolimerler ve polisakkaritler, proteinler ve lipitler gibi doğrudan biyokütleden elde edilenler, özellikle tıbbi ürünler, gıda ambalajları, tarımsal filmler, membran proses uygulamaları, sürdürülebilir giyim ve biyobazlı polimerlerdeki son başarılı gelişmelere rağmen iyileştirme gerektiren diğer alanlar için büyük ilgi uyandırmıştır (Balart vd., 2021).

2.3.5.1. Biyomalzeme olarak kitosan

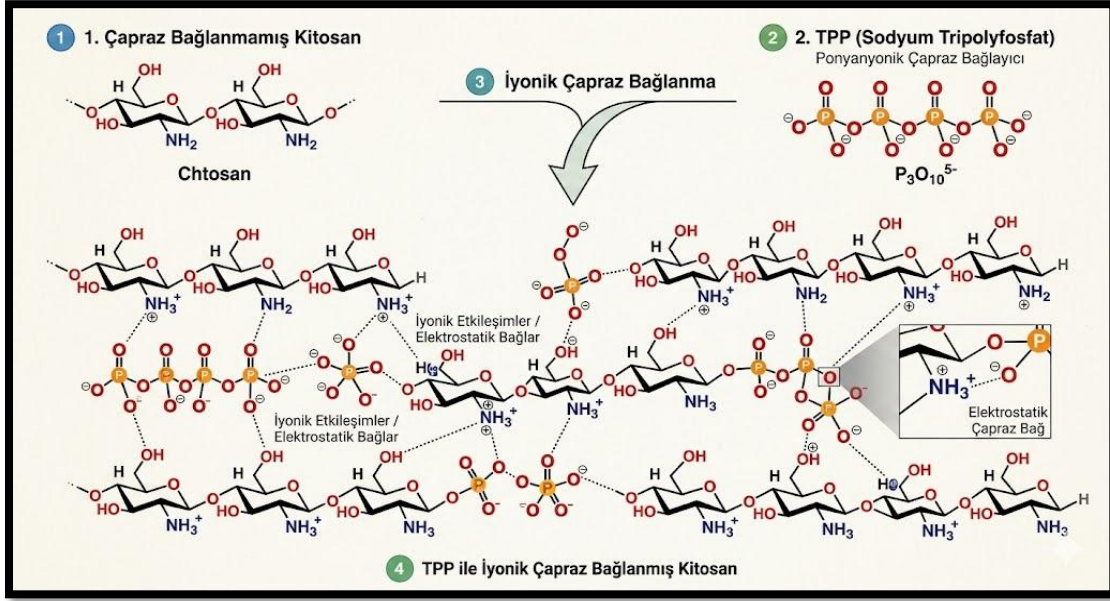
Kitosan marin organizmalarda bulunan bir polisakkarittir. Gıda endüstrisinden elde edilen kabuklu deniz canlılarına (karides, yengeç, kalamar vb.) ait atıkların NaOH ile işlenmesi sonucu elde edilen kitinin, sıcak ve %40-50 NaOH ortamında deasetilasyonu ile kitosan üretilir (Li vd., 2018). Şekil 2.6’da kitosanın üretim prosesi şematize edilmiştir.



Şekil 2. 6. Kitosan üretim prosesi

Kitosan son birkaç yıldır giderek daha fazla ilgi gören bir biyomalzeme olarak ortaya çıkmıştır. Biyoyuymululuk, biyobozunurluk ve düşük toksisite gibi faydalı özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler ve nanotaşıyıcı formülasyonlarında yeni bir bakış açısı oluşturmaktadır (Detsi vd., 2020). Kitosan, antioksidan, lipit düşürücü ve antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra film ve jel oluşturma kapasitesi ile kapsülleme potansiyeli yüksek olan doğal bir katyonik polisakkarittir. Bu biyopolimer, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (GRAS) bir madde olarak sınıflandırılmaktadır. Gıda teknolojisi, farmasötik formülasyonlar ve kozmetik endüstrisi gibi birçok farklı alanda geniş uygulama olanaklarına sahiptir (Kumar vd., 2019). Katyonik karakteri sayesinde, asidik ortamda nano ve mikro boyutlu parçacıklar, emülsiyonlar, lifler, hidrojeller, filmler ve membranlar gibi çeşitli yapılar oluşturabilir. Bu yönüyle kitosan, bitki özütleri, uçucu yağlar ve diğer biyoaktif bileşiklerin kapsüllemesinde etkili bir taşıyıcı matris olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kitosan

özellikle polifenolik bileşikler için son zamanlarda birçok rapor yayınlanmıştır; bunların çoğu TPP ile iyonotropik jelleşme (Şekil 2.7) yöntemini kullanmaktadır (Nallamuthu vd., 2015).



Şekil 2. 7. TPP ile iyonik olarak çapraz bağlanmış kitosan

Nispeten kararlı kimyasal yapısı, polikatyonik, zararsız, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleri, kitosanı çok çeşitli organlar, dokular ve hücrelerle biyolojik olarak uyumlu hale getirir. Kitosan molekülleri hem fiziksel hem de fizyolojik olarak aktiftir ve çeşitli uygulamalar için kimyasal veya enzimatik olarak değiştirilebilir (Huq vd., 2022). Kitosan bazlı nanotaşıyıcıların antifungal, antitümör, antiviral, antiinflamatuvar ve antibakteriyel aktiviteleri de dahil olmak üzere sergilediği geniş yelpazedeki terapötik aktiviteler, kitosanın ilaç taşıyıcıları olarak çeşitli uygulamalarını keşfetmeye yönelik kapsamlı araştırmaları tetiklemiştir (Rajitha vd., 2016).

2.4. Bitkisel Kökenli Anti-Kanser Ajanlar ve Timol

Tıbbi bitkiler, insan sağlığının korunması ve hastalıkların tedavisinde doğanın sunduğu önemli kaynaklar arasında yer almaktadır. Bitkiler ve içeriklerindeki biyoaktif bileşikler, eski çağlardan bu yana çeşitli tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda tıbbi bitki türü ve bunlara ait fitokimyasalların kanserin oluşumu, gelişimi ve ilerlemesi üzerinde baskılayıcı etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Aung vd., 2017). Nitekim modern klinik ilaçların %50'sinden fazlasının doğal kaynaklı olduğu ve bu bileşiklerin kanser hücrelerine karşı etkili

tedavi potansiyeli taşıdığı bilinmektedir (Rosangkima ve Prasad, 2004). Bitkiler birçok kemoterapötik ajanının da temel kaynağını oluşturmaktadır. Bu ajanlar genellikle pro-oksidan ve antioksidan etkiler sergileyerek, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırma, mitokondriyal işlev bozukluğunu indükleme, inflamatuvar süreçleri modüle etme ve hücre döngüsünü düzenleme gibi mekanizmalar üzerinden kanser hücreleri üzerinde etkili olmaktadır (Islam vd., 2019).

2.4.1. Timol

Bir fenolik bileşik olan timol, bitkilerde doğal olarak bulunan ve günümüzde özellikle farmasötik alanda yaygın şekilde değerlendirilen önemli bileşiklerden biridir (Salehi vd., 2018). Doğada doğal formlarda bulunmasının yanı sıra, belirli koşullar altında sentezlenerek etki mekanizması geliştirilebilmektedir. Timol (5-metil-2-izopropilfenol) aromatik halka yapısına sahip olup birçok farklı bitki türünde tespit edilmiştir (Yıldız ve Turan, 2021). Bununla birlikte, başlıca doğal kaynağı *Thymus vulgaris* L. bitkisi olup (Şekil 2.8), suda çözünürlüğü sınırlı olan doğal bir fenolik bileşiktir (Escobar vd., 2020). Uçucu yağ özelliği sayesinde timol tarih boyunca yara tedavisinde ve antibakteriyel amaçlarla kullanılmıştır. Gıda sektöründe tatlandırıcı ve koruyucu olarak yer alırken, aromaterapi ve geleneksel tıpta baş ağrısı, öksürük ve ishal gibi rahatsızlıkların giderilmesinde tercih edilmiştir (Waheed vd., 2024). Günümüzde ise başta kozmetik, gıda ve ilaç endüstrileri olmak üzere birçok alanda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Marchese vd., 2016).



Şekil 2. 8. *Thymus vulgaris* (kekik) bitkisinden elde edilen timol

Timol, fenolik bir monoterpen olarak yalnızca kimyasal bileşimi ve kaynak bitki türüne göre çeşitlilik göstermez; aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal başta olmak üzere geniş bir farmakolojik profili vardır. Bu özellikler, biyoaktif bileşiklerin türü ve kimyasıyla ilişkilidir. Doğal monoterpen fenol, biyoaktif potansiyeli nedeniyle birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Escobar vd., 2020).

Yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip fitokimyasalların akciğer fonksiyonlarının korunmasında ve iyileştirilmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Chen vd., 2025). Bu kapsamda timol, DNA hasarını azaltma ve hücrel mutasyonları önleme potansiyeli sayesinde akciğer kanserinin gelişim ve ilerleme süreçlerini baskılayabilmektedir (Gupta, 2021). Timol, MDA, iNOS ve MPO gibi oksidatif stres belirteçlerinin düzeylerini düşürdüğü; buna karşılık SOD, GSH, GPx, CAT ve NADPH gibi antioksidan savunma sistemlerinin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Pandey ve Rizvi, 2010). Ayrıca IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayarak inflamatuvar yanıtı azalttığı ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak inflamatuvar yanıtı azalttığı ve bu yolla kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Dou vd., 2022; Gago vd., 2025). Tüm bu etkiler doğrultusunda timol, akciğer dokusunda oksidatif dengeyi sürdürüp inflamasyonu baskılayarak tümör gelişiminin önlenmesine katkı sağlayan güçlü bir biyoaktif bileşik olarak öne çıkmaktadır (Wen vd., 2022; Li vd., 2023).

3. YÖNTEM

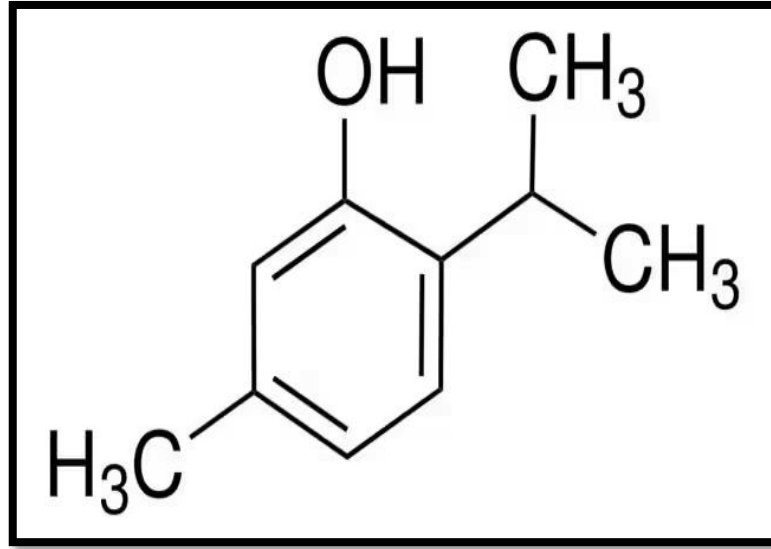
Bu teze ait tüm deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarı ve Ar-Ge Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Nanokompozit bileşiminde kullanılan kimyasallar

3.1.1.1. Timol

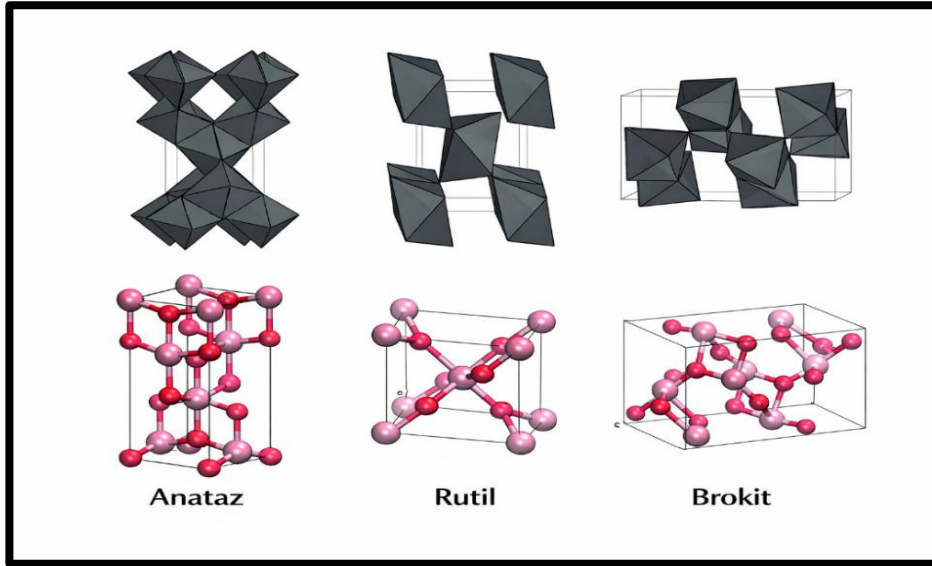
Bu çalışmada kullanılan timol (5-metil-2-izopropilfenol) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kimyasal formülü $2-[(CH_3)_2CH]C_6H_3-5-(CH_3)OH$ olan %94 saflıktaki bileşiğin moleküler ağırlığı 150,22 g/mol ve yoğunluğu 0,97 g/cm³'tür. Timolün moleküler yapısı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Timolün moleküler yapısı (Jiang vd., 2015)

3.1.1.2. Titanyum dioksit

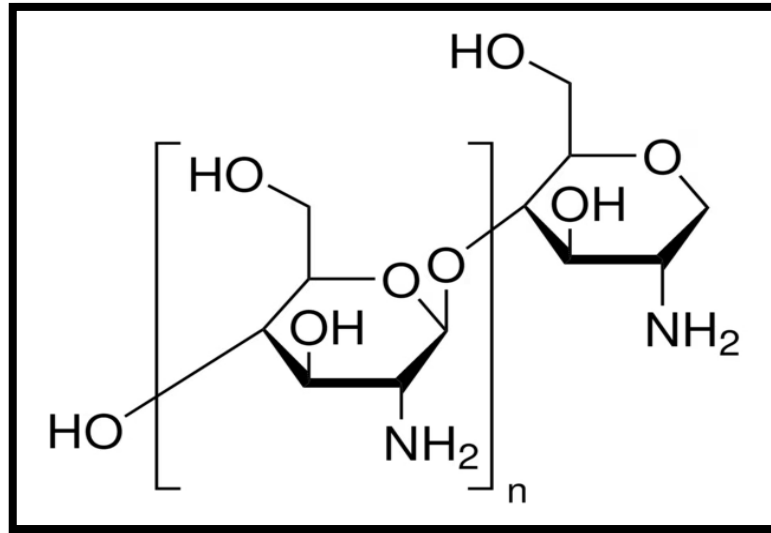
Bu çalışmada kullanılan titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülleri Nanografi firmasından temin edilmiştir. %99,5 saflıkta ve anataz fazda olan TiO₂NP'lerin ortalama partikül boyutu 17 nm'dir. TiO₂'nin kristal fazları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. TiO_2 'nin kristal fazları (Scarpelli vd., 2018)

3.1.1.3. Kitosan

Bu çalışmada kullanılan kitosan, Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kimyasal formülü $C_{12}H_{24}N_2O_9$ olan kitosan orta molekül ağırlıklı olup deasetilasyon derecesi %75'in üzerindedir. Kitosanın moleküler yapısı Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

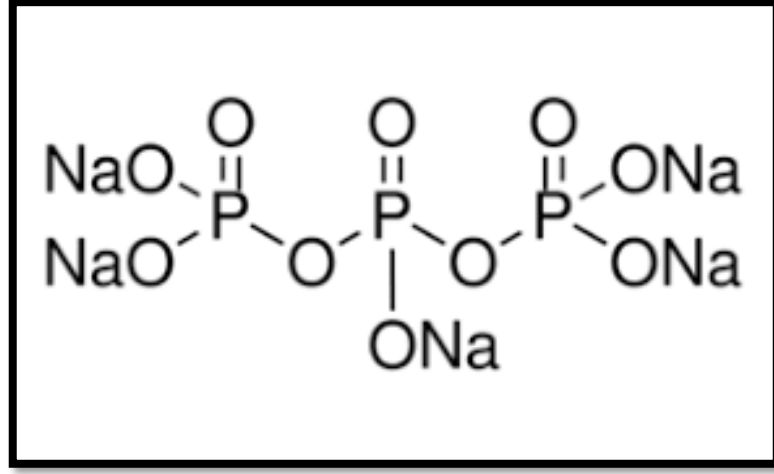


Şekil 3. 3. Kitosanın moleküler yapısı (Salachna ve Lopusiewicz, 2022)

3.1.1.4. Sodyum tripolifosfat

Bu çalışmada kullanılan sodyum tripolifosfat (TPP), Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kimyasal formülü $Na_5P_3O_{10}$ olan %94 saflıktaki bileşiğin moleküler ağırlığı 367,86

g/mol ve yoğunluğu 2,52 g/cm³'tür. Sodyum tripolifosfatın moleküler yapısı Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3. 4. Sodyum tripolifosfatın moleküler yapısı

3.1.2. Kullanılan diğer kimyasal maddeler ve kitler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ve kitler

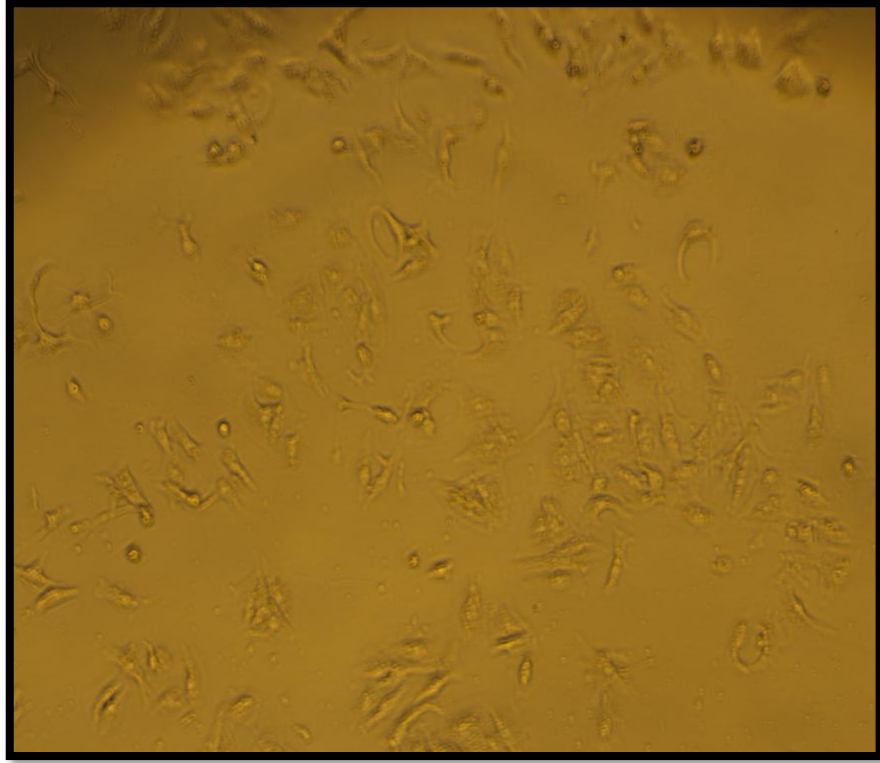
Kimyasal adı	Kullanım amacı	Üretici firma
Tween 80 (Polisorbat 80)	Dispersiyon sağlama	Merck
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Kitosan çözündürme	Isolab
Sodyum hidroksit (NaOH)	pH ayarlama	Sigma-Aldrich
XTT Cell Viability Assay Kit	Hücre canlılığı analizi	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Hücre dondurma	Merck
RPMI-1640 Besiyeri	Hücre besiyeri hazırlama	Sigma-Aldrich
L-Glutamine Solution	Hücre besiyeri hazırlama	Sartorius
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hücre besiyeri hazırlama	Gibco
Penisilin-Streptomisin	Hücre besiyeri hazırlama	Biological Industries
Tripsin-EDTA (%0.25)	Hücre ayrıştırma	Sartorius
PBS (Fosfat tamponlu salin)	Hücre yıkama	Biowest

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

- Hücre kültür flaskaları, Thermo Scientific
- Kuyucuklu hücre kültür plateleri, Sarstedt
- Steril tek kullanımlık pipetler, Sarstedt
- Mikro pipetler, Eppendorf
- Pipet uçları, Axygen
- Steril santrifüj tüpleri, Sarstedt
- Cam beher ve ölçü silindirleri, Isolab
- Thoma lamı, Isolab
- Kriyovial, Corning
- Hassas terazi, Shimadzu
- CO₂ inkübatörü, Nüve
- Laminar akışlı kabin, Bil-ser lab. Ltd. şti. class II
- Santrifüj, Hanil Smart R17
- Vorteks, Heidolph Reaxtop
- Su banyosu, Memmert
- Invert mikroskop, Nikon Eclipse Ti-2U
- ELISA cihazı, Epoch Biotek
- -80 °C Buzdolabı, Haer Medical
- Buzdolabı (-20 °C +4 °C), Arçelik
- pH metre, Ismatec MCP
- UV-Vis spektrofotometre, PG Instruments Ltd
- Ultrasonik homojenizatör, Wids
- Peristaltik pompa, Ismatec MCP
- Rotary evaporator, Heidolph
- Tarama elektron mikroskopisi analizi (SEM ve EDX) FEI-Quanta FEG 450
- Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Thermo Scientific Nicolet 6700
- X- ışını kırınımı (XRD), Panalytical-Empyrean
- Termogravimetrik analiz (TGA), SII NANOTECHNOLOGY- EXSTAR 7300

3.1.4. A549 hücre hattı ve özellikleri

İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı A549 (İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücreleri) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Rockville, MD, USA) ticari olarak satın alınmıştır. A549 hücreleri 58 yaşındaki bir erkeğin akciğerinden izole edilmiş epitel hücreleridir (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10X)

3.2. Yöntem

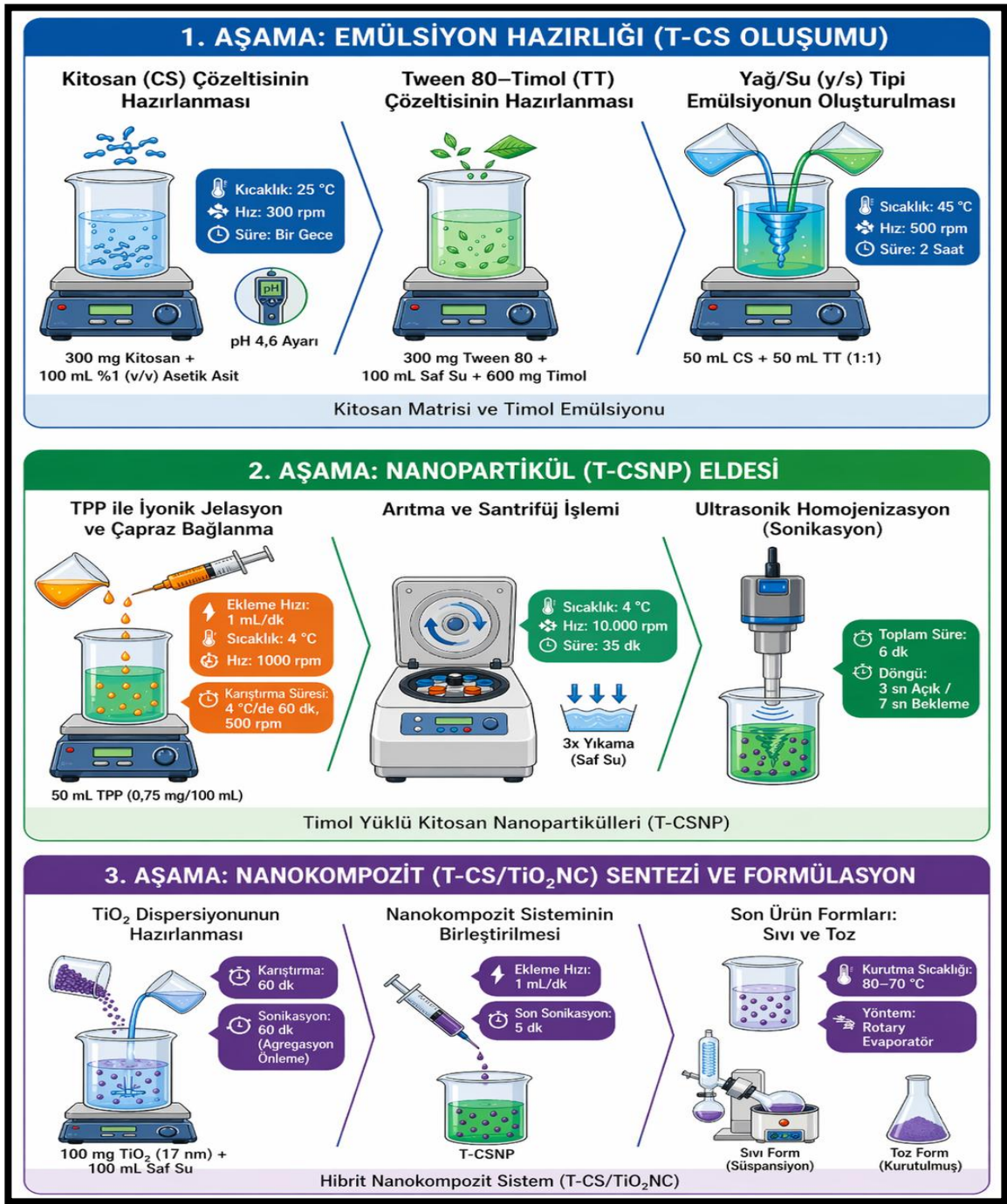
3.2.1. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin (T-CS/TiO₂NC) hazırlanması

Bu çalışmada timolün kitosan kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile nano boyutta enkapsülasyonu sağlanmış ve elde edilen yapı, TiO₂ nanopartikülleriyle (17 nm) dispersiyon ile kombine edilerek kompozit bir sistem oluşturulmuştur. Bu amaçla, çalışmanın birinci aşamasında 1 mL asetik asit 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 300 mg kitosan hazırlanan 100 mL %1'lik asetik asit çözeltisine eklenmiştir. Kitosan çözeltisi (CS) elde etmek için 25 °C'de bir gece boyunca ve 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya bırakılmıştır. Filtrelenen çözelti daha sonra 0,5 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH değeri 4,6'ya ayarlanmıştır. 300 mg Tween 80, 100 mL saf suda çözülüp 600

mg timole eklenerek Tween 80-timol çözeltisi (TT) hazırlanmıştır. Bu aşamada 50 mL kitosan çözeltisi ile 50 mL Tween 80-timol çözeltisi 1:1 oranında eklenmiş ve karışım tamamen homojen hale gelinceye kadar 45 °C'de, 500 rpm'de yaklaşık 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu şekilde kitosan ve Tween 80-timol karışımını içeren homojen su içinde yağ (y/s) tipi emülsiyon (T-CS) oluşturulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında, 0,75 mg sodyum tripolifosfat 100 mL saf suda çözülerek TPP çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 50 mL'si şırınga pompası kullanılarak 1 mL/dk akış hızıyla manyetik karıştırıcıda 1000 rpm'de 4 °C'de karışan kitosan ve Tween 80-timol emülsiyonuna eklenmiştir. Çapraz bağlanmanın tamamlanabilmesi için karıştırma işlemi 45 °C'de, 500 rpm'de 60 dakika boyunca sürdürülmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan timol yüklü kitosan nanopartikülleri (T-CSNP) 4 °C'de 10000 rpm'de 35 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelti, üç kez saf su ile yıkanarak arıtılmış ve üzerine saf su eklenerek disperse edilmiştir. Ardından, homojen dağılım sağlamak için ultrasonik homojenizatörde 3 saniye sonikasyon ve 7 saniye bekleme döngüsünden oluşan bir uygulama ile toplam 6 dakika sonikasyon uygulanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında 1 mg/mL TiO₂ dispersiyonu hazırlamak için 100 mL saf suya 100 mg TiO₂ NP (yaklaşık 17 nm) eklenerek manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında yaklaşık 60 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra dispersiyondaki agregasyonu azaltmak için ultrasonik homojenizatör ile 60 dakika sonikasyona bırakılmıştır. 50 mL TiO₂ dispersiyonu, manyetik karıştırıcıda karışan 50 mL timol yüklü kitosan nanopartikül çözeltisine 1 mL/dk akış hızıyla 1:1 oranında eklenmiş ve akış boyunca sürekli karıştırılarak homojenizasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından 5 dakika ultrasonik homojenizatörde tutularak nanokompozit sistemin oluşması sağlanmıştır. Elde edilen timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozit dispersiyonu (T-CS/TiO₂NC) iki kısma ayrılmıştır. Birinci kısım herhangi bir kurutma işlemi uygulanmaksızın sıvı formda muhafaza edilerek karakterizasyon ve biyolojik aktivite analizlerinde kullanılmıştır. İkinci kısım ise ayrı bir balono alınarak 50-70 °C'de rotary evaporatör yardımıyla çözücüsü uzaklaştırılmış ve nanokompozit toz halinde elde edilmiştir. Bazı karakterizasyon analizleri için nanokompozitin toz formu kullanılmıştır.



Şekil 3. 6. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin sentez aşamaları

3.2.2. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin karakterizasyon analizi

T-CS/TiO₂NC'lerin sentezinden sonra gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, elde edilen yapının morfolojik ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Sentezlenmiş T-CS/TiO₂NC'lerin yüzey morfolojileri ve elementel bileşimleri taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) ile analiz edilmiştir.

T-CS/TiO₂NC'lerin X-ışını difraksiyon desenleri için XRD, nanokompozitte bulunan fonksiyonel grupları ve bilinmeyen elementleri belirlemek için FTIR cihazları kullanılmıştır. Bununla birlikte, T-CS/TiO₂NC'lerin UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile enkapsülasyon verimliliği ve yük taşıma kapasitesi hesaplanmıştır ve termal davranışları TGA analizi ile belirlenmiştir.

3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme, nano-ölçekte yüzey topografisi, bileşim ve 3B yapı bilgisini aynı platformda sunan çok yönlü bir yöntemdir. Farklı sinyal türleri (SE, BSE, X-ışını) ve gelişmiş 3B/AI tabanlı tekniklerle hem biyolojik hem de malzeme örneklerinde ayrıntılı yapısal analiz yapılabilmektedir (Koga vd., 2021). Elektronların numunedeki atomlarla etkileşimi sonucunda, yüzey topografisi ve kimyasal bileşime ilişkin çeşitli sinyaller oluşur; bu sinyaller uygun dedektörler aracılığıyla algılanarak bilgisayar ortamına aktarılmakta ve görüntü oluşturulmaktadır. Enerji Dağılım X-Ray ışını spektroskopisi (EDX), temel eğriyi çıktı olarak sağlayan bir tekniktir. Bu analitik teknik genellikle taramalı elektron mikroskopisi ile birlikte kullanılmaktadır. X-ışınları (EDS/EDX) elementel bileşimi ve haritalamayı vermektedir (Ali vd., 2023). T-CS/TiO₂NC taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) yüksek derecede vakum altında 15 kV'de FEI-Quanta FEG 450 cihazı ile incelenmiştir.

3.2.2.2. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

X-ışını kırınımı (XRD), kristal yapı, faz kompozisyonu ve mikro yapı hakkında çok boyutlu bilgi sağlayan, malzeme karakterizasyonunun temel taşı bir tekniktir. Toz, ince film ve çok fazlı sistemlerde hem araştırma hem de endüstride standart araç olarak kullanılmaktadır (Holder ve Schaak, 2019). Çalışmada T-CS/TiO₂NC X-ışını difraksiyon desenleri 40 kV ve 100 mA'da çalıştırılan geniş açılı XRD cihazı (Panalytical, Empyrean XRD) kullanılarak (Cu K α 1 ışınımı, $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) 10-80° (2 θ) aralığında kaydedilmiştir.

3.2.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), organik ve inorganik maddelerin fonksiyonel grup, yapı ve kompozisyonunu hızlı ve ayrıntılı biçimde inceleyen,

biyomedikalden gıdaya ve malzeme bilimine kadar çok geniş uygulama alanına sahip temel bir spektroskopik tekniğidir. Doğru örnek hazırlığı ve uygun veri analiziyle hem nitel hem nicel analizlerde iyi bir araç olarak kullanılmaktadır. Özellikle orta IR bölgesi ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) analitik amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır; burada fonksiyonel grup ve parmak izi bölgeleri ayrıntılı bilgi vermektedir (Pasiczna-Patkowska vd., 2025). T-CS/TiO₂NC analizinde Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR spektrometresi Attenuated Total Reflectance (ATR) tekniği ile kullanılmıştır. $400-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında elde edilen absorpsiyon verileriyle fonksiyonel gruplar belirlenmiş ve yapı aydınlatılmıştır.

3.2.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz (TGA), bir numunenin kütlesinin sıcaklık veya zamanla nasıl değiştiğini ölçen, malzemelerin ısıtma sırasında kütle değişimlerini izleyerek ısıl kararlılık, bozunma kinetiği, bileşim ve uzun dönem dayanım hakkında kapsamlı bilgi veren nicel bir termal analiz tekniğidir. Özellikle bozunma, uçucu bileşen kaybı, oksidasyon ve genel ısıl kararlılık değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Saadatkhan vd., 2020). TGA, FTIR/MS ile birleştirildiğinde hem kütle kaybını hem de açığa çıkan gazları izleyerek karmaşık termal bozunma süreçlerini çözümlenmede ideal bir araç haline gelir. T-CS/TiO₂NC'nin termogravimetrik analizi, termogravimetrik analizör adı verilen SII Nanotechnology Exstar 7300 TGA cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.5. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesinin (LC) belirlenmesi

Nanotaşıyıcı sistemlerin karakterizasyonunda, sistemin etken madde taşıma açısından etkinlik ve verimliliğini ortaya koymak amacıyla enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) en yaygın kullanılan iki temel parametredir. Bu parametreler yalnızca formülasyonun optimize edilmesinde değil, aynı zamanda farklı nanotaşıyıcı sistemlerin karşılaştırılmasında da standart değerlendirme ölçütleri olarak kabul edilmektedir (Elumalai vd., 2024). Enkapsülasyon etkinliği/verimi, bir sistemin başlangıçta eklenen aktif maddenin ne kadarını başarıyla taşıyıcıya (nanopartikül/nanokompozit) yüklediğini gösterirken, yükleme kapasitesi/taşıma kapasitesi ise taşıyıcı sistemin etken maddeyi kendi ağırlığına göre ne kadar aktif taşıdığını ifade eder. Etken maddenin büyük kısmının enkapsüle edildiği, ancak yüksek miktarda taşıyıcı kullanıldığı durumlarda enkapsülasyon verimi (EE) yüksek, yükleme kapasitesi (LC) ise düşük olabilir. Buna karşılık, birim taşıyıcı başına daha fazla etken madde

yüklenmesine rağmen süreçte önemli miktarda etken madde kaybının yaşandığı durumlarda LC değeri yüksek, EE değeri ise düşük olarak belirlenebilir. Bu nedenle nano taşıyıcı sistemlerin değerlendirilmesinde her iki parametrenin birlikte ele alınması önemlidir (Peng vd., 2016).

Çalışmada TiO₂NP eklenmesi sistemi ağırlaştıracağı için, yükleme kapasitesi (LC) değeri, TiO₂ nanopartikülleri eklenmeden önceki (T-CSNP) ve eklendikten sonraki, yani kompozit durum (T-CS/TiO₂NC) için, ayrı ayrı belirtilmiştir. Timolün enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesini hesaplamak için T-CSNP ve T-CS/TiO₂NC stoklarından; TiO₂NP'nin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesinin hesaplanması için ise sadece T-CS/TiO₂NC stoklarından 100 µL alınmış, ardından 5 mL 1 M HCl çözeltisi ile karıştırılarak 95°C'deki ultrasonik su banyosunda 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan çıkarıldıktan ve soğutulduktan sonra, 1 mL etanol eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. Daha sonra numuneler oda sıcaklığında 9000 rpm hızında 1 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen T-CSNP ve CS/TiO₂NC süpernatantlarına ait stok çözeltileri sırasıyla 2, 4, 8 ve 10 ppm konsantrasyonlarda T-CSNP ve T-CS/ TiO₂NC olan 4 adet seri çözelti kullanılarak UV-Vis spektrofotometrede T-CSNP ve T-CS/TiO₂NC'lerine ait dalga boyu taraması Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. Literatür ile uyumlu olan Timol için 275 nm, TiO₂ için 365 nm'deki maksimum absorbans dalga boyları (λ_{mak}) referans alınmıştır. Farklı konsantrasyon değerlerinden elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi aşağıdaki formüller kullanılarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Yüklenen aktif madde}}{\text{Toplam eklenen aktif madde}} \times 100$$

$$\% \text{ LC} = \frac{\text{Yüklenen aktif madde}}{\text{Toplam nanopartikül miktarı}} \times 100$$

3.2.3. Hücre kültürü

Hücre kültürü, dokulardan alınan hücrelerin kontrollü laboratuvar koşullarında besiyeri içinde çoğaltılması ve incelenmesidir. Hücre kültürü sistemlerinde, kültürlenecek ve incelenecek dokularda üç boyutlu ortamda bulunan hücrelerin *in vitro* koşullarda uygun koşullar sağlanarak canlı tutulması amaçlanmaktadır. Hücre kültürü teknikleri, günümüzde çok geniş bir kullanım alanına sahip olup, pek çok farklı disiplin ve araştırma alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

İlaç keşfi, kanser araştırmaları, rejeneratif tıp ve toksisite testlerinin temelini oluşturmaktadır (Joseph vd., 2018; Ballav vd., 2021; Zhao, 2023).

3.2.3.1. A549 hücreleri için besiyeri hazırlanması

Ticari olarak temin edilen 500 mL RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerine %10 olacak şekilde 50 mL steril FBS (Fetal Bovine Serum) eklenmiştir. Kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla hazırlanan besiyeri 50 mL'lik Falcon tüplerine bölüştürülmüş ve kullanım sırasında her bir tüpe 500 µL penisilin-streptomisin ile 500 µL L-glutamin ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Hücrelerin çözdürülmesi

Kriyoviyallerde -80 °C'de muhafaza edilen hücreler deney öncesinde su banyosunda çözdürülmüştür. Çözülen A549 hücreleri, 5 mL RPMI besiyeri içeren 15 mL'lik Falcon tüplere transfer edilerek 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 1 mL besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, 5 mL besiyeri içeren kültür kaplarına alınarak 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.3. Hücrelerin pasajlanması

25 cm²'lik flasklarda kültüre edilen hücreler, yüzeyi tamamen kapladığında besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 3 mL PBS ile yıkanmıştır. PBS'nin ortamdan uzaklaştırılmasının ardından, yüzeye tutunmuş hücrelerin ayrılması amacıyla 0,5 mL Tripsin-EDTA ilave edilmiştir. 5 dakikalık etüv inkübasyonunun ardından hücrelerin yüzeyden ayrıldığı doğrulanmış, tripsin aktivitesini sonlandırmak amacıyla uygulanan hacmin 10 katı kadar besiyeri eklenmiştir. Oluşan hücre süspansiyonu 15 mL'lik Falcon tüpe aktarılmış, 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 1 mL besiyerinde yeniden süspanse edildikten sonra üzerine 9 mL ek besiyeri ilave edilerek toplam 10 mL hacme tamamlanmış ve hücreler 75 cm²'lik flasklara alınmıştır. Kültür flaskları 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.4. Hücrelerin dondurulması

Flask yüzeyindeki hücreler tamamen konfluent hale ulaştığında, besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler 3 mL PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra, hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla flask içerisine 2-3 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve flask 5 dakika süreyle etüvde inkübe edilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 15 mL'lik Falcon tüplerine aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 800 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti, her bir kriovial için ilgili hücre hattının saklanma koşullarına uygun olacak şekilde besiyeri ve DMSO ile yeniden süspansiyon edilmiş ve -80 °C'de saklanmak üzere dondurulmuştur.

3.2.4. *In vitro* sitotoksosite çalışmaları

3.2.4.1. Trypan blue ile canlı hücre sayımı

Santrifüj sonrası Falcon tüpte bulunan hücreler steril kabine alınmış, süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peletinin üzerine 1 mL RPMI besiyeri eklenerek pipetaj ile homojenizasyon sağlanmıştır. Hazırlanan 1 mL'lik hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde Trypan Blue boyası eklenmiş ve tekrar pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 10 µL alınarak Thoma lamının her iki bölümüne yüklenmiş ve mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayma işlemi lamın her iki tarafında yapılarak elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Hücre sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

3.2.4.2. XTT hücre canlılık testi

XTT yöntemi, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir kolorimetrik metabolik aktivite testidir (Kamiloglu vd., 2020). 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit (XTT), oluşan tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerde formazana indirgenmesi prensibine dayanır ve spektrofotometre ile ölçülür. Biyoredüksiyon sonucu oluşan formazaan ürününün suda çözünür olması MTT gibi

kristal çözme basamağını ortadan kaldırır; böylece işlem basitleşir ve doğrudan spektrofotometrik okuma yapılabilir (Scudiero vd., 1988).

Çalışmada, A549 hücreleri sayılarak her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri içerisinde $7,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresinin ardından, hücrelere timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin farklı konsantrasyonları (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 ve 800 µM) uygulanmıştır. Deneyde negatif kontrol (maksimum canlılık) grubunu yalnızca besiyeri içeren hücreler oluştururken, kör grup için kuyucuklara yalnızca 200 µL besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar boyunca 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübasyon ortamında tutulmuştur. Daha sonra, PBS’de çözünen XTT boyası her kuyucuğa 50 µL eklenerek hücreler 3 saat inkübe edilmiştir. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiş ve absorbans 570 nm’de ELISA Reader ile ölçülmüştür. XTT uygulaması, Roche XTT deney kiti prosedürüne göre gerçekleştirilmiş olup, hücre canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = [100 \times (\text{Nanokompozit ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$$

3.2.5. İstatistiksel yöntemler

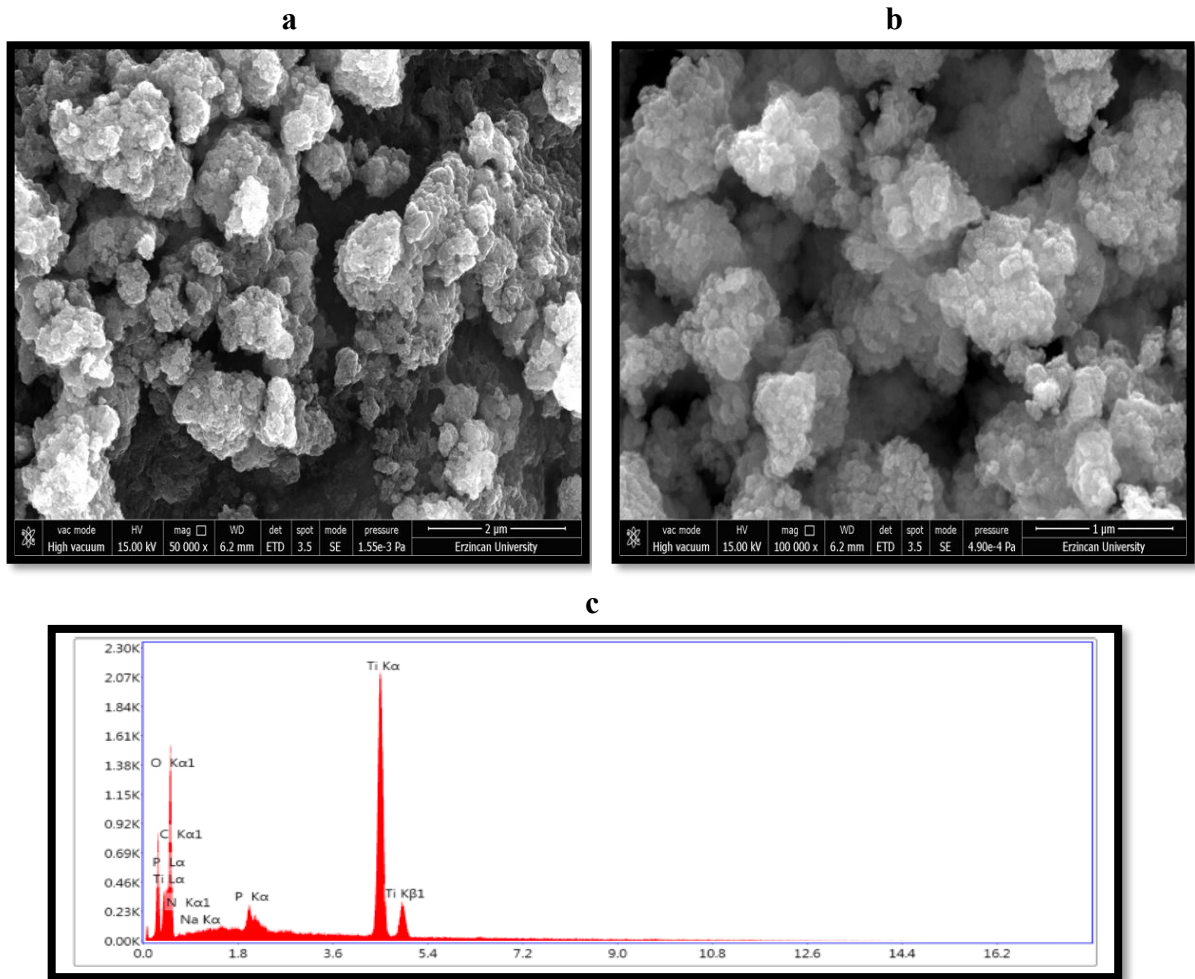
Verilerin istatistiksel analizi, IBM SPSS Statistics (v22) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. A549 hücre hatlarına CS/TiO₂NC’lerin farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanması sonucunda elde edilen XTT sitotoksosite testi sonuçları, normal dağılıma uygunluk kriterlerine göre tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi p <0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Timol Yüklü Kitosan/TiO₂ Nanokompozitlerinin Karakterizasyon Analizi

4.1.1. Tarama elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDX) analizi sonuçları

Sentezlenen nanokompozit sistemin morfolojik gelişimini ve bileşenler arasındaki entegrasyonu akademik bir bütünlük içinde kanıtlamaktadır (Şekil 4.1). SEM görüntüleri, kitosan yüzeyine tutunmuş, parlak ve küçük küresel yapılar şeklinde görülen TiO₂ nanopartiküllerinin yüzeyde dengeli ve düzenli bir dağılım sergilediğini ortaya koymaktadır (Xing vd., 2020; Hussein vd., 2021).



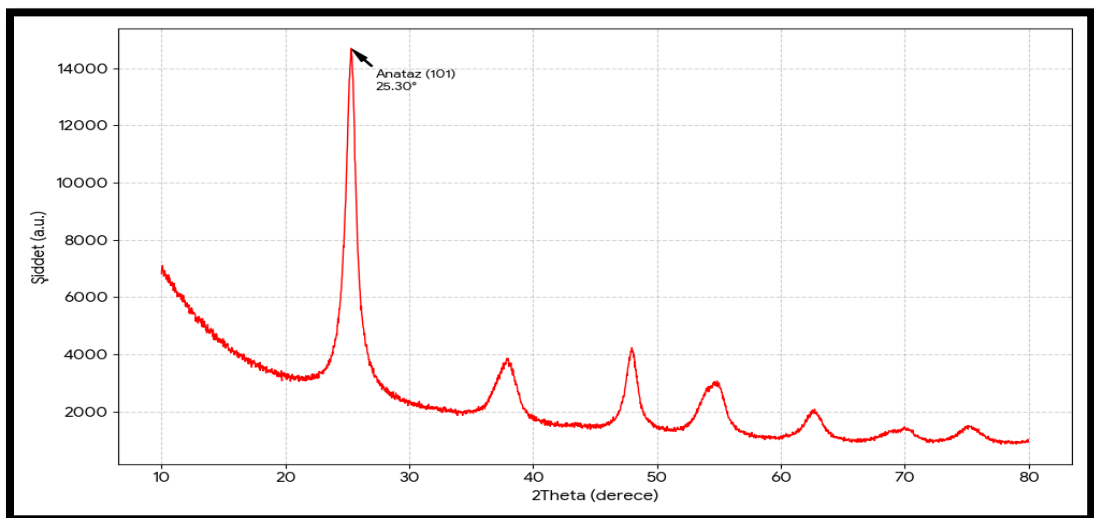
Şekil 4. 1. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin SEM görüntüleri ve EDX'leri

Kitosan yüzeyinin nispeten pürüzsüz olması (Şekil 4.1a), timolün yapı içerisine başarılı bir şekilde hapsediğine işaret etmektedir (Bashal vd., 2022). Partiküllerin kitosan yüzeyinde geniş bir alana yayılmış olması (Şekil 4.1b), inorganik fazın organik faz ile başarılı bir şekilde hibritleştiğini doğrulamaktadır (Hussein vd., 2021).

Nanokompozitin enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi Şekil 4.1c'de verilmiştir. Spektrumda ağırlıkça %12,63 oranında saptanan Ti pikleri, inorganik faz olan TiO₂ nanopartiküllerinin varlığını doğrulamaktadır (Indira vd., 2023). Ağırlıkça C (%43,43) ve O (%41,59) değerlerinin yüksekliği T-CS/TiO₂NC ana gövdesini oluşturan kitosan ve yapıdaki timol bileşenlerinden kaynaklanmaktadır (Alzahrani vd., 2020). Ağırlıkça %2,35 oranında saptanan N elementi kitosanın karakteristik elementidir ve amin gruplarından gelmektedir (Zuher vd., 2022).

4.1.2. X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonuçları

Şekil 3.6'da verilen sentez protokolü sonucunda elde edilen nanokompozitlerin kristal yapısı XRD analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Grafikte görülen en keskin ve şiddetli pik, $2\theta = 25,31^\circ$ civarında, TiO₂'nin anataz fazına ait karakteristik (101) düzlemini temsil etmektedir (Majeed vd., 2023). Ayrıca $37,8^\circ$; $48,0^\circ$ ve $54,0^\circ$ civarındaki ikincil pikler, TiO₂ yapısının kompozit içerisinde kristal formunu koruduğunu kanıtlamaktadır. $2\theta = 15$ ile 22° arasında görülen geniş ve yayvan pik, kitosanın yarı kristalin/amorf doğasından kaynaklanmaktadır (Aziz vd., 2020).

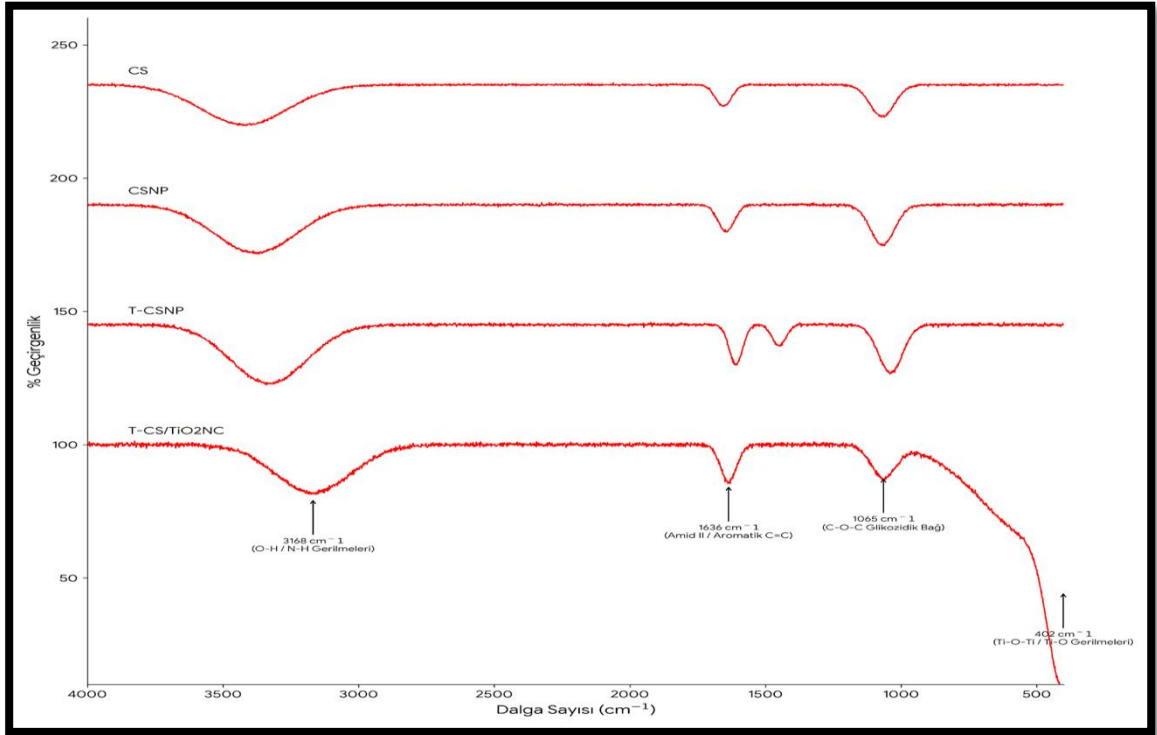


Şekil 4. 2.Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin XRD deseni

Bu bölgedeki şiddetin TiO_2 piklerine kıyasla düşük olması, inorganik fazın kristalite sinyalinin çok daha baskın olduğunu gösterir. Saf timolün normalde çok sayıda keskin kristal pik vermesine rağmen, grafikte timole ait ayrık ve keskin piklerinin görülmemesi timolün kitosan metrisi içinde amorf hale geçtiğini ve başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir (Shen vd., 2022).

4.1.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi sonuçları

Sentezlenen nanokompozit sistemin oluşum mekanizmasında yer alan her bir bileşen için ayrı eğrilerin olduğu ve pik değerlerinin ve bu piklerdeki kimyasal bağların gösterildiği karşılaştırmalı FTIR spektrumları Şekil 4.3'te sunulmaktadır.



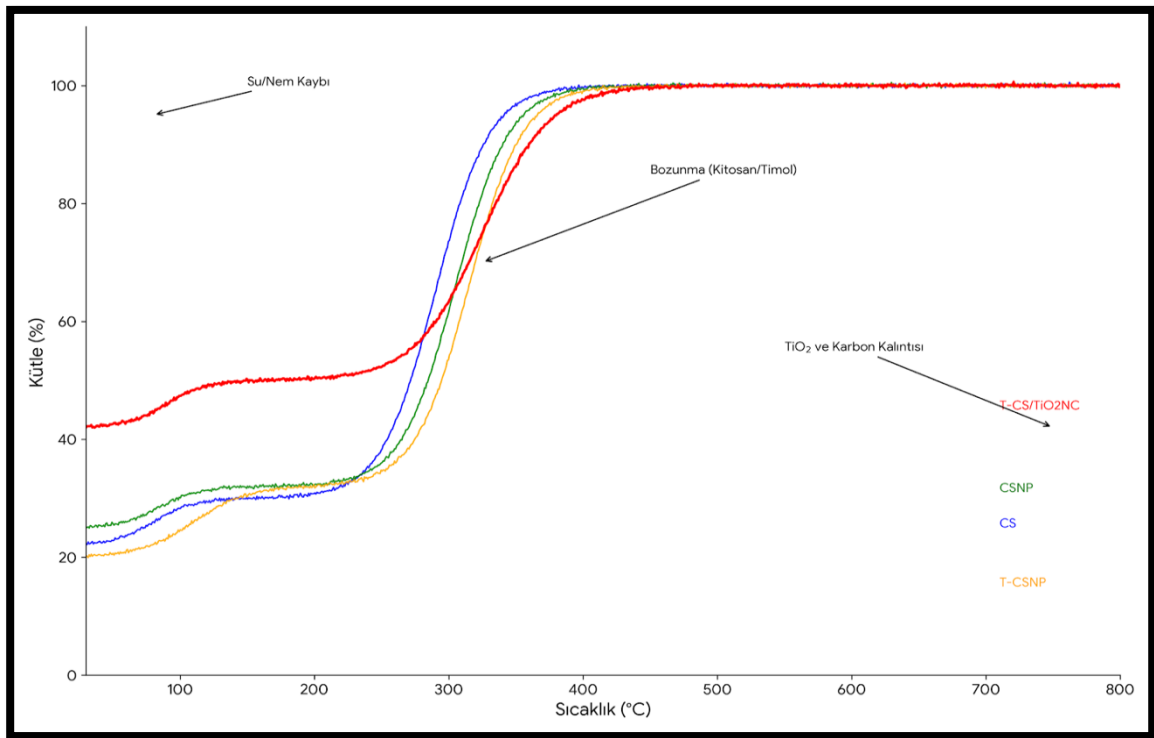
Şekil 4. 3. Timol yüklü kitosan/ TiO_2 nanokompozitlerinin FTIR görüntüleri

FTIR spektral analizinde saf kitosanın (CS) karakteristik 3400 cm^{-1} civarındaki geniş hidroksil ve 1070 cm^{-1} civarındaki glikozidik bağlarını gösteren temel spektrumdur (Kızılkaya ve Kaya, 2024). Nano boyuta indirgenme sonrası (CSNP) hidrojen bağlarındaki değişime bağlı olarak piklerde hafif daralma ve kaymalar gözlemlenmiştir (Branca vd., 2016). Timolün yapıya girmesiyle (T-CSNP) 1609 cm^{-1} (aromatik C=C) ve 1400 cm^{-1} (izopropil) bölgelerinde timole özgü karakteristik pikler belirginleşmiştir (Alizadeh ve Nazari, 2022; Sreelatha vd., 2022). T-

CS/TiO₂NC spektrumunda 3186 cm⁻¹ CS-T-TiO₂ cm⁻¹ arasındaki yoğun hidrojen bağlarını, 1636 cm⁻¹ timolün aromatik yapısı ile kitosan amid gruplarının başarılı enkapsülasyonunu, 1065 cm⁻¹ polimer iskeletin (C-O-C) korunduğunu ve 402 cm⁻¹ TiO₂ nanopartiküllerinin (Ti-O-Ti) yapıya entegrasyonunu doğrulamaktadır (Saravanan vd., 2017; Xing vd., 2020; Kızılkaya ve Kaya, 2024). XRD ve FTIR analizleri inorganik TiO₂ fazı ile organik timol/kitosan bileşenlerinin başarılı bir şekilde bir araya geldiğini kanıtlamaktadır.

4.1.4. Termogravimetrik analiz (TGA) sonuçları

Sentezlenen T-CS/TiO₂NC'lerinin termal kararlılığı TGA analizi ile 30-800 °C sıcaklık aralığında belirlenmiştir. TGA termogramı incelendiğinde (Şekil 4.4), nanokompozitin üç aşamalı bir bozunma profili sergilediği görülmektedir. 30-150 °C aralığında gözlenen yaklaşık %10-12 kütle kaybı, kitosan içerisinde hapsolmuş fiziksel suyun, nemin ve timolün yüzeye yakın bileşenlerinin uzaklaşmasına bağlanmaktadır (Abdulrasool vd., 2019; Xing vd., 2020).



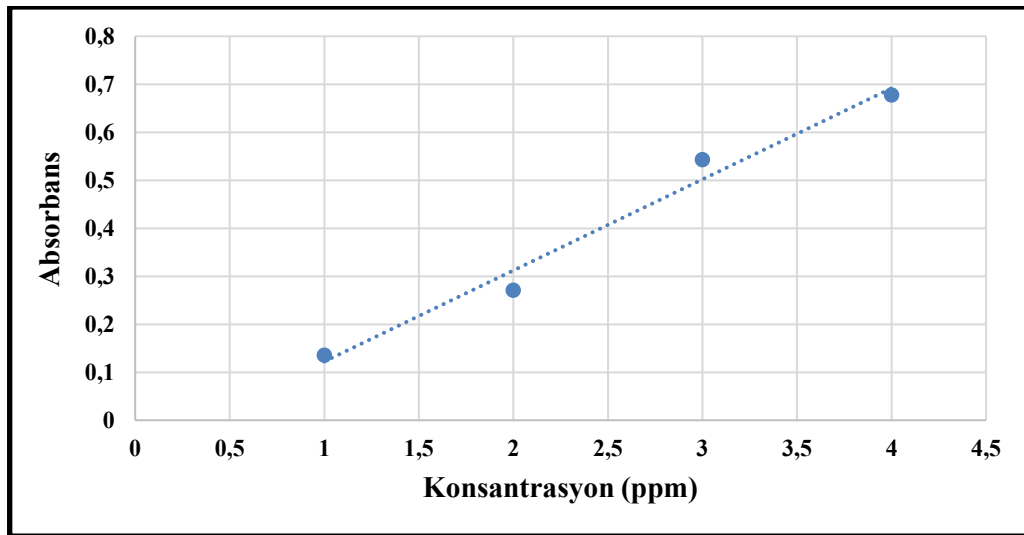
Şekil 4. 4. Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin TGA görüntüleri

250-450 °C aralığında gözlenen en belirgin düşüşün yaşandığı bölge, kitosan zincirlerinin depolimerizasyonu ve timolün termal bozunması ile ilişkilendirilmektedir (Xing vd., 2020). DTG eğrisindeki (mavi kesikli çizgi) maksimum pik noktası (320 °C), nanokompozit sistemin ana bozunma sıcaklığını göstermektedir. 450-800 °C'de polimerik iskeletin karbonizasyonunun

tamamlandığı görülmektedir. 800 °C sonunda kalan yüksek kalıntı miktarı, yapıdaki termal olarak TiO₂ nanopartiküllerinin varlığını doğrulamaktadır (Corazzari vd., 2015; Xing vd., 2020; Roy vd., 2021).

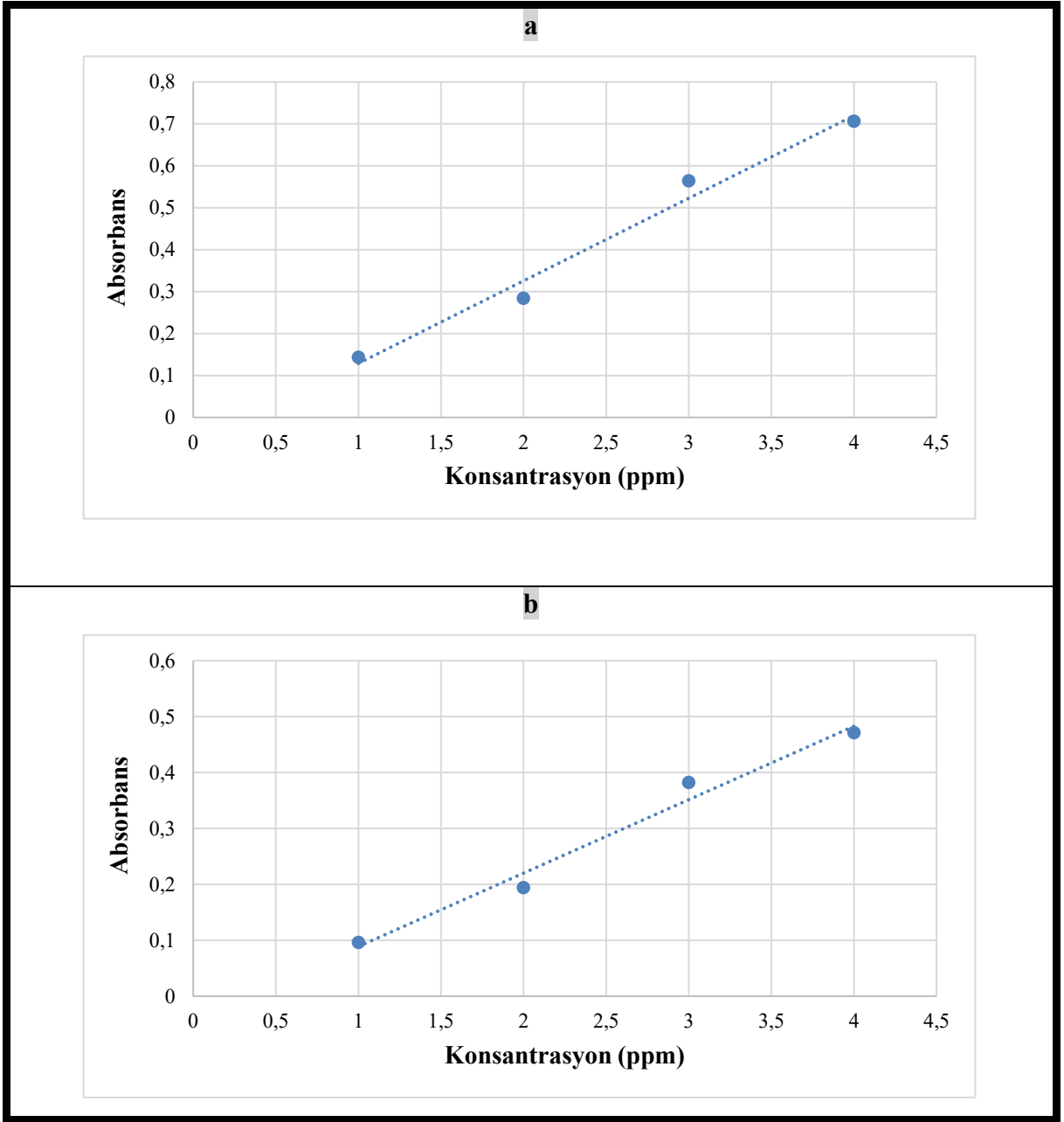
4.1.5. Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) analizi sonuçları

Timol ve TiO₂'nin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesini hesaplamak için T-CSNP ve CS/TiO₂NC stok çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda 4 adet seri çözelti hazırlanmıştır. T-CSNP ve T-CS/TiO₂NC'lere ait 2-10 ppm aralığındaki standart çözeltilerin absorbanans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve bu eğrilerden korelasyon katsayıları (R²) belirlenmiştir. UV-Vis spektrometresinde T-CSNP'de ölçülen absorbanans değerlerinden elde edilen timol için kalibrasyon eğrileri Şekil 4.5'te sunulmuştur. T-CS/TiO₂NC'de ölçülen absorbanans değerlerinden elde edilen timol için kalibrasyon eğrileri Şekil 4.6a'da ve TiO₂ için kalibrasyon eğrileri Şekil 4.6b'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. T-CSNP'de timol için UV-Vis spektrofotometre kalibrasyon eğrisi

T-CSNP ve T-CS/TiO₂NC sistemlerinde timol için 2, 4, 8 ve 10 ppm konsantrasyonlarda elde edilen UV-Vis verileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinde doğrusal ilişki yüksek bulunmuştur. Regresyon denklemleri sırasıyla $y = 0,06615x + 0,02395$ ve $y = 0,06859x + 0,02155$ olup, korelasyon katsayıları her iki durumda da $r = 0,988$, $R^2 = 0,975$ olarak hesaplanmıştır. T-CS/TiO₂NC sisteminde TiO₂ için 2-10 ppm konsantrasyonlarda elde edilen UV-Vis verileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise $y = 0,04580x + 0,01098$, $r = 0,989$ ve $R^2 = 0,978$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 6. T-CS/TiO₂NC’de timol ve TiO₂ için UV-Vis spektrofotometre kalibrasyon eğrisi

T-CSNP sisteminde timol için total değer 0,12 ve free değer 0,027 olarak alındığında timolün enkapsülasyon etkinliği (EE) %77,5’tir. Yani kapsüle olan timol miktarı 0,093 birimdir ve yükleme kapasitesi %0,194 (w/w) olarak hesaplanmıştır. T-CS/TiO₂NC sisteminde timol için total değer 0,226 ve free değer 0,015 olduğundan, timolün EE değeri %93,4 ve yüklenen timol miktarı 0,211 birim olup LC değeri %0,398 (w/w) olarak belirlenmiştir. Aynı sistemde TiO₂ için total değer 0,191 ve free değer 0,014 olduğundan, yüklenen TiO₂ miktarı 0,177 olup TiO₂’nin LC değeri %0,334 (w/w) olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. T-CSNP ve T-CS/TiO₂NC sistemlerinde enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi

Sistem	Aktif madde	Enkapsülasyon etkinliği (EE)	Yükleme kapasitesi (LC)
T-CSNP	Timol	%77,5	%0,194
T-CS/TiO ₂ NC	Timol	%93,4	%0,398
T-CS/TiO ₂ NC	TiO ₂	-	%0,334

Tablo 4.1’de verilen sonuçlara göre, yapıya giren TiO₂NP’lerin timolün enkapsülasyon verimliliğini yaklaşık %20,5 oranında artırarak %77,5’ten %93,36’ya çıkardığı görülmektedir. Bu durum, inorganik nanopartiküllerin nanokompozit sistemde bulunan timolün kitosan polimerinin içine daha güçlü hapsolme bölgeleri (hidrojen bağları) oluşturduğunu ve daha kontrollü bir ağ yapısı kurduğunu doğrulamaktadır. Yükleme kapasitesindeki yaklaşık iki kat artış (%0,19’dan %0,39’a) nanokompozit sistemin verimliliğini göstermektedir.

4.2. T-CS/TiO₂NC’lerinin Antiproliferatif Etkileri

Çalışmada, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin farklı konsantrasyonlarda (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 ve 800 µM) ve farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72) hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, T-CS/TiO₂NC’lerinin A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve XTT analizi ile canlılık oranları verilmiştir. Bu sistem için toplamda on farklı konsantrasyon kombinasyonu oluşturulmuştur; saatlik inkübasyon sürelerinde ve üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. A549 hücre hattı için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

T-CS/TiO₂NC’lerinin A549 akciğer kanseri hücre hattındaki antiproliferatif etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen XTT analizi sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 4.2’de sunulmuştur. T-CS/TiO₂NC’lerinin A549 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin zamana bağlı olduğu ve 24 saatte >245,0 ± 3,2 µM, 48 saatte >180,0 ± 4,2 µM ve 72 saatte >130,0 ± 2,9 µM IC₅₀ değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2. T-CS/TiO₂NC'lerinin A549 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlerinde IC₅₀ değerleri
Sitotoksik aktivite (IC₅₀)

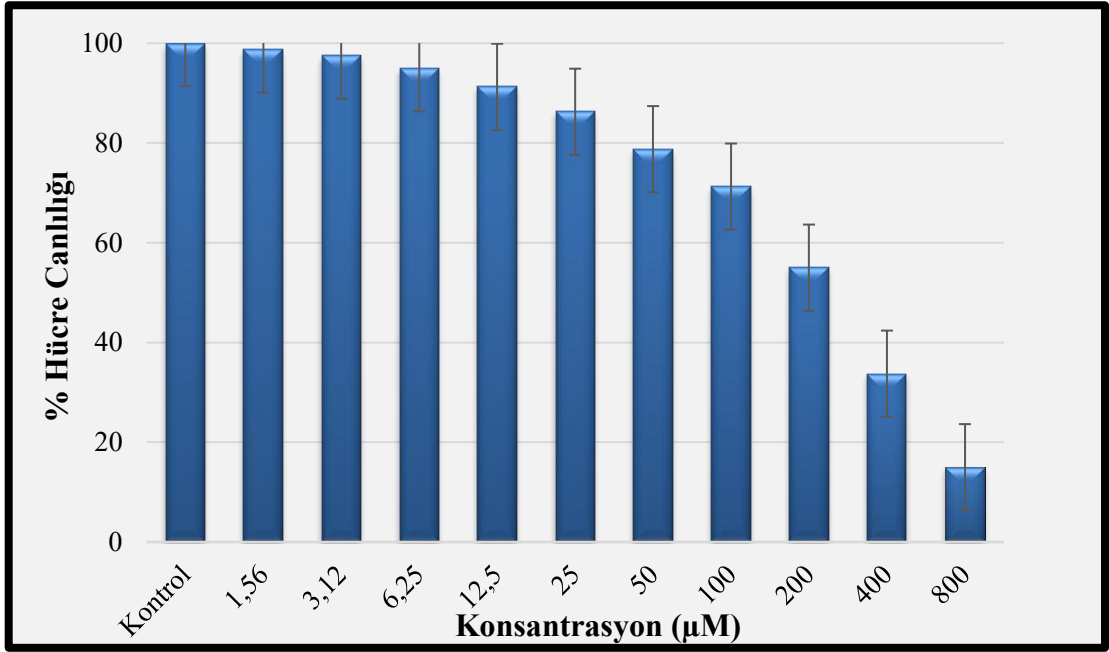
Süre (saat)	Hücre	T-CS/TiO ₂ NC
24	A549	>245,0 ± 3,2 µM
48	A549	>180,0 ± 4,2 µM
72	A549	>130,0 ± 2,9µM

4.2.2. T-CS/TiO₂NC'lerin A549 hücre hattında XTT analizi bulguları

Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin A549 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkileri XTT yöntemi kullanılarak 1,56-800 µM konsantrasyon aralığında ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. T-CS/TiO₂NC'lerinin A549 hücrelerinde XTT sonuçlarına göre konsantrasyona ve zamana bağlı anlamlı sitotoksik etki gösterdiği ve maksimum etkinin >130 µM konsantrasyonda 72 saat sonunda elde edildiği tespit edilmiştir.

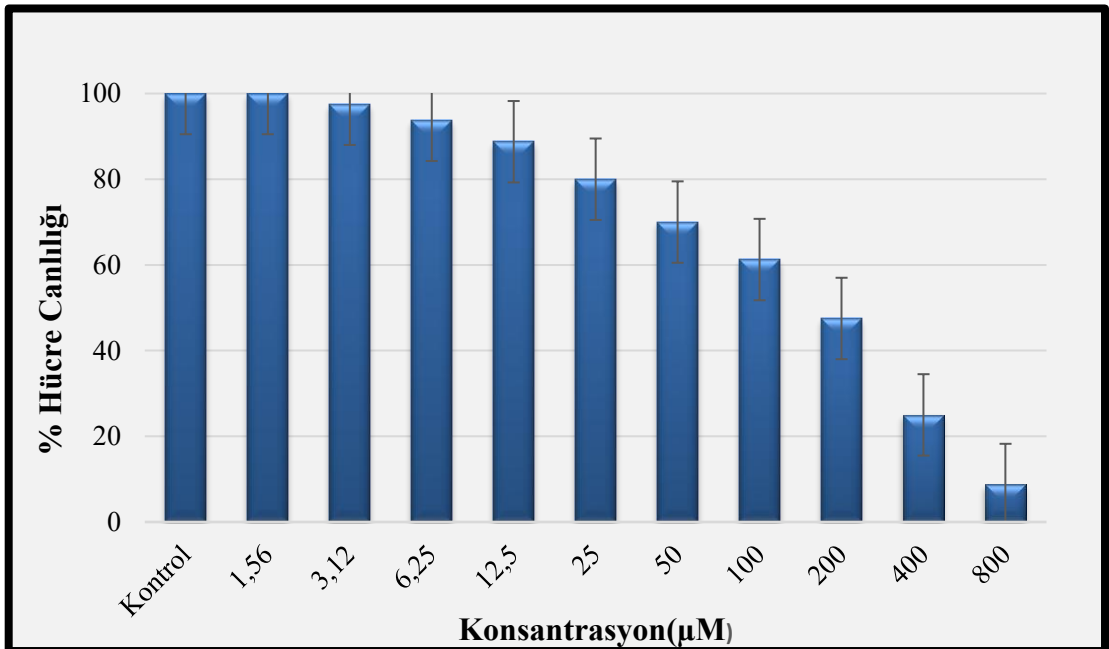
24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, düşük konsantrasyonlarda (1,56-25 µM) hücre canlılık oranlarının %86'nın üzerinde seyrettiği ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır. Ancak konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık oranlarında düşüş gözlenmiş; 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında canlılık sırasıyla yaklaşık %78,75; %71,25 ve %55 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). En yüksek konsantrasyon olan 800 µM uygulamasında ise canlılık %15 seviyelerine gerilemiştir. Bu veriler ışığında 24 saat için IC₅₀ değeri yaklaşık 245 µM olarak hesaplanmış olup tüm konsantrasyonlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda antiproliferatif etkinin zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µM) hücre canlılık oranları sırasıyla yaklaşık %80, %70, %61,25 ve %47,50 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



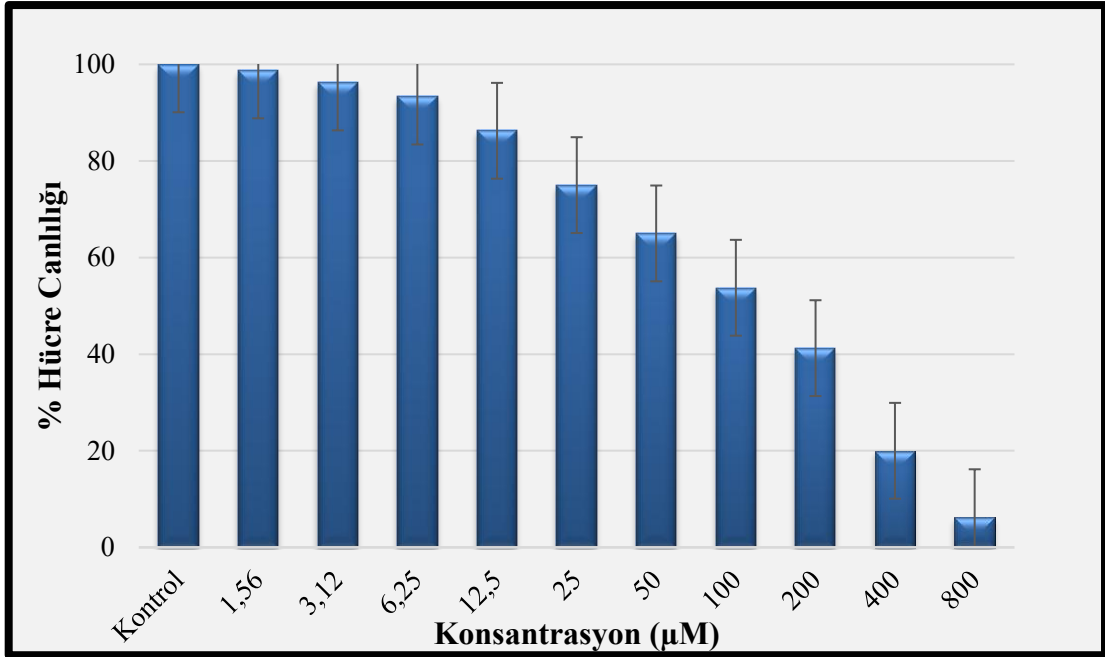
Şekil 4. 7. A549 hücrelerinde T-CS/TiO₂NC'lerin 24 saatlik XTT canlılık oranları

Özellikle 200 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü belirlenmiştir. 48 saatlik uygulama sonrası hesaplanan IC₅₀ değerinin yaklaşık 180 µM olduğu saptanmıştır. Konsantrasyonlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p <0,05).



Şekil 4. 8. A549 hücrelerinde T-CS/TiO₂NC'lerin 48 saatlik XTT canlılık oranları

72 saatlik T-CS/TiO₂NC maruziyetinde antiproliferatif etkinin kararlı bir seyir izlediği görülmektedir. 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında hücre canlılık oranları sırasıyla yaklaşık %65, %53,75 ve %41,25 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. A549 hücrelerinde T-CS/TiO₂NC'lerin 72 saatlik XTT canlılık oranları

Bu süre sonunda hücrelerin T-CS/TiO₂NC'lerine karşı gösterdiği yanıtın 48 saat verileriyle paralel olduğu, yüksek konsantrasyonlarda (400-800 µM) ise canlılığın %20'nin altına düştüğü gözlenmiştir. 72 saat verilerine dayanarak IC₅₀ değeri yaklaşık 130 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9). Sonuç olarak, uygulanan maddenin A549 hücre hattı üzerinde konsantrasyon ve zaman bağımlı bir sitotoksik etki gösterdiği, en belirgin inhibitör etkisinin ise 72 saatte ortaya çıktığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Timol, antimikrobiyal, antifungal, antiinflamatuvar ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip doğal bir biyoaktif bileşik olmasına rağmen, düşük biyoyararlanımı, sınırlı suda çözünürlüğü ve oksidasyona karşı yüksek duyarlılığı nedeniyle kullanım alanı kısıtlıdır (Sheorain vd., 2019). Genel olarak biyoaktif bileşikler önemli sağlık yararları sunmalarına karşın, kimyasal olarak kararsız yapıları ve oksidatif bozunmaya yatkınlıkları nedeniyle stabiliteyi kolaylıkla kaybedebilmektedir. Ayrıca saf formda kullanıldıklarında hızlı salım göstermeleri, düşük çözünürlükleri ve zayıf biyoyararlanımları, bu bileşiklerin farmasötik uygulamalardaki etkinliğini sınırlamaktadır. Kapsülleme teknolojileri, biyoaktif bileşiklerin çevresel faktörlere karşı korunmasını sağlarken, aynı zamanda fizikokimyasal özelliklerini iyileştirerek biyolojik etkinliklerinin artırılmasına katkı sunmaktadır (Shishir vd., 2018). Bu nedenle, çalışmamızda timolün bu farmakokinetik kısıtlarını aşabilecek nano-taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve antikanser etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin (T-CS/TiO₂NC) A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, nanokompozit sistemin yapısal, morfolojik ve termal özellikleri SEM, XRD, FTIR ve TGA analizleri ile karakterize edilmiştir; UV-Vis spektrofotometrisi kullanılarak timolün enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. Ardından sentezlenen nanokompozitlerin farklı konsantrasyon ve sürelerde hücre canlılığı üzerindeki etkileri XTT testi ile belirlenmiştir. Nanopartikül oluşumu SEM analizi ile doğrulanmış; SEM ve EDX sonuçları, TiO₂ nanopartiküllerinin kitosan yüzeyinde homojen olarak dağıldığını, timolün matriks içinde etkin şekilde hapsediğini ve organik-inorganik fazların başarıyla entegre edildiğini göstermiştir. XRD analizinde TiO₂'ye ait anataz fazının karakteristik piklerinin korunması, kitosanın amorf yapısının devam etmesi ve timole ait kristal piklerin kaybolması, bileşiğin matriks içinde amorf halde enkapsüle edildiğini ortaya koymuştur. FTIR bulguları da timolün kitosan matriksine başarılı şekilde enkapsüle edildiğini ve TiO₂ nanopartiküllerinin yapıya entegre olarak hibrit nanokompozit oluşturduğunu desteklemiştir. TGA sonuçları, sistemin üç aşamalı bozunma profili sergilediğini ve yüksek sıcaklıkta kalan kalıntı TiO₂ varlığını doğruladığını göstermiştir. Ayrıca UV-Vis spektrofotometrik analizler, TiO₂ varlığının timolün enkapsülasyon etkinliğini %20,5 artırdığını ve yükleme kapasitesini yaklaşık iki katına çıkardığını, böylece nanokompozit sistemin taşıma verimliliğini artırdığını ortaya koymuştur.

Literatürde benzer çalışmalar, timolün kitosan bazlı nanotaşıyıcı sistemler ile enkapsülasyonunun partikül boyutunun küçülmesi, dar boyut dağılımı ve yüzey yükünün pozitif olması gibi özellikler sayesinde sistem stabilitesini ve hücrel etkileşim potansiyelini artırdığını göstermektedir (Çakır vd., 2020; Balan vd., 2022; Kowalczyk vd., 2024). FTIR analizleri, timol ile kitosan-TPP matriksi arasında güçlü moleküler etkileşimlerin oluştuğunu doğrularken, XRD ve SEM analizleri nanopartikül oluşumu, kristal yapı ve morfolojik bütünlüğü desteklemektedir (Oluoch vd., 2021; Dadashi vd., 2024; Balasubramanian ve Citarasu, 2025). Ayrıca UV-Vis spektrofotometrisi ile belirlenen yüksek enkapsülasyon verimliliği, geliştirilen sistemin etkin bir taşıyıcı platform olduğunu ortaya koymuştur (Oluoch vd., 2021; Ojeda-Piedra vd., 2024; Dadashi vd., 2024; Kowalczyk vd., 2024).

Çakır vd. (2020) tarafından timol yüklü kitosan nanopartiküllerinin en uygun enkapsülasyon verimi, zeta potansiyeli ve partikül boyutu elde etmek için üretim koşullarının optimize edildiği bir çalışmada, sıcaklık ve kullanılan bileşen oranlarının nanopartikül özelliklerini belirgin biçimde etkilediği ve en uygun koşulların 42 °C, 3 mg/mL kitosan, 5,9 mg/mL timol, 3 mg/mL Tween 80 ve 0,75 mg/mL TPP olduğu gösterilmiştir. Timol yüklü kitosan nanoparçacıkların FTIR, XRD, DLS ve SEM ile karakterize edildiği bir çalışmada, nanoparçacıkların yaklaşık 280 nm’de %74 enkapsülasyon verimine sahip olduğu bildirilmiştir (Balan vd., 2022). Yine, timolün tragant gam/kitosan esaslı küresel nanotaşıyıcıya 1:2 oranında yüklendiğinde 150-200 nm boyutlu, yüksek enkapsülasyon verimli bir sistem elde edildiği rapor edilmiştir (Sheorain vd., 2019). Marco A. López-Mata ve arkadaşları (2013) kitosan bazlı sistemlere hidrofobik bileşiklerin eklenmesinin SEM analizlerinde daha kompakt, homojen ve düzenli bir yapı yüzey morfolojisi oluşturduğunu göstermiştir. Sreelatha ve arkadaşlarının (2022) yaptığı bir çalışmada timole ait aromatik ve fenolik grupların nanopartikül spektrumunda korunduğu ve böylece timolün kitosan matrisi içine başarıyla enkapsüle edildiği gösterilmiştir. FTIR sonuçlarında timole ait bantların 1250-1750 cm⁻¹ aralığında yer aldığı, 2800-3200 cm⁻¹ bölgesinde metil soğurumlarının görüldüğü ve 1621-1459 cm⁻¹ arasındaki piklerin fenol halkasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Saf kitosanda yaklaşık 3350 cm⁻¹’de görülen geniş bandın -NH₂ ve -OH gerilmelerine ait olduğu, TPP ile çapraz bağlanmış nanopartiküllerde bu bandın yer değiştirmesi ve keskinleşmesinin hidrojen bağlarının güçlendiğini ve iyonik etkileşimlerin oluştuğunu düşündürdüğü ifade edilmektedir. Benzer şekilde, kitosan-TPP nanoparçacıklarında yaklaşık 3199 cm⁻¹ civarındaki geniş tepe de O-H/N-H gerilmeleriyle ilişkilendirilmiş ve güçlü kitosan-TPP etkileşimini desteklemiştir. Ayrıca SEM/TEM analizleri, timol yüklü kitosan nanopartiküllerinin küresel morfolojiye sahip olduğunu ve nano boyutta

dağıldığını göstermektedir; bu bulgular, aktif bileşenlerin kitosan matrisi içindeki dağılımının sistemin morfolojik yapısını da etkilediğini ortaya koymaktadır.

Literatür, kitosan, titanyum dioksit ve timol gibi aktif bileşenleri içeren nanokompozit sistemlerin sentezinde, bileşenlerin matris içerisinde sergilediği homojen dağılımın ve yapısal uyumluluğun kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. SEM, AFM ve EDX gibi görüntüleme teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, TiO_2 nanopartiküllerinin aglomerasyona uğramadan polimer matrise başarıyla entegre edildiği ve yüzey morfolojisinde tekdüze bir karakterizasyon sağladığı kanıtlanmıştır. Raut ve arkadaşları (2016) ile Shemona ve arkadaşları (2024) tarafından yapılan çalışmalarda, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri kullanılarak kitosan/ TiO_2 nanokompozitlerinde TiO_2 nanopartiküllerinin kitosan matris içerisinde tekdüze bir şekilde dağıldığı ve aglomerasyonun engellendiği gösterilmiştir. Özellikle titanyum (Ti) molekülleri ile amino grupları arasında güçlü bir koordinasyon olduğu ve sistemde faz dönüşümü yaşanmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde, Li ve arkadaşları (2016) bu yapıların yüzey morfolojilerinin bileşenlerin tekil hallerinden farklılaştığını bildirerek kompozit oluşumunu doğrulamıştır. Bu tür nanokompozitlerin fizikokimyasal modifikasyonları, termogravimetrik analiz (TGA) ile desteklenerek termal kararlılığın artışı kanıtlanmış ve sistemin termal dayanımı detaylandırılmıştır. Kızılkaya ve Kaya (2024) ise SEM-EDX ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) analizleri ile TiO_2 'nin matrise entegrasyonunun daha homojen bir yüzey morfolojisi yarattığını vurgulamış, FTIR spektrumlarındaki band kaymalarına dikkat çekmiştir. Özellikle $3288-3356\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki OH bantları ile 1659 ve 1558 cm^{-1} 'deki amid bantlarının TiO_2 nanopartiküllerinin sisteme başarılı entegrasyonunu net bir şekilde kanıtladığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, titanyum yüzeylerde timol içeren biyo-esinlenmiş nanokatmanları AFM ile inceleyen González ve arkadaşları (2020), bu kaplamaların 80 nm 'nin altında bir kalınlığa sahip olduğunu belirterek ATR-FTIR kullanarak doğrudan timol kaplamalarının kimyasal yapısını incelemiş ve timol yüklü sistemlerde fonksiyonel grupların karakterizasyonu için uygun yöntemi ortaya koymuştur. Aynı çalışma ile timol ve TiO_2 bazlı nanokompozit sistemlerinin biyomedikal uygulamalar alanlarında güçlü bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, kitosan, TiO_2 nanopartikülleri ve timol gibi biyoaktif bileşenlerin güçlü kimyasal bağlarla matrislere başarıyla entegre edildiği, termal stabilitenin korunduğu ve elde edilen bu yapısal homojenliğin yüksek performansa katkı sağladığı açıkça görülmektedir.

Timol yüklü kitosan/TiO₂ nanokompozitlerinin (T-CS/TiO₂NC) A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri değerlendirildiği XTT testi bulgularında, T-CS/TiO₂NC'lerin A549 hücre hattı üzerinde düşük konsantrasyonlarda sınırlı bir etki gözlenirken, artan konsantrasyon ve maruziyet süresi ile hücre canlılığında anlamlı azalmalar meydana geldiği ve bu etkinin 72 saat sonunda maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. IC₅₀ değerlerinin zamana bağlı azalması, nanokompozit sistemin uzun süreli uygulamalarda daha güçlü bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir.

Timol, kekik ve benzeri bitkilerden elde edilen bir fenolik monoterpen olarak, *in vitro* ve *in vivo* modellerde kanser hücre proliferasyonunu baskılamakta apoptozu indüklemesi, normal hücreler üzerinde ise görece daha sınırlı etkiler göstermesi nedeniyle dikkat çekmektedir; hücre döngüsünü durdurarak ROS aracılı mitokondriyal apoptoz yollarını aktive etmesi ve temel proliferatif sinyal yollarını inhibe etmesi bu etkinin temel mekanizmaları arasında yer almakta olup, ayrıca ilaç taşıma sistemleri ve kimyasal türevlerle bu antiproliferatif etkinin daha da artırılabilceği bildirilmektedir (Elbe vd., 2020; Noman vd., 2025).

Balan ve arkadaşları (2021), serbest timolün A549 hücrelerinde doza ve zamana bağlı belirgin antiproliferatif etki gösterdiği ve 24 saatte IC₅₀ değerinin yaklaşık 112 µg/mL (745 µM) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, timol uygulamasının hücre döngüsünde G₀/G₁ fazında duraksamaya neden olduğu; morfolojik değişiklikler, fosfatidilserin dışı taşınması, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve DNA parçalanması gibi bulgularla mitokondri aracılı apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, ROS düzeylerinde artış, SOD seviyelerinde azalma ve Bax/Bcl-2 dengesinin pro-apoptotik yönde değişmesinin timolün etkisiyle ilişkili olduğu da vurgulanmıştır.

Literatürde, TiO₂ nanoparçacıklarının JB6, A549, HT-29, HCT116, Sertoli, TM4 ve HT22 hücre hatlarında ROS üretimini artırarak mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe yol açtığı; buna bağlı olarak sitokrom c salınımını tetiklediği, Bax ekspresyonunu artırıp, Bcl-2 seviyelerini azalttığı ve kaspaz-9/3 aktivasyonunu indükleyerek intrinsik mitokondriyal apoptoz sürecini başlattığı rapor edilmiştir (Zhao vd., 2009; Wang vd., 2015; Ranjan vd., 2020; Vigneshwaran vd., 2021). Wang ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada TiO₂ nanopartiküllerinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu nanopartiküllerin mitokondri aracılı yol üzerinden A549 hücrelerinde

apoptozu indüklediği belirlenmiş olup, elde edilen bulgular TiO₂ nanopartiküllerinin bu hücre hattında genotoksisite ve programlı hücre ölümünü tetikleyebildiğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Bununla birlikte bitki ekstratlarıyla yeşil olarak sentezlenen ya da fitokimyasallar ile kaplanan TiO₂ nanopartiküllerinin karaciğer, meme, akciğer ve deri kanseri gibi farklı kanser hücrelerinde doza bağlı sitotoksisiteyi, ROS artışını, mitokondriyal hasarı ve kaspaz aracılı apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur (Rayzah vd., 2023; Jeyaraj ve Saral, 2024; Sedky vd., 2024). Yine bir çalışmada, bitki ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle üretilen TiO₂ nanoparçacıklarının (yaklaşık 38,99 nm) MCF-7, HeLa, PC-3 ve A549 hücre hatlarında düşük IC₅₀ değerleriyle güçlü antikanser aktivite gösterdiği ve biyomedikal uygulamalar için potansiyel taşıdığı ifade edilmiştir (Parveen vd., 2023). Nano-TiO₂ maruziyetinin sıçanlarda özellikle karaciğer ve testis dokularında oksidatif hasara yol açtığının bildirildiği, buna karşılık, TiO₂ maruziyeti öncesinde uygulanan oral timolün (10-30 mg/kg) karaciğer enzimlerindeki artışı ve oksidatif stres belirteçlerini azalttığı; aynı zamanda antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek belirgin bir hepatoprotektif etki gösterdiğinin tespit edildiği literatür de mevcuttur (Jafari vd., 2018). Benzer şekilde, timolün sperm kalitesi, testis histolojisi ve antioksidan kapasitesi üzerinde iyileştirici etkiler sağlayarak TiO₂ kaynaklı testis hasarına karşı doza bağımlı bir koruma sunduğu da belirtilmektedir (Jafari vd., 2020). Ayrıca, timol ve karvakrol açısından zengin kekik yağı ile bu bileşiklerin nanoemülsiyon formlarının da TiO₂ nanoparçacıklarının neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkiler gösterdiği ifade edilmektedir (Sallam vd., 2022). Bu bulgular, timolün TiO₂ kaynaklı oksidatif hasara karşı güçlü bir koruyucu ajan olabileceğini desteklemektedir.

Kitosan esaslı taşıyıcı sistemlerin timol ve diğer bitkisel biyoaktif bileşiklerin kanser hücreleri tarafından alınımını artırarak antiproliferatif etkinliği güçlendirdiği; bu kapsamda bitkisel bileşik yüklü kitosan nanoparçacıklarının serbest bileşiklere kıyasla daha düşük IC₅₀, daha belirgin apoptoz ve normal hücrelerde görece daha düşük toksisite sergilediği saptanmıştır. Bu durum, kitosanın biyouyumluluğu ve hücre membranı ile etkileşimini kolaylaştıran yapısal özellikleri sayesinde, etken maddenin hücre içi biyoyararlanımını artırmasına bağlanmaktadır (Rajivgandhi vd., 2020; Balan vd., 2022; Rajivgandhi vd., 2023).

Birçok nanotaşıyıcıda (kitosan, lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, Fe₃O₄) timol yüklü nanopartiküllerin gelişmiş hücresel alım ve doku dağılımı sayesinde serbest timole kıyasla daha

yüksek düzeyde apoptozu ve sitotoksiteyi indüklediği bildirilmektedir (Balan vd., 2022; Kohan vd., 2023; Keshavarz vd., 2024). TiO_2 ve kitosan içeren kompozitlerin farklı hücre hatlarında güçlü mitokondriyal apoptoz uyarımı gösterdiği çalışmalar da bulunmaktadır. TiO_2 -kitosan bazlı nanokompozitlerin farklı hücre hatlarında ROS artışı ve kaspaz aktivasyonu üzerinden antiproliferatif etki göstermesi, bu iki bileşiğin birlikte kullanımının mitokondriyal yolak aracılı güçlü bir sitotoksik etki oluşturabileceğini desteklemektedir (Elderderly vd., 2022a; Elderderly vd., 2022b).

Kitosan kaplı çok bileşenli nanokompozitlerin ($ZnO/TiO_2/Gd_2O_3$) rapamisinin biyoyararlılığını artırarak ROS üretimi, hücre döngüsü durması ve apoptozu/otofaji mekanizmaları üzerinden A549 hücrelerinde güçlü ve seçici bir antikanser etki oluşturabildiği gösterilmiştir (Ganesh vd., 2025). Dolayısıyla, bu tür nanotaşıyıcı sistemler, rapamisine bağlı direnç ve düşük etkinlik gibi sınırlamaları aşmada umut verici bir strateji sunmaktadır. Benzer şekilde başka bir çalışmada, kitosan temelli timol yüklü nanoparçacıkların A549 hücrelerinde serbest timole kıyasla daha düşük IC_{50} değeri (24 saat için 99,57 $\mu g/mL$) gösterdiği ve %90'ın üzerinde apoptotik hücre oranı ile apoptozu belirgin şekilde artırdığı rapor edilmiştir (Balan vd., 2022).

Bu tez çalışmasında, timol yüklü kitosan/ TiO_2 nanokompozitleri iyonik jelyasyon yöntemi ile başarıyla sentezlenmiş, SEM-EDX, XRD ve FTIR analizleri ile morfolojik ve kimyasal özellikleri doğrulanmış, TGA sonuçları ise sistemin termal davranışının bileşenlere bağlı olarak değiştiğini göstermiştir; ayrıca UV-Vis analizleriyle nanokompozitlerin enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi belirlenmiş, A549 hücre hattında yapılan Trypan Blue ve XTT testleri sonucunda ise nanokompozitlerin doza bağlı sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği ortaya konmuştur. Tüm bu bulgular ile literatür birlikte değerlendirildiğinde, timol ve TiO_2 nanopartiküllerinin hücre içi oksidatif dengeyi hedef alarak antiproliferatif etki oluşturduğu ve bu etkilerin uygun kombinasyonlar veya taşıyıcı sistemler ile daha etkin hale getirilebileceği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, bu iki bileşenin birlikte kullanıldığı sistemlerin biyolojik etkinliğin artırılması açısından önemli bir araştırma alanı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, mevcut çalışmalar incelendiğinde, timol yüklü TiO_2 nanoparçacıklarının özellikle A549 hücre hattı üzerindeki etkilerini doğrudan ele alan spesifik bir araştırmaya rastlanmamaktadır; bu durum söz konusu timol yüklü kitosan/ TiO_2 nanokompozitinin araştırılmasının literatürde önemli bir boşluğu doldurabileceğini göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Abdulrasool, M. M., Kamari, A., Kumaran, S., Ishak, S., Yusoff, S. N. M., Jumadi, J., & Wong, S. T. S. (2019). The potential of chitosan-TiO₂ nanocomposite for methyl orange and rhodamine B removal. *Journal of Physics: Conference Series*, 1397(1), 012029.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281.
- Ahmad, A., Imran, M., & Sharma, N. (2022). Precision nanotoxicology in drug development: Current trends and challenges. *Pharmaceutics*, 14(11), 2463.
- Alam, M. W., & Qurashi, A. (2014). Metal chalcogenide quantum dots for hybrid solar cell applications. In *Metal Chalcogenide Nanostructures for Renewable Energy Applications* (pp. 233-246).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell (4th ed.)*. Garland Science.
- Ali, S. Z., Baloch, Z. W., Cochand-Priollet, B., Schmitt, F. C., Vielh, P., & VanderLaan, P. A. (2023). Tiroid sitopatolojisi raporlaması için 2023 Bethesda sistemi. *Thyroid*, 33(9), 1039-104.
- Alizadeh, N., & Nazari, F. (2022). Thymol essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex into chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 346, 118250.
- Alkaç, İ. M., Keskin, S., & Çerçi, B. (2024). Nanotaşıyıcıların kanser hücrelerine hedeflenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 25(3), 396-406.
- Alzahrani, E., Ahmed, R. A., & Alotaibi, R. S. (2020). TiO₂ nanoparticles embedded in chitosan membrane. *Oriental Journal of Chemistry*, 36(1), 144.
- Anagnostou, V. K., & Brahmer, J. R. (2015). Cancer immunotherapy in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 21, 976-984.
- Anu Mary Ealia, S., & Saravanakumar, M. P. (2017). Classification and synthesis of nanoparticles. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032019.
- Aung, T. N., Qu, Z., Kortschak, R. D., & Adelson, D. L. (2017). Natural compounds in cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 656.
- Auriemma, G., Russo, P., Del Gaudio, P., García-González, C. A., Landín, M., & Aquino, R. P. (2020). Polysaccharide-based hydrogels for drug delivery. *Molecules*, 25(14), 3156.

- Aziz, S. B., Hamsan, M. H., Kadir, M. F. Z., & Woo, H. J. (2020). Polymer blends based on chitosan. *Advances in Polymer Technology*, 2020, 8586136.
- Balachandran, K., Mageswari, S., & Preethi, A. (2021). Photocatalytic decomposition of A549 cells. *Materials Today: Proceedings*, 37, 1071-1074.
- Balan, D. J., Das, M., Sathya, S., Kiruthiga, C., Jeyakumar, M., Antoniraj, M. G., & Devi, K. P. (2022). Chitosan based encapsulation increased the apoptotic efficacy of thymol on A549 cells and exhibited non toxic response in swiss albino mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 202, 620-631.
- Balan, D. J., Rajavel, T., Das, M., Sathya, S., Jeyakumar, M., & Devi, K. P. (2021). Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells. *Pharmacological Reports*, 73(1), 240-254.
- Balart, R., Garcia-Garcia, D., Fombuena, V., Quiles-Carrillo, L., & Arrieta, M. P. (2021). Biopolymers from natural resources. *Polymers*, 13(15), 2532.
- Balasubramanian, S., & Citarasu, T. (2025). Chitosan-TPP Nanoparticles: A Potential Biocompatible Growth Promotor Diet in Fish Aquaculture. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, 46(12), 162-180.
- Ballav, S., Deshmukh, A. J., Siddiqui, S., Aich, J., & Basu, S. (2021). Two-dimensional and three-dimensional cell culture and their applications. *In Cell Culture-Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences*. IntechOpen.
- Bashal, A. H., Riyadh, S. M., Alharbi, W., Alharbi, K. H., Farghaly, T. A., & Khalil, K. D. (2022). Bio-based (Chitosan-ZnO) nanocomposite: synthesis, characterization, and its use as recyclable, ecofriendly biocatalyst for synthesis of thiazoles tethered azo groups. *Polymers*, 14(3), 386.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Bi, L., Wang, X., Li, J., Li, W., & Wang, Z. (2025). Epigenetic modifications in early stage lung cancer: pathogenesis, biomarkers, and early diagnosis. *MedComm*, 6(3), e70080.
- Bogart, J. A., Waqar, S. N., Mix, M. D. (2022). Radiation and systemic therapy for limited-stage small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 40(6), 661-670.
- Bokobza, L. (2023). Elastomer nanocomposites: Effect of filler-matrix and filler-filler interactions. *Polymers*, 15(13), 2900.
- Branca, C., D'Angelo, G., Crupi, C., Khouzami, K., Rifici, S., Ruello, G., & Wanderlingh, U. (2016). Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite

- interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. *Polymer*, *99*, 614-622.
- Braun, J. H., Baidins, A., Marganski, R. E. (1992). TiO₂ pigment technology: A review. *Progress in Organic Coatings*, *20*, 105–138.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229-263.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229-263.
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Definition of cancer. *Molecular Cancer Research*, *21*(11), 1142-1147.
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the definition of cancer. *Molecular Cancer Research*, *21*(11), 1142-1147.
- Chandrakala, V., Aruna, V., & Angajala, G. (2022). Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials*, *5*(6), 1593-1615.
- Chen, S., Cao, Z., Prettnner, K., Kuhn, M., Yang, J., Jiao, L., & Wang, C. (2023). Estimates and projections of the global economic cost of 29 cancers in 204 countries and territories from 2020 to 2050. *JAMA Oncology*, *9*(4), 465-472.
- Chen, X., Wang, W., Zhang, H., Liang, N., Chen, D., Li, J., & Liu, Z. (2025). Plant-derived natural compounds for the treatment of acute lung injury: A systematic review of their anti-inflammatory effects in animal models. *International Immunopharmacology*, *146*, 113807.
- Ciftci, F., Özarıslan, A. C., Kantarci, I. C., Yelkenci, A., Tavukcuoglu, O., & Ghorbanpour, M. (2025). İlaç hedefleme, ilaç dağıtımı ve nanoteknoloji uygulamalarındaki gelişmeler: kanser tedavisinde terapötik önemi. *Eczacılık*, *17*(1), 121.
- Cihlar, J., Navarro, L. K. T., Kasperek, V., Michalicka, J., Kastyl, J., Castkova, K., Celko, L. (2021). Influence of LA/Ti molar ratio on the complex synthesis of anatase/brookite nanoparticles and their hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*, 8578–8593.

- Clastin Indira, A., Muthaian, J. R., Pandi, M., Mohammad, F., Al-Lohedan, H. A., & Soleiman, A. A. (2023). Photocatalytic efficacy and degradation kinetics of chitosan-loaded Ce-TiO₂ nanocomposite towards for rhodamine B dye. *Catalysts*, *13*(12), 1506.
- Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A., Minna, J. D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, *5*(Suppl. 5), S479-S490.
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, *112*, 1-9.
- Cryer, A. M., Thorley, A. J. (2019). Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, *198*, 189-205.
- Çakır, M. A., Icyer, N. C., & Tornuk, F. (2020). Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 230-238.
- Çıracı, S. (2006). Nanobilim ve nanoteknolojide Türkiye'nin bir mükemmeliyet merkezi. *Bilim ve Teknik Dergisi*, *469*(Ek), 2-4.
- Dadashi, H., Vandghanooni, S., Karamnejad-Faragheh, S., Karimian-Shaddel, A., Eskandani, M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2024). A rapid protocol for synthesis of chitosan nanoparticles with ideal physicochemical features. *Heliyon*, *10*(11).
- Dağlıoğlu, C. (2018). A comparative study of passive and active tumor targeting using nanoparticles as drug delivery systems. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, *6*(1), 1-7.
- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, *1*, 10-19.
- Davodabadi, F., Sajjadi, S. F., Sarhadi, M., Mirghasemi, S., Hezaveh, M. N., Khosravi, S., & Ghavami, S. (2023). Cancer chemotherapy resistance: Mechanisms and recent breakthrough in targeted drug delivery. *European Journal of Pharmacology*, *958*, 176013.
- Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Pontillo, A. R. N., Tzani, A., & Zoumpoulakis, P. (2020). Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix. *Pharmaceutics*, *12*(7), 669.
- Dou, X., Yan, D., Liu, S., Gao, L., & Shan, A. (2022). Thymol alleviates LPS-induced liver inflammation and apoptosis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and the AMPK-mTOR-autophagy pathway. *Nutrients*, *14*(14), 2809.

- Elbe, H., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., Uyanikgil, Y., & Ozturk, F. (2020). Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. *Bratislava Medical Journal/Bratislavske Lekarske Listy*, 121(2).
- Elderderly, A. Y., Alhamidi, A. H., Elkhalifa, A. M., Althobiti, M. M., Eltayeb Omer, N., Alsugoor, M. H., & Mok, P. L. (2022a). Synthesis, characterization, and antimicrobial and antiproliferative effects of CuO-TiO₂ -chitosan-escin nanocomposites on human leukemic MOLT4 cells. *Nanomaterials*, 12(21), 3753.
- Elderderly, A. Y., Alzahrani, B., Hamza, S. M., Mostafa-Hedeab, G., Mok, P. L., & Subbiah, S. K. (2022b). Synthesis, characterization, and antiproliferative effect of CuO-TiO₂ -chitosan-amygdalin nanocomposites in human leukemic MOLT4 cells. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022(1), 1473922.
- Elumalai, K., Srinivasan, S., & Shanmugam, A. (2024). Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomedical Technology*, 5, 109-122.
- Escobar, A., Perez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9243-9269.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Fekri Kohan, S., Zamani, H., & Salehzadeh, A. (2023). Antibacterial potential and cytotoxic activity of iron oxide nanoparticles conjugated with thymol (Fe₃O₄@ Glu-Thymol) on breast cancer cells and investigating the expression of BAX, CASP8, and BCL-2 genes. *Biometals*, 36(6), 1273-1284.
- Feynman, R. (2018). There's plenty of room at the bottom. In *Feynman and Computation* (pp. 63-76). CRC Press.
- Gago, C., Serralheiro, A., & Miguel, M. D. G. (2025). Anti-inflammatory activity of thymol and thymol-rich essential oils: Mechanisms, applications, and recent findings. *Molecules*, 30(11), 2450.
- Ganesh, S. K., Chakravorty, A., Raghavan, V., & Devi, C. S. (2025). Chitosan coated ZnO/TiO₂/Gd₂O₃ nano composites for improved rapamycin delivery in non-small cell lung cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 319, 145439.
- Ghareeb, A., Fouda, A., Kishk, R. M., & El Kazzaz, W. M. (2024). Unlocking the potential of titanium dioxide nanoparticles: an insight into green synthesis, optimizations, characterizations, and multifunctional applications. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 341.

- Glaviano, N. R., Kew, M., Hart, J. M., & Saliba, S. (2015). Demographic and epidemiological trends in patellofemoral pain. *International Journal of Sports Physical Therapy*, *10*(3), 281.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., & Naghavi, M. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncology*, *1*(4), 505-527.
- Gonzalez, A., Miñán, A. G., Grillo, C. A., Prieto, E. D., Schilardi, P. L., & de Mele, M. A. F. L. (2020). Characterization and antimicrobial effect of a bioinspired thymol coating formed on titanium surface by one-step immersion treatment. *Dental Materials*, *36*(12), 1495-1507.
- Gopinath, K. P., Madhav, N. V., Krishnan, A., Malolan, R., Rangarajan, G. (2020). Present applications of titanium dioxide for the photocatalytic removal of pollutants from water: A review. *Journal of Environmental Management*, *270*, 110906.
- Gupta, R. (2021). A theoretical study of 5-methyl-2-isopropylphenol (thymol) by DFT. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, *8*, 812-830.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Hassan, T., Salam, A., Khan, A., Khan, S. U., Khanzada, H., Wasim, M., & Kim, I. S. (2021). Functional nanocomposites and their potential applications: A review. *Journal of Polymer Research*, *28*(2), 36.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, *553*(7689), 446-454.
- Holder, C. F., & Schaak, R. E. (2019). Tutorial on powder X-ray diffraction for characterizing nanoscale materials. *ACS Nano*, *13*(7), 7359-7365.
- Huma, F., Jaffar, M., Masud, K. A. (1999). Modified potentiometric method for estimation of phenol in aqueous systems. *Turkish Journal of Chemistry*, *23*, 415-422.
- Humphrey, L. L., Deffebach, M., Pappas, M., Baumann, C., Artis, K., Mitchell, J. P., & Slatore, C. G. (2013). Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: a systematic review to update the US Preventive services task force recommendation. *Annals of Internal Medicine*, *159*(6), 411-420.
- Huq, T., Khan, A., Brown, D., Dhayagude, N., He, Z., & Ni, Y. (2022). Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, *7*(2), 85-98.

- Hussein, E. M., Desoky, W. M., Hanafy, M. F., & Guirguis, O. W. (2021). Effect of TiO₂ nanoparticles on the structural configurations and thermal, mechanical, and optical properties of chitosan/TiO₂ nanoparticle composites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 152, 109983.
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 223-245.
- Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7, 193.
- Irshad, M. A., Nawaz, R., Ur Rehman, M. Z., Adrees, M., Rizwan, M., Ali, S., & Tasleem, S. (2021). Synthesis, characterization and advanced sustainable applications of titanium dioxide nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 111978.
- Islam, M. T., Khalipha, A. B., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. Z., Uddin, S. J., & Rouf, R. (2019). Anticancer activity of Thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life*, 71(1), 9-19.
- Jafari, A., Karimipour, M., Khaksar, M. R., & Ghasemnejad-Berenji, M. (2020). Protective effects of orally administered thymol against titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 2353-2360.
- Jafari, A., Rasmi, Y., Hajaghazadeh, M., & Karimipour, M. (2018). Hepatoprotective effect of thymol against subchronic toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Biochemical and histological evidences. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 58, 29-36.
- Jeyaraj, S., & Mary Saral, A. (2024). Green biosynthesis of TiO₂ nanoparticles using aqueous extract of *Brassica juncea* (L.) Czern seed: characterization, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. *Chemistry Select*, 9(21), e202401603.
- Jiang, Z. S., Pu, Z. C., & Hao, Z. H. (2015). Carvacrol protects against spinal cord injury in rats via suppressing oxidative stress and the endothelial nitric oxide synthase pathway. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5349-5354.
- Jing, L., Zhou, W., Tian, G., Fu, H. (2013). Surface tuning for oxide-based nanomaterials as efficient photocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42, 9509-9549.
- Joseph, J. S., Malindisa, S. T., & Ntwasa, M. (2018). Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culturing in drug discovery. *Cell Culture*, 2, 1-22.
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262.

- Kabadayı, O. (2025). *TiO₂ ve ZnO kaplı zeolitlerin sentezi, karakterizasyonu ve metilen mavisi adsorpsiyonunun yapay sinir ağları ile modellenmesi*. (Doktora Tezi), Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Kalyane, D., Raval, N., Maheshwari, R., Tambe, V., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2019). Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 1252-1276.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Karki, S., Gohain, M. B., Yadav, D., & Ingole, P. G. (2021). Nanocomposite and bio-nanocomposite polymeric materials/membranes development in energy and medical sector: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2121-2139.
- Kazemi-Pasarvi, S., Ebrahimi, N. G., & Raef, M. (2020). Preparation, characterization, and permeability of novel poly (lactic acid)-based blends filled with thymol and ZnO. *Polymer Testing*, 89, 106550.
- Keshavarz, F., Soltanshahi, M., Khosravani, F., Bakhshiyani, F., Ghanbari, A., Hassanzadeh, S., & Ghalamfarsa, G. (2024). Thymol-loaded liposomes effectively induced apoptosis and decreased EGFR expression in colorectal cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(7), 5157-5165.
- Keskin, H. L. (2011). Nanoteknoloji nedir? *Turkish Medical Journal*, 5(1), 45-49.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khoo, C., Rogers, T. M., Fellowes, A., Bell, A., & Fox, S. (2015). Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Translational Lung Cancer Research*, 4(2), 126.
- Kızılkaya, P., & Kaya, M. (2024). Chitosan/TiO₂/Rosmarinic acid bio-nanocomposite coatings: characterization and preparation. *Journal of Composites Science*, 9(1), 2.
- Kirtane, A. R., Kalscheuer, S. M., & Panyam, J. (2013). Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: challenges and opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1731-1747.
- Kiss, B. (2009). *Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis. Debrecen. Univ).

- Koga, S., Sekiya, H., Kondru, N., Ross, O. A., & Dickson, D. W. (2021). Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), 83.
- Kowalczyk, A., Twarowski, B., Fecka, I., Tuberoso, C. I. G., & Jerković, I. (2024). Thymol as a component of chitosan systems-Several new applications in medicine: A comprehensive review. *Plants*, 13(3), 362.
- Kučuk, N., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2023). Sustainable biodegradable biopolymer-based nanoparticles for healthcare applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3188.
- Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., Dutta, J. (2019). Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. *Applied Sciences*, 9, 2409.
- Kushibiki, T., Tu, Y., Abu-Yousif, A. O., & Hasan, T. (2015). Photodynamic activation as a molecular switch to promote osteoblast cell differentiation via AP-1 activation. *Scientific Reports*, 5(1), 13114.
- Lagopati, N., Tsilibary, E. P., Falaras, P., Papazafiri, P., Pavlatou, E. A., Kotsopoulou, E., & Kitsiou, P. (2014). Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 3219-3230.
- Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., & Elaissari, A. (2020). Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*, 12(5), 431.
- Li, B., Zhang, Y., Yang, Y., Qiu, W., Wang, X., Liu, B., & Sun, G. (2016). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of chitosan/TiO₂ nanocomposite against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Carbohydrate Polymers*, 152, 825-831.
- Li, J., Cai, C., Li, J., Li, J., Li, J., Sun, T., & Yu, G. (2018). Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *Molecules*, 23(10), 2661.
- Li, T., Shi, J., Wang, L., Qin, X., Zhou, R., Dong, M., & Li, J. (2023). Thymol targeting interleukin 4 induced 1 expression reshapes the immune microenvironment to sensitize the immunotherapy in lung adenocarcinoma. *Medical Communications*, 4(5), e355.
- Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Beasley, M. B., Chitale, D. A., Dacic, S., Giaccone, G., & Ladanyi, M. (2013). Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(7), 823-859.
- Liu, J., Pandya, P., & Afshar, S. (2021). Therapeutic advances in oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2008.

- Liu, Y., Liang, Y., Yuhong, J., Xin, P., Han, J. L., Du, Y., & Ma, Y. (2024). Advances in nanotechnology for enhancing the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs. *Drug Design, Development and Therapy*, 1469-1495.
- López-Mata, M. A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N. P., Ornelas-Paz, J. D. J., Zamudio-Flores, P. B., & BurrueI-Ibarra, S. E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, 18(11), 13735-13753.
- Lu, K. Q., Quan, Q., Zhang, N., Xu, Y. J. (2016). Multifarious roles of carbon quantum dots in heterogeneous photocatalysis. *Journal of Energy Chemistry*, 25(6), 927-935.
- Lukic, P. (1989). *Farmacognazija*. University of Belgrade.
- Madamsetty, V. S., Mukherjee, A., Mukherjee, S. (2019). Recent trends of the bio-inspired nanoparticles in cancer theranostics. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1264.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1-21.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying Technology*, 32(5), 509-518.
- Majeed, A., Ahmed, M. N., Raza, S. R. A., Jalil, A., Khan, A. A., & Ahmed, A. (2023). Precursor concentration-dependent structural, optical and electrical properties of titanium dioxide nanostructures. *Materials Chemistry and Physics*, 304, 127786.
- Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: a revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661.
- Mandl, H. K., Quijano, E., Suh, H. W., Sparago, E., Oeck, S., Grun, M., & Saltzman, W. M. (2019). Optimizing biodegradable nanoparticle size for tissue-specific delivery. *Journal of Controlled Release*, 314, 92-101.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.
- Maringe, C., Spicer, J., Morris, M., Purushotham, A., Nolte, E., Sullivan, R., & Aggarwal, A. (2020). The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: A national, population-based, modelling study. *The Lancet Oncology*, 21(8), 1023-1034.

- Merino, S., Martín, C., Kostarelos, K., Prato, M., & Vázquez, E. (2015). Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano*, 9(5), 4686-4697.
- Mirdehghan, S. H., & Valero, D. (2017). Bioactive compounds in tomato fruit and its antioxidant activity as affected by incorporation of aloe, eugenol, and thymol in fruit package during storage. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 1798-1806.
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. J. T. J. O. P. R. (2006). Nanoparticles-A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. *Pharmaceutics*, 3, 793-829.
- Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161-177.
- Nallamuthu, I., Devi, A., Khanum, F. (2015). Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 203-211
- Nitta, S. K., & Numata, K. (2013). Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1629-1654.
- Noman, A. M., Sultan, M. T., Zafar, S., Maaz, M., Mazhar, A., Hussain, M., & Al Jbawi, E. (2025). Thymol and carvacrol: molecular mechanisms, therapeutic potential, and synergy with conventional therapies in cancer management. *Food Science & Nutrition*, 13(9), e70936.
- Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and future development in lung cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8661.
- Ojeda-Piedra, S. A., Quintanar-Guerrero, D., Cornejo-Villegas, M. A., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2024). A green method for nanoencapsulation of thymol in chitosan-gelatin with antioxidant capacity. *Food and Bioprocess Technology*, 17(7), 1985-1996.
- Oluoch, G., Matiru, V., Mamati, E. G., & Nyongesa, M. (2021). Nanoencapsulation of thymol and eugenol with chitosan nanoparticles and the effect against *Ralstonia solanacearum*. *Advances in Microbiology*, 11(12), 723-739.
- Pan, K., Zhong, Q. (2016). Organic nanoparticles in foods: Fabrication, characterization, and utilization. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 245-266.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(1), 2-12.

- Parveen, S., Kandwal, A., Rao, C. N., & Kumar, D. V. N. (2023). Green fabrication of titanium dioxide nanoparticles and their antimicrobial and anticancer activities. *Asian Journal of Chemistry*, 35(6), 1315-1319.
- Pasieczna-Patkowska, S., Cichy, M., & Flieger, J. (2025). Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in characterization of green synthesized nanoparticles. *Molecules*, 30(3), 684.
- Pasinszki, T., Krebsz, M., Tung, T. T., & Losic, D. (2017). Carbon nanomaterial based biosensors for non-invasive detection of cancer and disease biomarkers for clinical diagnosis. *Sensors*, 17(8), 1919.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., & Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases. *Oncology Reports*, 33(1), 3-18.
- Peng, Z., Li, S., Han, X., Al-Youbi, A. O., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S., & Leblanc, R. M. (2016). Determination of the composition, encapsulation efficiency and loading capacity in protein drug delivery systems using circular dichroism spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 937, 113-118.
- Qu, Y., & Duan, X. (2013). Progress, challenge and perspective of heterogeneous photocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42(7), 2568-2580.
- Rahimi, N., Pax, R. A., & Gray, E. M. (2016). Review of functional titanium oxides. I: TiO₂ and its modifications. *Progress in Solid State Chemistry*, 44(3), 86-105.
- Rajitha, P., Gopinath, D., Biswas, R., Sabitha, M., & Jayakumar, R. (2016). Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), 1177-1194.
- Rajivgandhi, G., Kadaikunnan, S., Ramachandran, G., Chackaravarthi, G., Chelliah, C. K., Maruthupandy, M., & Li, W. J. (2023). Anti-cancer ability of chitosan nanoparticles loaded plant essential oil evaluated against A549 human lung cancer cells through in vitro approaches. *Journal of King Saud University-Science*, 35(4), 102598.
- Ramacharyulu, P. V. R. K., Prasad, G. K., & Srivastava, A. R. (2015). Synthesis, characterization and photocatalytic activity of Ag-TiO₂ nanoparticulate film. *RSC Advances*, 5(2), 1309-1314.
- Ranjan, S., Dasgupta, N., Mishra, D., & Ramalingam, C. (2020). Involvement of Bcl-2 activation and G1 cell cycle arrest in colon cancer cells induced by titanium dioxide nanoparticles synthesized by microwave-assisted hybrid approach. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 606.

- Raut, A. V., Yadav, H. M., Gnanamani, A., Pushpavanam, S., & Pawar, S. H. (2016). Synthesis and characterization of chitosan-TiO₂: Cu nanocomposite and their enhanced antimicrobial activity with visible light. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *148*, 566-575.
- Rayzah, M., Elderderly, A. Y., Alzerwi, N. A., Alzahrani, B., Alsrhani, A., Alsultan, A., & Mok, P. L. (2023). *Syzygium cumini* (L.) Extract-Derived green titanium dioxide nanoparticles induce caspase-dependent apoptosis in hepatic cancer cells. *Plants*, *12*(18), 3174.
- Riva, M. A. (2025). Karkinos in ancient medicine: More than just fatal cancer. *Cancer*, *131*(3), e35741.
- Rosangkima, G., & Prasad, S. B. (2004). Antitumour activity of some plants from Meghalaya and Mizoram against murine ascites Dalton's lymphoma. *Indian Journal of Experimental Biology*, *42*(10), 981-988.
- Roy, S., Zhai, L., Kim, H. C., Pham, D. H., Alrobei, H., & Kim, J. (2021). Tannic-acid-cross-linked and TiO₂ -nanoparticle-reinforced chitosan-based nanocomposite film. *Polymers*, *13*(2), 228.
- Saadatkah, N., Carillo Garcia, A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., & Chaouki, J. (2020). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis-TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *98*(1), 34-43.
- Sadia, S. I., Shishir, M. K. H., Ahmed, S., Aidid, A. R., Islam, M. M., Rana, M. M., & Alam, M. A. (2024). Crystallographic biography on nanocrystalline phase of polymorphs titanium dioxide (TiO₂): A perspective static review. *South African Journal of Chemical Engineering*, *50*(1), 51-64.
- Salachna, P., & Lopusiewicz, L. (2022). Chitosan oligosaccharide lactate increases productivity and quality of baby leaf *Red perilla*. *Agronomy*, *12*(5), 1182.
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. D. M., Segura-Carretero, A., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, *32*(9), 1688-1706.
- Sallam, M. F., Ahmed, H. M., Diab, K. A., El-Nekeety, A. A., Abdel-Aziem, S. H., Sharaf, H. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2022). Improvement of the antioxidant activity of thyme essential oil against biosynthesized titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative stress, DNA damage, and disturbances in gene expression *in vivo*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *73*, 127024.

- Saravanan, R., Aviles, J., Gracia, F., Mosquera, E., & Gupta, V. K. (2018). Crystallinity and lowering band gap induced visible light photocatalytic activity of TiO₂/CS (Chitosan) nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1239-1245.
- Scarpelli, F., Mastropietro, T. F., Poerio, T., & Godbert, N. (2018). Mesoporous TiO₂ thin films: State of the art. *Titanium Dioxide-Material for a Sustainable Environment*, *508*(1), 135-142.
- Scudiero, D., Shoemaker, R., Paull, K., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T., Currens, M., Seniff, D., & Boyd, M. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, *48* 17, 4827-33.
- Sedky, N. K., Mahdy, N. K., Abdel-Kader, N. M., Abdelhady, M. M., Maged, M., Allam, A. L., & Fahmy, S. A. (2024). Facile sonochemically-assisted bioengineering of titanium dioxide nanoparticles and deciphering their potential in treating breast and lung cancers: biological, molecular, and computational-based investigations. *RSC Advances*, *14*(12), 8583-8601.
- Shand, M., & Anderson, J. A. (2013). Aqueous phase photocatalytic nitrate destruction using titania based materials: routes to enhanced performance and prospects for visible light activation. *Catalysis Science & Technology*, *3*(4), 879-899.
- Shemona, A. M. G., Kanagaprabha, S., Johnson Jeyakumar, H., & Vathana, S. A. (2024). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using *Piper longum* leaf extract: Morphological, optical and antibacterial characterization. In *Materials Science Forum*, *1143*, 73-88. New York: Trans Tech Publications Ltd.
- Shen, C., Wu, M., Sun, C., Li, J., Wu, D., Sun, C., & Chen, K. (2022). Chitosan/PCL nanofibrous films developed by SBS to encapsulate thymol/HPβCD inclusion complexes for fruit packaging. *Carbohydrate Polymers*, *286*, 119267.
- Sheorain, J., Mehra, M., Thakur, R., Grewal, S., & Kumari, S. (2019). *In vitro* anti-inflammatory and antioxidant potential of thymol loaded bipolymeric (tragacanth gum/chitosan) nanocarrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, *125*, 1069-1074.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, *78*, 34-60.

- Shukla, R., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro*, 25, 231-241.
- Sreelatha, S., Kumar, N., Yin, T. S., & Rajani, S. (2022). Evaluating the antibacterial activity and mode of action of thymol-loaded chitosan nanoparticles against plant bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 792737.
- Sucharitha, A., & Bhuvana, D. (2023). An overview of cancer. *Advances in Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1(1), 1-8.
- Suganya, V., & Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and nanoencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 233-239.
- Şeker, T. (2023). *Harici manyetik alan kontrollü nanoyapılı ilaç hedeflendirme taşıyıcısı tasarımı ve uygulamaları* (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 807258).
- Thippeswamy, B. H., Maligi, A. S., & Hegde, G. (2021). Roadmap of effects of biowaste-synthesized carbon nanomaterials on carbon nano-reinforced composites. *Catalysts*, 11(12), 1485.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., & Schiestl, R. H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Research*, 69(22), 8784-8789.
- Unnikrishnan, G., Joy, A., Megha, M., Kolanthai, E., & Senthilkumar, M. (2023). Exploration of inorganic nanoparticles for revolutionary drug delivery applications: A critical review. *Discover Nano*, 18(1), 157.
- Vigneshwaran, R., Ezhilarasan, D., & Rajeshkumar, S. (2021). Inorganic titanium dioxide nanoparticles induces cytotoxicity in colon cancer cells. *Inorganic Chemistry Communications*, 133, 108920.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799.
- Wadowska, K., Bil-Lula, I., Trembecki, Ł., & Śliwińska-Mossoń, M. (2020). Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4569.
- Waheed, M., Hussain, M. B., Saeed, F., Afzaal, M., Ahmed, A., Irfan, R., & Hailu, G. G. (2024). Phytochemical profiling and therapeutic potential of thyme (*Thymus spp.*): A medicinal herb. *Food Science & Nutrition*, 12(12), 9893-9912.

- Wang, X., Hu, Y., Zhang, Z., & Zhang, B. (2022). The application of thymol-loaded chitosan nanoparticles to control the biodeterioration of cultural heritage sites. *Journal of Cultural Heritage*, 53, 206-211.
- Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., & Liu, Q. (2015). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 5519-5530.
- Wen, Y., Zhu, Y., Zhang, C., Yang, X., Gao, Y., Li, M., & Tang, H. (2022). Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1040163.
- Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Toxicology*, 166(1-2), 3-10.
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., & Zeng, F. D. (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters*, 191(1), 1-8.
- Xing, Y., Li, X., Guo, X., Li, W., Chen, J., Liu, Q., & Bi, X. (2020). Effects of different TiO₂ nanoparticles concentrations on the physical and antibacterial activities of chitosan-based coating film. *Nanomaterials*, 10(7), 1365.
- Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Narita, T., Kanehira, K., Sonezaki, S., Kudo, N., & Houkin, K. (2011). Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 1197-1204.
- Yıldız, Ş., & Turan, S. (2021). Timokinon, timol ve karvakrolün antioksidan aktiviteleri ve lipid oksidasyonunu önleme kapasiteleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 52(1), 108-118.
- Yılmaz, E., & Altunok, V. (2011). Kanser ve p53 geni. *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1, 19-23.
- Yokota, J., & Kohno, T. (2004). Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Science*, 95(3), 197-204.
- You, J., Meng, L., Song, T. B., Guo, T. F., Yang, Y., Chang, W. H., & Yang, Y. (2016). Improved air stability of perovskite solar cells via solution-processed metal oxide transport layers. *Nature Nanotechnology*, 11(1), 75-81.
- Yuan, X., Zhang, X., Sun, L., Wei, Y., Wei, X. (2019). Cellular toxicity and immunological effects of carbon-based nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 1-27.

- Yue, N. N., Xu, H. M., Xu, J., Zhu, M. Z., Zhang, Y., Tian, C. M., Wang, L. S. (2023). Application of Nanoparticles in the Diagnosis of Gastrointestinal Diseases: A Complete Future Perspective. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 4143–4170.
- Zhang, J., IJzerman, M. J., Oberoi, J., Karnchanachari, N., Bergin, R. J., Franchini, F., & Emery, J. D. (2022). Time to diagnosis and treatment of lung cancer: A systematic overview of risk factors, interventions and impact on patient outcomes. *Lung Cancer*, 166, 27-39.
- Zhang, X., Li, W., Yang, Z. (2015). Toxicology of nanosized titanium dioxide: An update. *Archives of Toxicology*, 89, 2207-2217.
- Zhao, B., Lin, H., Jiang, X., Li, W., Gao, Y., Li, M., & Gao, J. (2024). Exosome-like nanoparticles derived from fruits, vegetables, and herbs: innovative strategies of therapeutic and drug delivery. *Theranostics*, 14(12), 4598.
- Zhao, C. (2023). Cell culture: *In vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. *Journal of Histotechnology*, 46(1), 1-4.
- Zhao, J., Bowman, L., Zhang, X., Vallyathan, V., Young, S. H., Castranova, V., & Ding, M. (2009). Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(19), 1141-1149.
- Zhong, Y., Meng, F., Deng, C., & Zhong, Z. (2014). Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules*, 15(6), 1955-1969.
- Zuher, G., Aziz, W. J., & Sabry, R. S. (2022). Producing hydrogen energy using Cr₂O₃- TiO₂ nanocomposite with animal (chitosan) extract via photocatalysis. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Sciences*, 35(4), 83-93.
- Zuidam, N. J., & Nedovic, V. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (Vol. 410). New York, NY, USA: Springer.

EKLER

Ek 1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Altun Çolak, D., **Kaya, H.**, & Atıcı, T. (2024). Sorafenib ve Yalancı portakal ekstresi kombinasyonunun A549 hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve antioksidan aktivitesi. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(2), 151-156.

Kaya, H., Altun Çolak, D. (2024). Current Approaches To 3D Cell Culture Systems, *Current Studies in Molecular Biology and Genetics*. Livre de Lyon, 1. Baskı, pp. 24.