

**ANTİKOR TAŞIYAN NANOPARTİKÜLLER KULLANARAK
HİPERTERMİ İLE TÜMÖR DOKUSUNUN TEDAVİSİ**

**TREATMENT OF TUMOR TISSUE WITH HYPERTHERMIA
USING ANTIBODY-CARRYING NANOPARTICLES**

REZA DIDARIAN

PROF. DR. İBRAHİM VARGEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

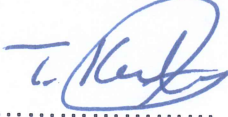
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

REZA DİDARİAN'nın hazırladığı "Antikor Taşıyan Nanopartiküller Kullanarak Hipertermi ile Tümör Dokusunun Tedavisi" adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin KUTSAL


Başkan



.....

Prof. Dr. İbrahim VARGEL

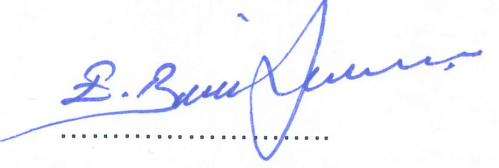
Danışman



.....

Prof. Dr. Emir BAKİ DENKBAŞ


Üye



.....

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

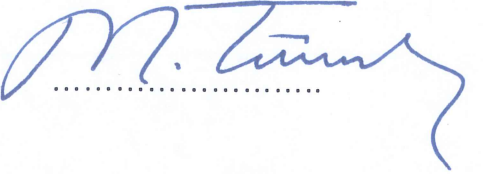
Üye



.....

Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Üye



.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17.07.2017

Reza DIDARIAN

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)


- Tezimin/Raporumun 30.12.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

21 / 07 / 2017


(İmza)
Reza DIDARIAN

ÖZET

ANTİKOR TAŞIYAN NANOPARTİKÜLLER KULLANARAK HİPERTERMİ İLE TÜMÖR DOKUSUNUN TEDAVİSİ

Reza DIDARIAN

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Temmuz 2017, 77 sayfa

Son zamanlarda kanser hastalığı nedeniyle ölüm sayısının artmasından dolayı, bu hastalık insanlığın en önemli hastalıklarından birisi haline gelmiştir. Kanser tedavisindeki ilerlemelere rağmen bu hastalıkta % 100 tedavi sağlanmamaktadır ve mevcut tedavi yöntemlerinin birçok yan etkilerinin olduğu tespit edilmektedir. Açıklanan nedenlerden dolayı araştırmacılar var olan tedavi yöntemlerini geliştirmek ve yeni yöntemler bulmak için arama çalışmaları yapmaktadır. Son dönemlerde kullanılan alternatif yöntemlerden biri hipertermi tedavisidir. Hipertermi tekniği için farklı enerji kaynakları ve farklı nanopartiküller kullanılmaktadır.

Sunulan tez kapsamında radyo frekans hipertermi yardımıyla kanser (tümör dokusu) tedavisi araştırılmıştır. RF hiperterminin sağlanması için manyetik özellikli nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kanserli hücreleri yok etmek için akıllı inorganik nanopartiküller tasarlayıp, RF kullanarak hipertermi üretmektir. Bu amaçla ilk olarak manyetit nanopartiküller ikili çökeltme yöntemi ile 10-15 nm boyutunda sentezlenmiştir. Bu süperparamanyetit nanoparçacıklar, daha sonra manyetik özelliklerini kaybetmeden altın iyonları ile kaplanmıştır. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boyutu 20-30 nm civarında oldu, dolayısıyla altın kaplamanın kalınlığı yaklaşık 5-10 nm olarak tespit edilmiştir. Sentezlenen manyetit ve altın kaplı manyetit nanopartiküller zeta-sizer, zeta potansiyel, FTIR, TEM ve VSM kullanılarak karakterize edilmiştir.

Tez çalışmasının diğer aşamasında kanserli hücrelerin reseptörüne (MCF-7 meme kanseri hücreleri) spesifik olarak bağlanan antikoru (MONOCLONAL ANTI-N CAM Clone NCAM-OB11) sentezlenen nanopartiküllere immobilize etmek için altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Sisteamin molekülü (bir ucunda –SH ve diğer ucunda –NH₂ grubu) kendiliğinden yerleşen tek tabaka (SAMs) oluşturmak için kullanılmıştır. Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortalama boyutları 25-35 nm arasında olarak elde edilip, monoklonal antikor EDC/NHS yöntemi ile immobilize edilmiştir.

Daha sonra anten modüllü RF jeneratörü (144.015 MHz) RF hipertermi aşamaları için kombine edilmiştir. Antikor-nanopartikül bağlanma oranı ve sitotoksitesite testi yapıp, in-vitro ve in-vivo deneyleri yapılmıştır.

İn-vitro çalışmalarında, antikor-nanopartikül bağlanma oranı ve MTT testinden elde edilen sonuçlara göre 20 µg/ml nanopartikül konsantrasyonu kullanılmıştır. Radyo frekans hipertermi (144.015 MHz, 120 W, 50 dk.) sonucu MCF-7 hücrelerinde % 58.7 apoptoz ve % 14.88 nekroz gözlenmiştir.

İn-vitro aşamasından sonra hayvan deneyleri yapılmıştır. Bunun için ilk olarak nude farelerde tümör oluşturulmuştur. Daha sonra sentezlenen antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller 2 farklı yolla (intra tümör ve intra venöz) farelere enjekte edilip MRI görüntüsü alınmıştır. Çalışmanın devamında RF hipertermisi (144.015 MHz, 120 W, 50 dk.) uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra üçüncü haftanın sonunda intra venöz şeklinde tedavi edilen farelerin tümör boyutlarında yaklaşık %34 ve intra venöz gurubundaki farelerin tümör boyutlarında ise yaklaşık % 53 küçülme kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, MCF-7 hücre hattı, Altın kaplı manyetit nanopartikül, RF hipertermi, MRI, Apoptoz, Nekroz.

ABSTRACT

Treatment of Tumor Tissue with Hyperthermia Using Antibody-Carrying Nanoparticles

Reza DIDARIAN

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

July 2017, 77 pages

The number of deaths due to cancer has been increasing so this disease has become one of the most important diseases of mankind. Despite the advances in cancer treatment, there isn't 100 % treatment for this disease and there are many side effects of current treatment methods. For these reasons, researchers are exploring ways to improve existing treatment methods and find new methods. One of the alternative methods used in cancer therapy is hyperthermia treatment. Different energy sources and different nanoparticles are used for hyperthermia technique.

In the presented thesis, cancer therapy is investigated with the help of radiofrequency (RF) hyperthermia. Magnetite nanoparticles are used to provide RF hyperthermia. In the other words, the aim of this thesis is to design intelligent inorganic nanoparticles and destroy cancerous cells using RF hyperthermia. For this purpose, firstly magnetite nanoparticles were synthesized by co-precipitation method (10-15 nm). These superparamagnetic nanoparticles were covered with gold ions without losing their magnetic properties. The size of the gold coated magnetite nanoparticles was around 20-30 nm, so the thickness of the gold coating was about 5-10 nm. Magnetic and gold coated magnetic nanoparticles were characterized with Zetapals, FTIR, TEM and VSM.

In another step of the thesis work, the surface modification of the gold-coated magnetic nanoparticles was performed. The cysteamine (2-Aminoethanethiol) molecule was used to create a self-assembled monolayers (SAMs). After that

monoclonal antibody (MONOCLONAL ANTI-N CAM Clone NCAM-OB11) was immobilized by the EDC / NHS method. The average size of cysteamine functionalized-gold-coated magnetic nanoparticles was between 25 and 35 nm.

Then the antenna RF system (144.015 MHz) was contrived for RF hyperthermia. Antibody-nanoparticle binding rate and cytotoxicity test were performed and after that in-vitro and in-vivo experiments were done.

In in-vitro studies, a concentration of 20 µg/ml nanoparticle was used according to the results obtained from the antibody-nanoparticle binding rate and the MTT assay. In MCF-7 cells, 58.7 % apoptosis and 14.88 % necrosis were observed in the radiofrequency hyperthermia (144.015 MHz, 120 W, 50 min).

Animal experiments were done after the in-vitro step. For this step, tumor were formed in nude mice. Then the antibody immobilized/gold-coated magnetic nanoparticles were injected into the mice in 2 different ways (Intra-tumor and Intra-venous) and MRI image was taken. RF hyperthermia (144.015 MHz, 120 W, 50 min) was applied in continuation of the research. At the end of the third week after this phase, approximately 34% decreased in the tumor sizes of the intravenously treated mice groups and 53% reduced in the tumor sizes of the intravenously cured mice groups.

Keywords: Cancer, MCF-7 cell line, Gold-coated magnetic nanoparticles, RF hyperthermia, Magnetic Resonance Imaging (MRI), Apoptosis, Necrosis.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, değerli hocam **Prof. Dr. İBRAHİM VARGEL'e**, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleri ile bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesini sağlayan, eski danışmanım değerli hocam **Prof. Dr. ERHAN BİŞKİN'e**

Tez çalışmaları boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve laboratuvarlarının kapılarını her zaman sonuna kadar açan sayın hocam **Prof. Dr. Tülin KUTSAL'a**

Beni grubuna kabul ederek tez çalışmalarımın in-vivo kısmının yürütülmesi için gerekli tüm desteği bana sağlayan, Nankai Üniversitesindeki değerli hocam **Prof. Dr. Deling KONG'a**

Beni grubuna kabul ederek tez çalışmalarımın in-vivo kısmının tekrarlanması için olanak sağlayan, Urmia Üniversitesindeki sevgili ve çok değerli hocam **Doç. Dr. MEHDI MAHMOUDIAN'a**

Tez izleme komitesinde olup bana kapılarını sonuna kadar açan sayın **Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e**

Tez savunma jürimde olup, aslında beni bu anabilim dalında doktora yapmak için teşvik eden sevgili hocam **Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a**

Tez savunma jürimde olup bana zaman ayıran sayın **Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK'a**

Hayatım boyunca beni gönülden destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili aileme

Gerektiğinde her zaman yardımcı olan arkadaşım Mehdi Tayybi Azar'a

Sonsuz Teşekkürlerimle.....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER ve KISATMALAR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser ve Tedavi Yöntemleri	3
2.1.1. Cerrahi Yöntemi.....	3
2.1.2. Radyasyon Tedavisi	4
2.1.3. Kemoterapi	4
2.1.4. Nanoteknoloji ve Kanser Tedavi Yaklaşımı.....	5
2.1.5. Kanser İstatistikleri.....	7
2.1.6. Hipertermi ile Kanser Tedavisi	8
2.2. Radyofrekans (RF) Hipertermi.....	9
2.3. Manyetit Nanopartiküller ve Manyetizma.....	11
2.3.1. Manyetizma	11
2.3.2. Manyetit Nanopartiküllerin Avantajları ve kullanım Alanları	12
2.3.3. Manyetit Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	13
2.4. Altın ve Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküller.....	13
2.5. Monoklonal Antikor	15
2.6. Monoklonal Antikorların Uygulamaları.....	16
2.7. Tez Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	17

2.7.1. Zetapals	17
2.7.2. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR)	17
2.7.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	18
2.7.4. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI).....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	20
3.1. Kimyasallar.....	20
3.2. Cihazlar.....	21
3.3. Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu.....	22
3.3.1. Manyetit Nanopartikül Sentezi	22
3.3.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Sentezi	23
3.3.3. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu (Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Sentezi).....	25
3.4. Antikor İmmobilizasyonu ve Nanopartiküllerin Sitotoksosite Testi	26
3.4.1. Nanopartiküllerin Üzerine Antikor İmmobilizasyonu	26
3.4.2. Nanopartiküllerin Sitotoksosite Testleri	27
3.5. İn-vitro ve Hayvan Model (İn-vivo) Çalışmaları.....	28
3.5.1. Hücre Kültürü Çalışmaları (İn-vitro Deneyleri).....	28
3.5.2. Hipertermi Tedavisinde Kullanılan RF' in Kuruluşu.....	30
3.5.3. Hayvan Model Çalışmaları (İn-vivo Deneyleri).....	30
3.5.4. Histopatoloji Değerlendirme.....	32
4. DENEYSEL BULGULAR	34
4.1. Sentezlenen Nanopartiküllerin Boyut Analizi.....	34
4.1.1. Manyetit Nanopartiküllerin Boyut Analizi (Zeta-sizer).....	34
4.1.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Hidrodinamik Çap Ölçümü.....	35
4.1.3. Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Boyut Analizi....	35
4.2. Sentezlenen Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi	36
4.3. Nanopartiküllerin FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopi) Analizi	38

4.3.1. Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi	38
4.3.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi	39
4.3.3. Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi	40
4.3.4. Antikor İmmobilizasyonulu Nanopartiküllerin FTIR Analizi	40
4.4. Titreşimli Manyetometre ile Nanopartiküllerin Doygunluk Mıknatıslığı Analizi	41
4.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskop) Analizi	42
4.5.1. Manyetit Nanopartiküllerin TEM Analizi	42
4.5.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin TEM Analizi	43
4.6. Ninhydrin Test Analizi	44
4.7. Monoklonal Antikor-Nanopartikül Bağlanma Oranı	44
4.8. Sitotoksosite Testi	45
4.9. İn-vitro Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar	46
4.10. İn-vivo Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar	51
4.10.1. Nanopartikül Enjekte Edilen Farelere Radyo Frekans Uygulama	55
4.10.2. Tümörlerin Tedavi sonrası Histopatoloji Değerlendirmesi	60
5. SONUÇLAR	64
6. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 4.1 Sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel sonuçları....	38
Çizelge 4.2 Antikor-Nanopartikül bağlanma oranı.....	44
Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyondaki nanopartikül ve antikor bağlı nanopartiküllerin sitotoksosite test sonuçları.....	45
Çizelge 4.4 Kontrol grubunda apoptoz ve nekroz oranı.....	47
Çizelge 4.5 Altın kaplı manyetit nanopartikül grubunda apoptoz ve nekroz oranı..	48
Çizelge 4.6 Antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartiküllerin apoptoz ve nekroz oranı.....	49
Çizelge 4.7 Antikor bağlı nanopartiküller ile MCF-7 hücreler etkileşimine RF uygulandıktan sonra elde edilen apoptoz ve nekroz oranı.....	50
Çizelge 4.8 İntra venöz grubunda tümör boyutunda küçülme miktarı.....	57
Çizelge 4.9 İntra tümör grubundaki farelerin tümör boyutlarında küçülme miktarı..	58

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1 Dünya çapında kanser ile diğer ölüm nedenlerinin karşılaştırılması, 2012 [2].....	7
Şekil 2.2 Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen kanserlerin yüzde dağılımları [38].....	8
Şekil 2.3 Hipertermi tekniklerinin farklı enerji yöntemlerinin şematik görüntüsü.....	9
Şekil 2.4 Radyofrekans dalgalarının penetrasyon grafiği.....	10
Şekil 2.5 Altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulaması [106].....	14
Şekil 3.1 Manyetit Nanopartikül Sentezi için Deney Düzenegi. (1) Vana; (2) Termokupl; (3) Demir ve NaOH çözeltisi için besleme ağzı; (4) Reaktör; (5) Mekanik karıştırıcı; (6) Su banyosu ve (7) Elektrikli ısıtıcı.....	22
Şekil 3.2 Altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi.....	24
Şekil 3.3 Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi.....	25
Şekil 3.4 Sisteamin fonksiyonalize altın kaplı manyetit nanopartiküllere antikor immobilizasyonu.....	26
Şekil 3.5 Anten modülü RF (Laboratuvarda Tasarladığımız).....	30
Şekil 3.6. Nude farelerin beslenme ortamı ve tümör büyüme aşamasının değerlendirilmesi.....	31
Şekil 3.7. Dokunun histopatoloji testi ve değerlendirme aşamaları.....	33
Şekil 4.1 Zetapals cihazında ölçülen manyetit nanopartiküllerin boyutu.....	34
Şekil 4.2 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boy dağılımı (zeta-sizer).....	35
Şekil 4.3 Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta-sizer analizi..	36
Şekil 4.4 Manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri (mv).....	36
Şekil 4.5 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi.....	37
Şekil 4.6 Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi.....	37

Şekil 4.7 Manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi.....	39
Şekil 4.8 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi.....	39
Şekil 4.9 2-aminoethantiyol bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi.....	40
Şekil 4.10 Antikor immobilizasyonulu altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi.....	41
Şekil 4.11 Fe ₃ O ₄ ve Au@SPIONs nanopartiküllerin mıknatıslık eğrileri.....	42
Şekil 4.12 Manyetit nanopartiküllerin TEM analizi.....	43
Şekil 4.13 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM analizi.....	43
Şekil 4.14 Antikor-Nanopartikül bağlanma oranı.....	45
Şekil 4.15 Sitotoksisite test sonuçları.....	46
Şekil 4.16 MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopta DAPI filtresi (a,b) ve FITC (480-520 nm dalga boyu)(c) kullanılarak çekilen fotoğrafları.....	47
Şekil 4.17 Altın kaplı nanopartiküllerin(20 µg/ml) MCF-7 hücreleriyle etkileşimini gösteren fotoğraflar; (a,b) DAPI filtresi ve (c) FITC (480-520 nm dalga boyu).....	48
Şekil 4.18 Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller (20 µg/ml) ile MCF-7 hücrelerin etkileşimlerinin RF'den önce fotoğrafları; (a,b) DAPI filtresi ve (c) FITC (480-520 nm dalga boyu).....	49
Şekil 4.19 Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller (20 µg/ml) ile MCF-7 hücrelerin etkileşimlerinin RF'den sonra fotoğrafları; (a,b) DAPI filtresi ve (c,d) FITC (480-520 nm dalga boyu).....	50
Şekil 4.20 Hücre kültürü deneylerinden elde edilen sonuçlar.....	51
Şekil 4.21 İntra venöz grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a)Enjekteden hemen sonra b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra.....	52

Şekil 4.22 İntra venöz grubunun kontrol grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü. a) Enjekteden hemen önce b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra.....53

Şekil 4.23 İntra tümör grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a)Enjekteden hemen sonra b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra.....54

Şekil 4.24 İntra tümör grubunun kontrol grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü. a) Enjekteden hemen önce b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra.....55

Şekil 4.25 İntra venöz enjeksiyon grubunun RF uygulamasından sonra MRI görüntülemesi a) bir hafta sonra b) 2 hafta sonra c) 3 hafta sonra.....56

Şekil 4.26 İntra tümör enjeksiyon grubunun RF uygulamasından sonra MRI görüntülemesi a) Bir hafta sonra b) 2 hafta sonra c) 3 hafta sonra.....56

Şekil 4.27 RF uygulama sonrası intra venöz grubun verileri.....57

Şekil 4.28 Radyo frekans hipertermi sonrası intra tümör gurubu verileri.....58

Şekil 4.29 RF uygulama sonrası farelerin fotoğrafı a) İntra tümör grubu RF'den hemen sonra b) İntra tümör grubu RF'den 1 hafta sonra c) İntra tümör grubu RF'den 3 hafta sonra59

Şekil 4.30 RF uygulama sonrası farelerin fotoğrafı a) İntra venöz grubu RF'den hemen sonra b) İntra venöz grubu RF'den 1 hafta sonra c) İntra venöz grubu RF'den 3 hafta sonra.....59

Şekil 4.31 Kontrol grupları farelerin fotoğrafı a) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan hemen sonra b) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 1 hafta sonra c) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 3 hafta sonra d) 2. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan hemen sonra e) 2. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 3 hafta sonra.....60

Şekil 4.32 Mikrotom Cihazı.....	61
Şekil 4.33 Kontrol grupların histopatoloji mikroskopik görüntüleri.....	61
Şekil 4.34 RF hipertermi tedavi sonrası tümörlerin histopatoloji mikroskopik görüntüleri (a,b intra tümör grubu ve c,d intra venöz grubu).....	62

SİMGELER ve KISATMALAR

Kısaltmalar

3T3	Standart fibroblast hücreler
Au@SPIONs	Altın kaplı manyetit nanopartikül
CT	Bilgisayarlı tomografi
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
mAb	Monoklonal antikor
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
NHS	N-hydroxysuccinimide
RF	Radyofrekans
SAMs	Kendiliğinden yerleşen tek tabakalar
SAR	Spesifik absorpsiyon oranı
SPIONs	Manyetit nanopartikül
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
THz	Terahertz
VSM	Titreşimli örnek manyetometre

1. GİRİŞ

İnsan vücudu milyarlarca hücreden oluşmaktadır ve bir insanın sağlıklı olması için, bu hücrelerin belli bir programla beraber çalışmaları gerekmektedir. Vücuttaki tüm hücrelerin belli bir görevi bulunmaktadır ve normal hücreler belli bir programa bağlı olarak büyürler, bölünürler, çoğalırlar ve ölürler. Bazen bu hücrelerden biri program dışı şekilde büyümeye ve bölünmeye başlar ve böylece kanser oluşur. Kanser vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir ve böylece ortaya çıktığı yerde organların normal çalışmasına engel olur. [1]

Günümüzde kanser insanlığın en önemli hastalıklarından birisidir ki son zamanlarda sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle de bir sağlık problemi haline gelmiştir. Kanada Kanser Topluluğu'nun 2011 yılında yayınladığı dünya çapında ölüm nedenlerinin istatistikleri isimli makalede insanların ölüm nedeninin birinci sırasında kanser hastalığı % 29.9 ve ikinci sırasında ise kardiyovasküler hastalıkları % 19.7 ile yer almaktadır [2]. Bu nedenle kanseri tedavi etmek çok önemlidir. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kanserin yaygın olan tedavi yöntemleridir ancak bu yöntemlerin yan etkileri ve tüm hastalarda yüzde yüz tedavi edilmemesinden dolayı araştırmacılar yeni yöntemlerin geliştirilmesine devam ediyorlar. Bu yöntemlerden biri, tedavide hedeflendirilmiş moleküller kullanmaktır. Hedeflendirilmiş moleküller sayesinde hem kanserin erken tanısı hem az miktarda etkin madde ile tedavi hem de sağlıklı hücrelerin etkilenme riskinin azalması mümkündür.

Nanoteknoloji ve nanotıp alanında kanserin tanı ve tedavisi en çok çalışılan konulardan biridir. Kanser araştırmalarında farklı yöntemler ile kanserli hücreler hedeflenerek tümörün teşhisi ve yok edilmesi planlanmaktadır. Bunun için birçok nano yapı kullanılmaktadır. Manyetit, altın ve altın kaplı manyetit nanopartiküller bu nano yapılardan bir kaçıdır. Tümörlerin tedavisinde ısı enerjisinin uygulanması ilk kez milattan önce 1700 yılında kullanılmıştır [3, 4]. Isı ile kanseri yok etme yöntemi, hipertermi olarak adlandırılmaktadır. Hipertermi'de tümör bölgesinin fizyolojik sıcaklığını (37 °C) bir kaç derece üste (~40-45 °C) çıkararak kanserli hücrelerin gerilimi ve ölümüne neden olur [5, 6]. Lazer, elektromanyetik spektrumu (RF), ultrason alternatif manyetik alan (AMF), vb. hipertermi enerji kaynağı modalitelerinden bir kaçıdır. İlk olarak 1957'de Gilchrist ve arkadaşları tarafından

radıofrekans dalgaları sayesinde demir oksit manyetit nanopartiküllerin varlığında ısı enerjisinin oluşturulması rapor edilmiştir [7].

Nanotıp alanında kullanılan nano yapılardan ilk FDA onayı alanlar lipozomlar ve misellerdir ki ilaç taşınmasında kullanılmaktadır. Radyofrekans (RF) hipertermi tedavi yönteminde manyetit, altın kaplı manyetit ve gümüş kaplı manyetit nanopartiküller kullanılır. Radyofrekans hipertermi için kullanılan nanopartiküller mutlaka manyetit özelliğinin olması gerekmektedir. Söz konusu biyolojik bir insan vücudu olduğunda, nanoparçacıkların boyutu, morfolojisi vücutta kalma süresi, toksik olup olmaması ve vücuttan atılması tıbbi uygulamada kritik faktörler olarak düşünülmektedir. Kanser tedavisinde de nanoyapıların boyutları önemli faktörlerdendir. 8 nm'den küçük nanopartiküller vücudun böbrek temizleme mekanizması tarafından atılır, bunun için nanoparçacıkların boyut dağılımı tıbbi uygulamalarda tartışılmaktadır [8]. Kolay modifikasyon yöntemleri ile nanopartiküller ekstra kararlılık ve biyoyumluluk kazanır (Örneğin: PEG vb.) ve kan dolaşımı sistemindeki kalıcılık süreleri arttırılabilir. Bu sayede tıbbi müdahalede, birkaç seans teşhis veya tedavi maddesi kullanılmadan işlem devam edebilir.

Sunulan tez kapsamında, ilk olarak manyetit nanopartiküller sentezlenmiş, daha sonra altın ile kaplanmış ve FTIR, VSM ve TEM gibi yöntemler ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllere monoklonal antikor (Tümör hücrelerinin üzerindeki reseptörlere bağlanan) immobilize edilip karakterize ve sitotoksikite testleri yapılmıştır. Daha sonra in-vitro ve in-vivo deneylerinde RF hipertermi kullanılarak tümör tedavisi yapılmış sonuçlar ikili apoptoz-nekroz boyama yöntemi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, kontrolsüz büyümesi ve anormal hücre yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Kanser, vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir ve böylece ortaya çıktığı yerde organların normal çalışmasına engel olur [9].

Vücutta kanser oluşması hem dış hem de iç etkenlere bağlıdır.

- Dış etkenler: tütün, kimyasallar, radyasyon ve bulaşıcı organizmalar
- İç faktörler: kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, metabolizmadan meydana gelen mutasyonlar, bağışıklık koşulları.

Kanserin klinik belirtileri, gelişimi ve sonucu (tedavi açısından) bir hastadan diğerine değişmektedir. Kanserin moleküler temeli, DNA dizisindeki mutasyondan meydana gelen düzensiz ve kontrolsüz hücre çoğalmasına dayanmaktadır [10, 11].

Cerrahi, Radyoterapi ve Kemoterapi kanser hastalıklarında yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleridir. Daha az sıklıkla hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılır. Bu tedavi yöntemleri tek başına veya birlikte uygulanmaktadır.

2.1.1. Cerrahi Yöntemi

Cerrahi, kanserli dokunun vücuttan çıkartılmasıdır. Pek çok kanserde cerrahi tedavi uygulanan ilk yöntemdir ve bazı kanserlerde cerrahi tedavi ile şifa sağlanabilir, ama doktorlar bile cerrahi sonrası kanserin tekrar geri dönüş ihtimalini çok iyi bilmektedirler. Cerrahi yöntemi aynı zamanda tanının doğrulanması (biyopsi), evreleme (Evreleme kanserin nerede yerleştiğinin, nerelere yayıldığının ya da vücutta diğer organların etkilenip etkilenmediğinin tanımlanmasıdır), yan etkilerin ve ağrının azaltılmasında kullanılan bir tedavi yöntemidir.

Anestezi 1846'da icat edildikten sonra, Billroth, Handley ve Halsted adlı cerrahlar lenf bezecikleri ile birlikte tümörün tamamını kaldırarak kanser operasyonları başlattılar. Daha sonra Paget adlı cerrah, kanser hücrelerinin kan dolaşımı yoluyla primer tümörden diğer yerlere yayılım gösterdiğini rapor etmiştir (metastaz). Kanser

yayılım mekanizmalarını anlamak, kanser cerrahisinin sınırlamalarını tanımada önemli bir unsur haline geldi [12, 13].

Tümörlerin tedavisinde cerrahi yönteminin bazı dezavantajları aşağıda verilmektedir:

- a. Anesteziden kaynaklanan ölüm riski
- b. Cerrahiden sonra bakım süresinin uzun olması
- c. Kanser hücrelerinin başka dokulara yayılması ve sonuç olarak tümörün tamamı ile yok edilmemesi [14]

2.1.2. Radyasyon Tedavisi

Radyasyon tedavisi veya daha bilinen adıyla radyoterapi, iyonlaştırıcı ışın kullanarak kanser hastalığının tedavisidir. Radyoterapide hedef tümörlü dokunun yok edilmesi ve bu sırada da normal dokuların korunmasıdır. Radyoterapi kanser tedavisinde tek başına ya da cerrahi ve/veya kemoterapi ile birlikte kullanılmaktadır. 1896 yılında Röntgenin X-ışını keşfedildikten 3 yıl sonra, radyasyon, kanser tanısı ve tedavisinde kullanıldı. 20. yüzyılın başlarında, araştırmacılar, radyasyonun kansere neden olduğu kadar, onu tedavi edebileceğini de keşfettiler [12].

Radyasyon tedavisinin yan etkileri hastadan hastaya değişmektedir. Bazı yan etkiler; Bulantı ve kusma, Ödem, Saç dökülmesi, Epitelyum yüzeylerin zarar görmesi, Fibröz, Lenfodem, Üreme üzerine yan etkiler, solunum sistemi üzerine yan etkiler ve Hipofiz sistemi üzerine yan etkiler [15, 16].

2.1.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini yok etmek veya bu hücrelerin büyümesini kontrol altına almak için anti kanser ilaçlar kullanılarak yapılan tedavidir. Kemoterapi ilaçlarının her zaman istenilen faydayı sağlaması mümkün olmayabilir. 20. yüzyılın son on yılında, cerrahlar cerrahiye kemoterapi ve / veya radyasyonla birleştirerek kanser tedavisi için yeni yöntemler geliştirdiler. Birçok kemoterapi ilaçlarının kullanımı, birçok kanser türünün başarılı bir şekilde tedavi edilmesine neden olmuştur. Ancak Kemoterapinin yan etkilerini azaltmak için yeni yaklaşımlar halen araştırılmaktadır [12, 17].

Kemoterapinin bazı yan etkileri aşağıda verilmektedir:

- a. Anemi ve hematolojik sorunlar
- b. Kabızlık, ishal, bulantı ve kusma
- c. İştahsızlık ve kilo kaybı
- d. Saç dökülmesi
- e. Letarji ve yorgunluk hisleri
- f. Ağız ve boğaz kuruması
- g. Aşırı ağrı
- h. Bağışıklık sistem sorunları [18, 19]

2.1.4. Nanoteknoloji ve Kanseri Tedavi Yaklaşımı

Nanoteknoloji; biyoloji, kimya, fizik, mühendislik ve tıp alanlarını birbirine bağlayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Nanoteknoloji, atomik ve moleküler bileşenleri kullanarak malzemelerin mühendisliği ve üretimidir (1-1000 nanometre) ve tıbbın her dalına özellikle Onkoloji'ye fayda sağlayacaktır [20, 21].

Malzemelerin nano seviyedeki özellikleri, bunların normal özellikleri ile çok farklıdır. Diğer bir deyişle yapıların nano düzeyde olmaları, onlara mekaniksel, fiziksel, elektriksel ve optik özelliklerinde üstün bir yükselişe neden olur [22-24]. Nanoyapıların boyut farklılığına, morfolojisine ve kullanım alanlarına bağlı olarak farklı hazırlama ve sentez reaksiyonları gereklidir. Son yıllarda nanoteknolojinin en kapsamlı alanı tıbbi teşhis ve tedavi platformlarıdır [25].

Kanseri tanımlayıcı özelliklerinden biri, normal sınırlarının ötesinde büyüyen ve metastaz olarak adlandırılan bir aşama ile vücudun bitişik bölümlerini istila edebilen ve diğer organlara yayılabilen, anormal hücrelerin hızla oluşmasıdır. Metastaz, kanserden ölümlerin en önemli nedenidir [26].

1-1000 nm boyutunda sentezlenen nanomalzemeler, moleküler düzeyde biyolojik sistemler ile eşsiz etkileşime izin verir ve ayrıca insan kanserlerinin teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeleri kolaylaştırmakta ve yeni bir nano-onkoloji disiplinine yol açabilmektedir. Kanseri standart tedavisinde sınırlamalar, erken hastalık tespit eksikliği, spesifik olmayan sistemik dağılım, tümöre ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları ve terapötik yanıtların izlenememesi gibi mevcut kanser tedavilerinde görülen zorlukların bir sonucudur [26-28].

Son zamanlarda nanoteknolojinin gelişmeleri sayesinde fonksiyonel nanopartiküller, peptidler, proteinler, nükleik asitler veya küçük moleküllü ligandlar gibi biyolojik moleküllere kovalent olarak bağlanabilmektedir [29-32]. Lenf nodu prostat kanseri saptamasında kontrast madde olarak süperparamanyetit demir oksit nanoparçacıklarının kullanımı [33] ve tümör vaskülatürlerine hedeflenen gen aktarımı için polimerik nanopartiküllerin kullanılması gibi tıbbi uygulamalar da ortaya çıkmıştır [34].

Kanserin vücutta gelişimi uzun bir süreçtir ve hastalığın erken teşhisi tedaviyi kolaylaştırır. Hücrelere yönelik mutasyonlara erken aşamada müdahale edilebilirse o zaman kanser gelişimini durdurmak mümkündür [35]. Kanser teşhisi için klasik yöntemlerde, organlarda büyüme ve değişiklikleri saptamak için X-ray ve / veya CT taramaları kullanılır ve şüpheli durumlarda kanser tanısı onaylamak için biyopsi yapılır [36].

Klasik tanı yöntemlerinde karşılaşılan çeşitli sorunlar bu yöntemlerin etkinliğini azaltmaktadır. Bu problemlerin en önemlileri; sınırlı spektrum aralığı, yetersiz penetrasyon derinliği, hedef hücrelere tam olarak odaklanamama ve düşük sinyal / gürültü oranıdır (SNR) [28].

Nanoteknoloji, tümörlerin erken teşhis edilmesine yardımcı olabilir. Nanoyapıların tek bir tümör hücresi içine girme kabiliyeti, bu alanda görüntüleme tekniklerinin sınırlarını arttırır. Örneğin meme kanseri tanısı için mamografi ile incelendiğinde, tümör hücrelerinin sayısı 1.000.000 olmalıdır. Nanoteknolojinin yardımıyla meme kanserinde 100'den az tümör hücresinin oluştuğunda bile hastalığın teşhis edilmesi mümkündür [37].

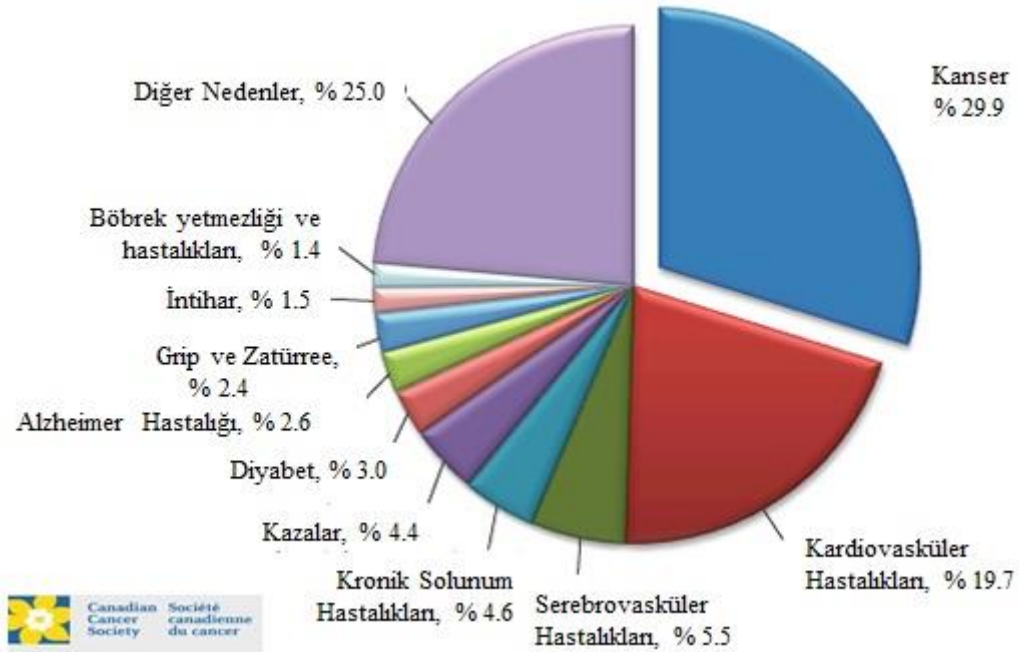
Kansere özgü biyomoleküller ile biyolojik konjuge olabilen nanoyapılar da; erken kanser teşhisi için kullanılır. Nanoyapıların çeşitli fiziksel özellikleri biyomoleküller ile kombine edildiğinde; değişir. Biyomolekülün varlığı veya miktarı hakkında bilgi edinmek için optik, mekanik ve elektriksel yöntemler kullanılarak söz konusu değişiklikler tespit edilebilir.

Nanoteknoloji kanser tedavi konusunda da, daha etkili ilaç hedefleme ve dağıtımını kolaylaştırmak için nanomalzemelerin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini manipüle etmeyi mümkün kılmıştır. Klinik araştırmalar, terapötik nanoparçacıkları kanserin konvansiyonel terapötik ilaçları ile karşılaştırdığında, etkinliğinin

artırmasını ve yan etkilerinin azalmasını öne sürmektedir. Kanser nanoteknolojisinde hızlı ve umut verici bir ilerleme olarak, araştırmacıların ilaç dağıtımında yeni ve etkili nanopartiküller geliştirmeye devam ettiğini söyleyebiliriz. Tedavi edici nanoparçacıkların kullanımı (eşsiz ilaç dağıtım sistemleri, hipertermide kullanılan vb.) mevcut kanser tedavilerine önemli bir katkı olacaktır [27].

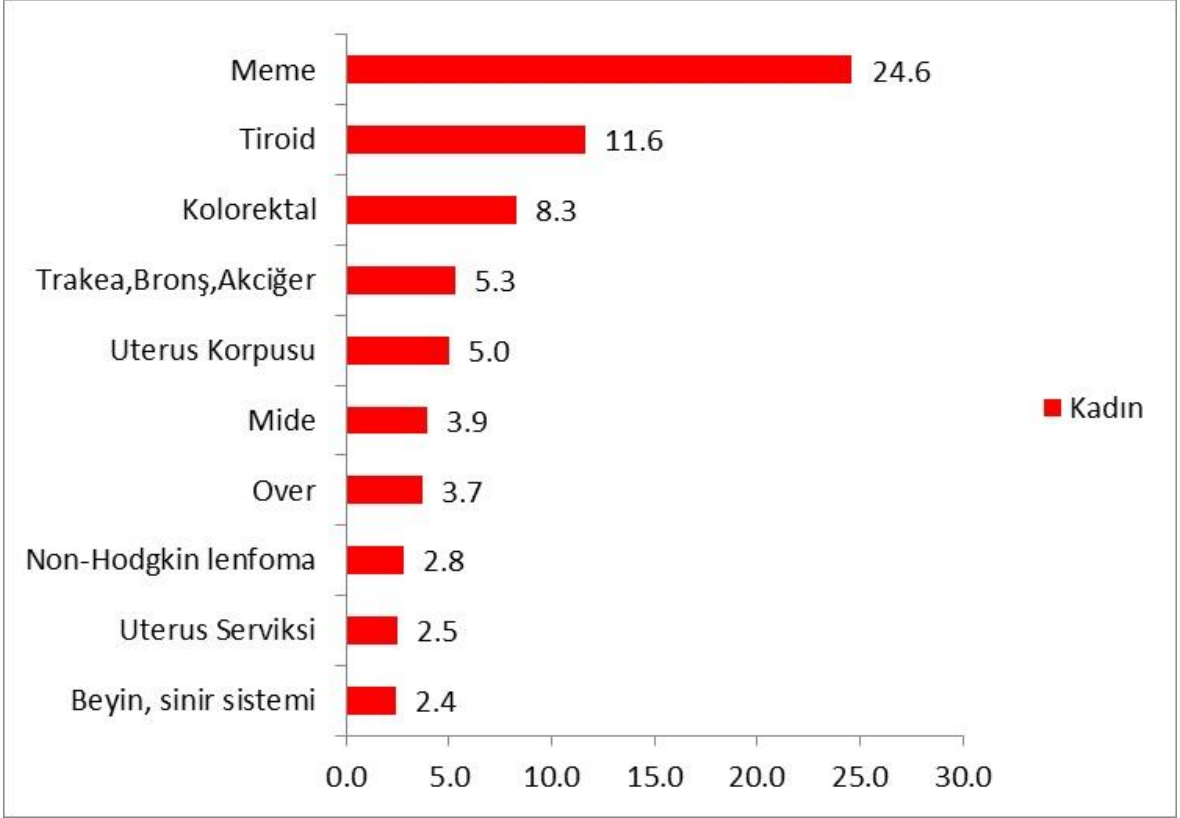
2.1.5. Kanser İstatistikleri

Günümüzde kanser en önemli hastalıklardan biri olarak tanımlanmaktadır. 2013 yılının istatistiklerine göre Türkiye’de bir yıl içinde yaklaşık 174 bin kişiye kanser teşhisi konulmaktadır. Türkiye’de görülmekte olan kanserin sıklığı Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre daha düşüktür. Kanada Kanser Topluluğu tarafından 2011 yılında yapılan ölüm nedeni başlıklı araştırma sonucu, dünyada birinci sırada kanser hastalığı % 29.9 ve ikinci sırada ise kardiyovasküler hastalıkları, % 19.7 ile yer almaktadır (şekil 2.1) [2].



Şekil 2.1 Dünya çapında kanser ile diğer ölüm nedenlerinin karşılaştırılması, 2012 [2]

Şekil 2.2’de görüldüğü gibi Türkiye sağlık bakanlığının 2013 yılında elde ettiği bulgulara göre kadınlarda en çok görülen kanser türü meme kanseridir ve bu da meme kanseri tedavisindeki araştırmaların önemini göstermektedir [38].

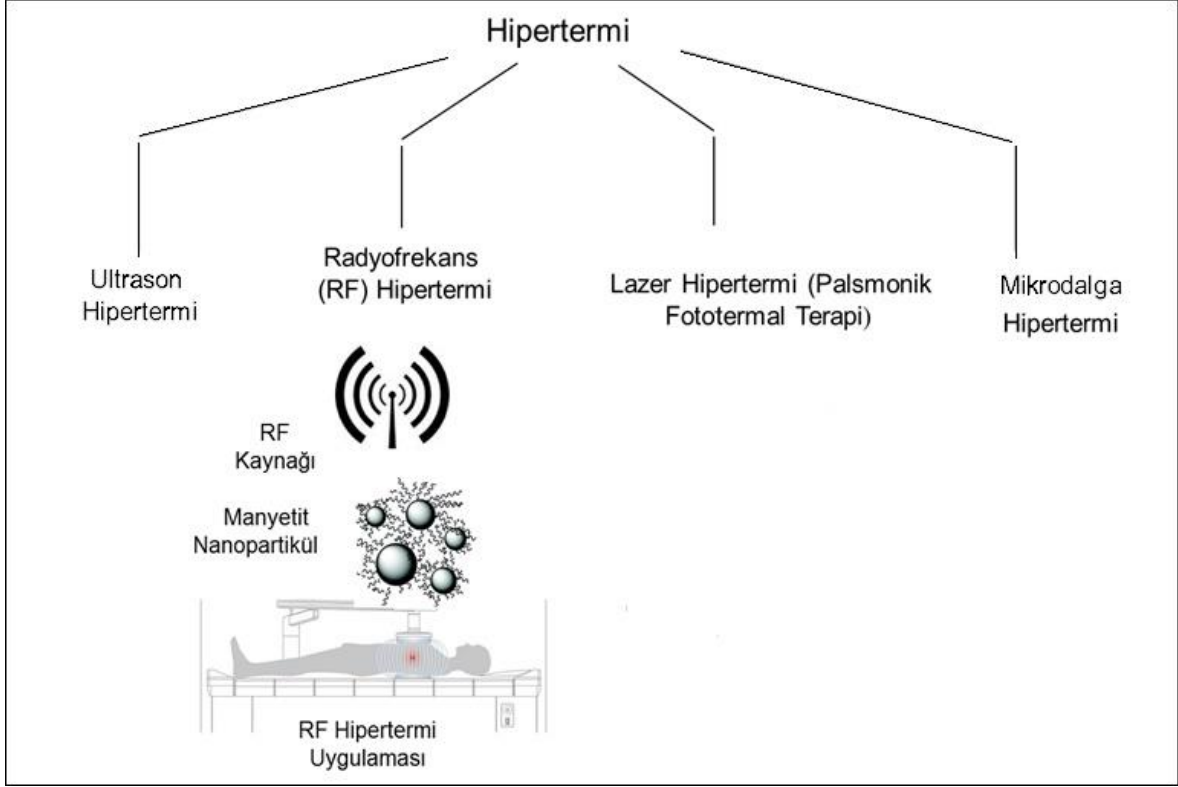


Şekil 2.2 Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen kanserlerin yüzde dağılımları [38]

2.1.6. Hipertermi ile Kanser Tedavisi

Tümörlerin tedavisinde ısı enerjisinin uygulanması ilk kez milattan önce 1700 yılında kullanılmıştır. İlk olarak meme kanserinde yanan tıg kullanıldı [3, 4, 39]. Klinik araştırmalarda, kemoterapi veya radyoterapi yanı sıra tamamlayıcı bir yöntem olarak, hipertermi de kullanılır. 1900'lü yıllardan beri kanser tedavisinde ısı uygulaması kullanılmaktadır [40-43]. Klasik hipertermi metodunda, vücuttaki tümör bölgesinin fizyolojik sıcaklığını (37 °C) bir kaç derece üste (~40-45 °C) çıkarılır [5, 6, 44]. Kanser türlerinin çoğunda sıcaklığın artışı ile hücreler daha hassas ve duyarlı olur. Hipertermi enerjisi için farklı metotlar kullanılmaktadır. Örneğin: ultrason (ses enerjisi), elektromanyetik spektrumu (mikrodalgası veya radyo dalgası)[45, 46], RF hipertermi [47, 48] ve lazer hipertermi [49, 50]. RF ve lazer hipertermi için farklı nanoparçacık türleri gereklidir. Minimal invaziv RF hipertermide, SPION nanoyapıları RF enerjisini emip ısı enerjisine dönüştürür ve bu sayede kanser hücrelerinde hasara veya ölüme neden olur [51]. Hipertermi enerji kaynağına göre, farklı nanoyapılar farklı isimler ile kullanılmaktadır. Örneğin: süperparamanyetit

demir oksit nanopartikül uygulamalı hipertermisi [52-55]. Şekil 2.3’de farklı hipertermi yöntemleri (Ultrason, Radyo frekans Hipertermi [RF], Lazer [Plasmonik Foto termal Terapi] ve mikrodalga) gösterilmektedir. RF hipertermisi sunulan tez çalışmasında açıklanır.



Şekil 2.3 Hipertermi tekniklerinin farklı enerji yöntemlerinin şematik görüntüsü

2.2. Radyofrekans (RF) Hipertermi

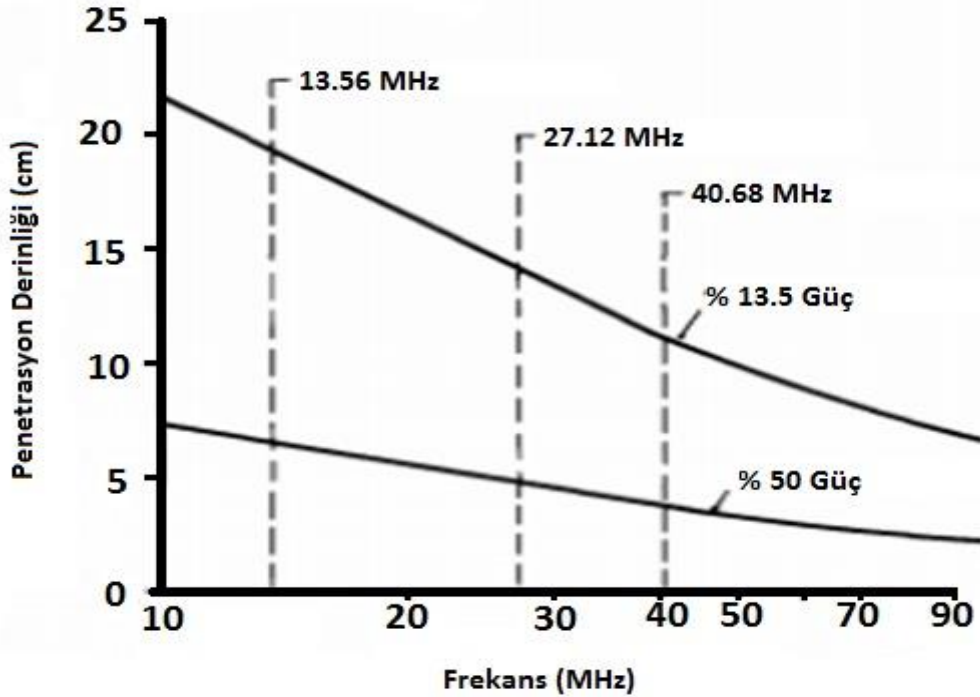
Radyofrekans (RF), elektromanyetik spektrumun en düşük frekans dalgalarından sayılıp, yüksek penetrasyon gücü ve dokuda minimal invaziv hasar etkisine sahiptir ve tıbbın farklı dallarında kullanılır [56]. RF Hipertermide manyetik özelliği olan nanopartiküller (Süperparamanyetit demir oksit, Altın kaplı manyetit vb.) kullanılır. Manyetit nanopartiküllerin RF dalgalarıyla ısınma gücü; zaman ve kütle başına ifade edilen enerji dönüşümü ve spesifik absorpsiyon oranı (SAR) denilen katsayısı ile açıklanmaktadır [57]. SAR değeri; çözelti parametrelerine, RF kaynağına ve nanopartikül özelliklerine dayanmamaktadır. RF enerjisi açısından SAR değeri ve daha sonrası hipertermi ısı enerjisi; RF jeneratörünün çıkış gücüne, RF frekansına, RF’den hedefe olan mesafeye ve kullanılan nanoyapıların morfolojisi ve boyutuna

bağlı etkindir. Nanoparçacıklar tarafından absorbe edilen RF enerjisinin ısı enerjisine dönüştürülmesi, "Mie teorisi" ve "Joule ısınma modeli" gibi birçok hipotez ile doğrulanır [58].

$$\frac{dT}{dt} = \frac{\sigma(\omega)nadE^2}{VC_w} \quad (2.1)$$

Joule modeline göre (Eşitlik 2.1), $\frac{dT}{dt}$ zamana karşı sıcaklık gradyanı, $\sigma(\omega)$ iletkenlik, n partikül sayısı, a nanoyapının kesit alanı, d nanoyapının çapı, E RF alanının şiddeti, V dispersyon hacmi ve C_w suyun ısı kapasitesi olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, Mie modeline göre, düşük terahertz (THz) gibi frekanslarda dalganın emilim miktarı çok düşüktür ve ısı dönüşümü önemsizdir [59].

RF hiperterminin avantajlarından biri penetrasyon gücünün yüksek olmasıdır. Şekil 2.4 frekans ile penetrasyon mesafe grafiği ve bu iki parametrenin ters orantılı olduğunu göstermektedir. Bu grafiğe göre en yüksek penetrasyon 13.56 MHz frekansındayken penetrasyon değeri yüksek frekanslarda azalmaktadır.



Şekil 2.4 Radyofrekans dalgalarının penetrasyon grafiği

2.3. Manyetit Nanopartiküller ve Manyetizma

Manyetit nanopartiküller; kataliz, manyetik ve elektronik alanlarda sahip oldukları özelliklerinden dolayı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır [60]. Endüstriyel uygulamalarda; manyetik kayıt ortamı, banka çeklerindeki manyetik mühürler, manyetik motor kapakları ve manyetik rezonans ortamı gibi birçok alanda kullanılır [61]. Her olası uygulamada farklı koşullar ve özellikler söz konusudur. Örneğin biyomedikal uygulamalarda oda sıcaklığında süperparamanyetit özellik gösteren nanopartiküller tercih edilir ve tıbbi teşhis ve tedavilerde kullanılan manyetit partiküllerin su, fizyolojik tuz koşulları ve nötr pH' da kararlı olmaları gerekmektedir[61].

Nanotıp uygulamalarında 100 nm' den küçük boyutlu partiküllerin kullanılmasının ana avantajları, daha etkili yüzey alanları, daha düşük çökme oranları (yüksek stabilite) ve gelişmiş dokusal yayılmasıdır [62].

Nikel ve kobalt gibi maddeler çok yüksek manyetik özelliklerine rağmen, çabuk oksitlenme ve toksisite göstermeleri nedeniyle biyolojik uygulamalarda çok ilgi çekici değiller [61].

Manyetit nanopartiküllerin özellikleri ve uygulamalarda getirdikleri kolaylıklardan dolayı, biyomedikalde kullanıldıkları bazı alanlar aşağıda verilmektedir: Hipertermi [63], İn-vitro deneylerde tanı ve tedavi amaçlarıyla biyolojik moleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması [64, 65], Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) [66], İn-vivo çalışmalarda kontrollü ilaç salımı [67, 68], Gen terapisinde taşıyıcı vektör ve tetikleyici madde olarak kullanımları [69, 70].

Zamanımızda manyetit nanopartiküller kontrast ajan olarak kullanılmaktadır (örneğin hedef organlar ve lenf nodülleri için). Yeni çalışmalar moleküler görüntüleme ve tedavi üzerine odaklanmaktadır, ama nanopartiküllerin yüzeyine fonksiyonellik kazandırılması ve uzun bir süre gizli şekilde kanda dolaşması zor bir iştir [71].

2.3.1. Manyetizma

Manyetizma, elektrik yüklerinin hareketi sonucu ortaya çıkar ve manyetik alan tarafından oluşturulan fiziksel bir olgudur. Manyetizmanın kaynağı elektrik akımı ve temel yüklerin spin manyetik momentleridir. Tüm malzemeler manyetik özellikler gösterir, ancak onların çoğunun etkisi çok düşüktür. Manyetik moment kutup şiddeti

ile iki kutup arasındaki uzaklığın çarpımına eşittir. Bir atomun elektronları, spin ve yörünge hareketlerinden dolayı manyetik bir moment kazanırlar. Elektronların kendi etrafında dönmesi ve atom çekirdeği çevresindeki dolanma hareketi, manyetik bir özellik kazanmalarına neden olur. Bir atom çekirdeğinin manyetik momenti bir elektronun manyetik momentinden binlerce kat daha düşüktür. Bu nedenle atom çekirdeğindeki maddelerin manyetizmaya katkısı ihmal edilebilir. Çekirdeğin manyetik momenti özellikle çekirdek manyetik rezonansı ve manyetik rezonans görüntüleme de önemlidir [72].

Uygulanan manyetik alanda, orbital dönen bir elektronun cevabı, malzemenin spin konfigürasyonu ile belirlenir. Her birimdeki manyetik moment, elektronlar arasındaki mükemmel etkileşimlerin (elektron spinleri) sonucudur. Sonuç olarak mıknatıslanma manyetik dipollerin yönlendirilmesiyle oluşur [73, 74].

Partikülün boyutu içerdiği domain sayısı ile orantılıdır ve boyu azaldıkça domain sayısı da azalır. Çok alanlı partiküllerde, alan duvarlarından manyetik momentlerin dönmesi kolaydır dolayısıyla manyetizmayı kaldırmak için gereken manyetik alan şiddeti, tek domainli partiküllerden daha küçüktür. Bir partikül yeterince küçük olduğunda süperparamanyetizma özelliği gösterir ve Manyetik momentler termal değişikliklerle herhangi bir yönelme göstermez. Bazı atomların, dış elektron tabakalarının tam olarak dolu olmaması nedeniyle çiftlenmemiş elektronlara sahiptirler ve doğal bir sonuç olarak sıfırdan farklı bir net momente sahiptirler. Bu tür maddeler manyetik bir alana getirilirse, madde atomları üzerinde manyetik momenti almaya zorlayacak bir kuvvet uygulayacaktır. Termal hareketler, bu tür yönlendirici kuvvetlere karşı koyar. Bu tür malzemeler, hat üzerindeki manyetik alan etkisinden dolayı manyetik momentlerin kısmi yönelmeler gösterir ve paramanyetik malzeme olarak adlandırılır. Paramanyetik maddelerde net manyetik moment sıfırdır ve manyetik alan çıkarıldığında kalıcı mıknatıslanma göstermezler [75, 76].

2.3.2. Manyetik Nanopartiküllerin Avantajları ve kullanım Alanları

- Görüntüleme (Manyetik rezonans görüntüleme de kontrast madde olarak kullanılır.)
- Bir manyetik alan vasıtasıyla yerinde sabit tutulur ve vücuttaki özel konumlara hedeflenebilir.

- İlaç salınımı başlatmak veya dokuda hipertermi üretmek için bir manyetik alan içinde ısıtılması ile görev yapabilir.
- İlaçların yan etkilerini en aza indirmek için kontrollü salınım metodu kullanılarak ilaçların konsantrasyonunu azaltılır. İlaç hedefleme ve kontrollü salınımda manyetit nanopartiküller kullanılmaktadır. Ayrıca hedef bölgede ilaç konsantrasyonunu gerekli miktarda olmasını sağlar.
- Manyetit nanopartiküller biyolojik algılama için kullanılır.
- Hücre ayırıştırmasında manyetit nanopartiküller kullanılmaktadır.
- Çok fonksiyonlu terapötik ajan olarak kullanılmaktadır.

2.3.3. Manyetit Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

- ✓ Mikro Emülsiyon Yöntemi [77]
- ✓ Elektro Püskürtme Yöntemi [78]
- ✓ Sol-Jel Sentez Yöntemi [79, 80]
- ✓ Akış Enjeksiyon Yöntemi [81]
- ✓ Sonochemical Reaksiyon Yöntemi [82, 83]
- ✓ Hidrotermal Reaksiyon Yöntemi [84]
- ✓ Çoklu Çökeltme Yöntemi [85-87]

2.4. Altın ve Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküller

Altın nanopartiküller en kararlı metal nanoparçacıklardır. Materyal bilimi; çeşitli parçacıkların davranışını, boyuta bağlı elektronik, manyetik ve optik özellikler (kuantum boyutu etkisi) içeren çoklu türlerin birleştirilmesini ve bunların kataliz ve biyolojiye uygulamalarını inceleyen bilim dalıdır. Altın nanopartiküller nanoteknolojinin aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımında olduğu gibi 21. yüzyılda nanoteknoloji alanının temel malzeme ve yapı taşı olacaktır [88].

Altın nanopartikül biyo-uyumlu olduğundan dolayı biyolojik alanda biyo-konjugasyon için mükemmel adaydır. Birçok araştırmacı, biyolojik olarak aktif olan maddelerin amin fonksiyonlu grubu ile, altın nanopartiküllere güçlü bir şekilde bağlandığını göstermiştir. Altın nanopartiküllerin biyomedikal alanda bazı uygulamaları aşağıda, şekil 2.5'de gösterilmektedir.

1. Hedefe Gönderme (Targeted Delivery)

a. Gen Gönderme [89-91]

b. İlaç Gönderme [92]

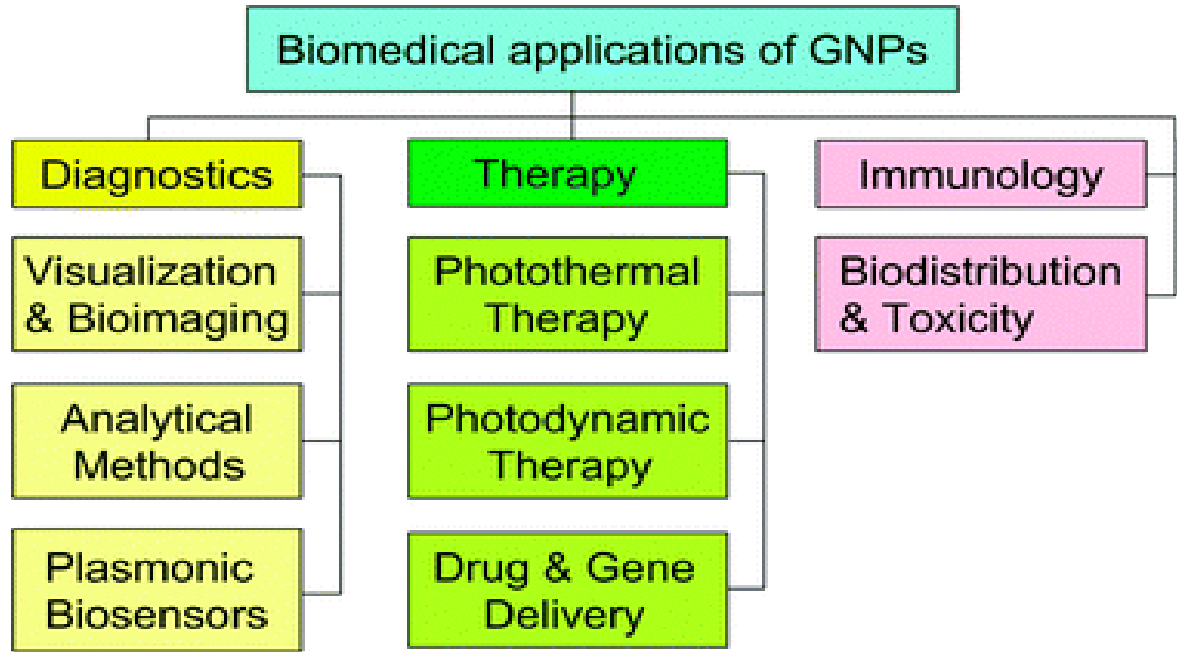
2. Kanser Tanı ve Tedavi Ajanı [93, 94]

3. Biyosensör [95, 96]

4. Biyolojik Moleküller ve Mikroorganizmaların Algılaması [97-100]

5. Enzim Immobilizasyonu [101, 102]

6. İmmünolojik test (İmmünoassay) [103-105]



Şekil 2.5 Altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulaması [106]

Son zamanlarda manyetit nanopartiküllerin oksidasyonunu önlemek, inert bir yapı oluşturmak, yeni fonksiyonlar sağlamak ve aynı zamanda manyetik özelliğini kaybetmeyecek şekilde inert bir dış kabuk ile kaplanması için çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, altın ve gümüş gibi metalik yapılar kullanılarak kaplı manyetit nanopartiküller sentezlenmiştir [107].

Altın tuzu manyetit nanopartiküllerin yüzeyinde indirgeyerek Au tabakası oluşturur ve bu sayede altın kaplı manyetit nanopartikül (Au@SPIONs) elde edilir. Dolayısıyla bu nanopartikül çekirdek / kabuk yapısına sahiptir ve benzersiz optik, elektriksel ve katalitik özellikler gösterir [58]. Au@SPIONs'lerde dielektrik çekirdek bir kabuk (Altın) ile kaplanır. Söz konusu nanopartiküllerin optik ve kimyasal özellikleri

çekirdek/kabuk boyutlarına bağlı olarak değişmektedir, buna göre nanoparçacıkların rezonans bölgeleri, yakın UV'den orta kızılötesi kadar spektral aralığı içerir [108]. Altın kaplı manyetit nanopartiküller insan ve hayvan uygulamaları için biyolojik olarak uyumludur ve çeşitli biyomedikal uygulamalarında optik özelliklerini kullanarak kolayca tespit edilebilir. Bu nanopartiküller toksik değildir ve kimyasal yapıları istikrarlıdır. Altın kaplama yöntemi sonraki biyolojik işlevsellik için iyi yüzeyler elde edilmesini sağlar ve daha sonra, manyetit nanopartiküllerin yüzeyine kovalent bir bağ ile tiolenmiş molekülleri fonksiyonelize (işlevsel) edebilir.

Altın kaplı manyetit nanopartikül metal olduğundan dolayı hücreler üzerine toksik etki göstermemekte ve demirin (manyetit nanopartikül) aksine oksidasyon tepkimesine girmez. Tiyol (-SH) grubu rahatlıkla altın yüzeye bağlanabilir ve oligonükleotit biyomoleküllerde tiyol grubunun var olması nedeniyle, altın kaplı manyetit nanopartiküller antikor bağlanmasında, gen aktarmasında ve antisens tedavisinde kullanılmaktadır. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından dolayı in-vivo ortamında taşıdıkları moleküllerin kararlılığını, biyodağılımını ve dolaşım sisteminde kalma süresini artırmaktadır [109, 110].

2.5. Monoklonal Antikor

Antikor (Ab), bakteri ve virüsler gibi patojenleri etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi tarafından üretilen büyük, Y şeklinde bir proteindir. Antikor (immünoglobulin [Ig] olarak da bilinen), Fab'ın (antijen bağlama parçası) değişken bölgesi yoluyla bir antijen adı verilen zararlı maddenin molekülünü eşsiz bir şekilde tanır [111]. İmmünoglobulin vücudu yabancı moleküllerin yol açması muhtemel zarar verici etkilere karşı erkenden uyararak koruyuculuk sağlarlar. Bir antikorun Y'sindeki her ucu, bir antijen üzerindeki belirli bir epitop için (bir anahtara benzerdir) spesifik bir paratope (bir kilitle benzerdir) içerir ve bu iki yapının hassas bir şekilde bağlanmasına izin verir. Bu bağlama mekanizmasını kullanarak bir antikor, bağışıklık sisteminin diğer bölümlerine saldırmak için bir mikrop veya enfekte olmuş bir hücreyi etiketleyebilir veya doğrudan hedefini etkisizleştirebilir. Bağlama, antijene bağlı olarak, hastalığa neden olan biyolojik işlemi engelleyebilir veya yabancı maddeyi yok etmek için makrofajları aktive edebilir. Bir antikorun bağışıklık sisteminin diğer bileşenleri ile iletişim kurma kabiliyeti, bu etkileşimlerde yer alan

korunmuş bir glikosilasyon bölgesi içeren Fc bölgesi (Y'nin tabanında bulunur) aracılığıyla mümkün olmaktadır [112]. Antikorlar bağışıklık sisteminin B hücreleri tarafından salgılanır.

Monoklonal antikorlar (mAb), özdeş immün hücreler tarafından yapılan antikorlardır ve bunların hepsi benzersiz bir ana hücrenin klonlarıdır. Başka bir deyişle tek bir hücre klonu veya hücre dizisi tarafından üretilen ve özdeş antikor moleküllerinden oluşan bir antikordur. Monoklonal antikorlar sadece bir epitop'a karşı reaksiyon gösteren antikorlardır ve sadece bir adet B-Lenfositte dayanan hücre klonundan elde edilirler. Monoklonal antikorlar, aynı epitop'a (antikor tarafından tanınan bir antijenin parçası) bağlanmaları bakımından, tek değerli afiniteye sahip olabilirler. Aksine, poliklonal antikorlar çoklu epitoplara bağlanır ve genellikle birkaç farklı plazma hücresi (antikor salgılayan immün hücre) soylarıyla üretilir.

Hemen hemen herhangi bir madde göz önüne alındığında, spesifik olarak bu maddeye bağlanan monoklonal antikorlar oluşturmak mümkündür; o zaman algılamak veya bu maddeyi arındırmak için hizmet edebilir. Bu, biyokimya, moleküler biyoloji ve tıpta önemli bir araç haline gelmiştir. Tümör hücreleri üzerinde spesifik reseptörler, monoklonal antikorları tanımlamak için mevcuttur. Monoklonal antikorlar, tümör hücreleri üzerindeki yüzey reseptörlerine özel olarak bağlanmaktadır.

2.6. Monoklonal Antikorların Uygulamaları

- **Teşhis testleri:** Belirli bir madde için monoklonal antikorlar üretildiğinde, bu maddenin varlığını tespit etmek için kullanılabilir ve Ayrıca İmmünohistokimya'da çok yararlıdırlar. Örneğin sabit doku bölümlerinde antijen tespiti, immünfloresan testi, dondurulmuş bir doku kesitinde veya canlı hücrelerde bulunan maddeyi tespit etmek için kullanılır.
- **Analitik ve kimyasal uygulama:** Antikorlar, immüno çökeltme yöntemini kullanarak, karışımlarından hedef bileşiklerini saflaştırmak için kullanılabilir.
- **Terapötik tedavi:** Terapötik monoklonal antikorlar, hedeflenen molekül fonksiyonlarının bloke edilmesi, hedefi ifade eden hücrelerde apoptozu

indüklenme veya sinyal yollarını modüle etme gibi çoklu mekanizmalar yoluyla etkimektedir [113, 114].

- **Kanser tedavisi:** Kanser için muhtemel bir tedavi, sadece kanser hücrelerine özgü antijenleri bağlayan ve hedef kanser hücrelerine karşı bir bağışıklık tepkisi uyandıran monoklonal antikörları içerir. Bu mAb'ler, bir toksin, radyoizotop, sitokin veya diğer aktif konjüгатın verilmesi için modifiye edilebilir veya Fab bölgeleriyle hem antijen hem de bir konjüгат veya efektör hücresi hedeflemek üzere bağlanabilen bispesifik antikörlar tasarlayabilir [115, 116].

2.7. Tez Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

2.7.1. Zetapals

Zetapals cihazı, kolloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu, zeta potansiyelini ve moleköl ağırlığını bulmak için kullanılan ve ışık saçılması esasına dayanan bir cihazdır. Zetapals cihazı dinamik ışık saçılması ile parçacıkların boyutunu, statik ışık saçılması ile partiküllerin moleköl ağırlığını ve elektroforetik ışık saçılması ile partiküller arasındaki itme ve çekme kuvvetini belirleyen zeta potansiyelini ölçmektedir. Bu cihaz belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan parçacıkların hızını belirleyerek, partiküllerin zeta potansiyelini hesaplamaktadır.

2.7.2. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopisinin çalışma prensibi, moleküllerin kızıl ötesi ışığını emmesiyle titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır. Optik izomerler dışında bütün bileşiklerin kızıl ötesi spektrumu birbirinden farklıdır. Kızıl ötesi (IR) bölgesi elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikro dalga bölgesi arasında yer alır. Bu bölge $4000-450 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu arasındadır. Basit gerilme titreşimler $1600-3500 \text{ cm}^{-1}$ arasındayken karmaşık gerilme titreşimleri $400-1400 \text{ cm}^{-1}$ aralığındadır. Bu bölgede karakteristik gerilme titreşimleri yer aldığı için parmak izi bölgesi olarak adlandırılmaktadır. FTIR spektroskopisi moleköl ve/veya bileşik yapısında bulunan bağlar hakkında tanımlayıcı bilgiler verir. İncelenen maddede soğurulma, moleköldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir.

2.7.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli Elektron Mikroskobu, görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. TEM (Transmission Electron Microscopy) bir numune içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenme prensibi ile çalışan mikroskop tekniğidir. Elde edilen görüntü, numune aracılığıyla iletilen elektronların etkileşiminden oluşur. Bu görüntü büyütülür ve bir flüoresan ekran, bir fotoğraf film tabakası veya yüke bağlı cihaz gibi bir sensör tarafından algılanır. TEM çeşitli bilim dallarında (fizik, kimya ve biyoloji bilimlerinde) büyük bir analiz yöntemi oluşturmaktadır. TEM'ler, kanser araştırmaları, viroloji, malzeme bilimi, nanoteknoloji ve yarı iletken araştırmalarda uygulanmaktadır [117].

Elektron mikroskopta incelenecek numune kesinlikle katı malzeme olmak zorundadır ve 3mm çapında, 100 mm'den daha ince ve elektron geçirgenliğine sahip bir disk üzerinde hazırlanmalıdır. Dolayısıyla elektron geçirgenliğine uygun olarak hazırlanamamış bir numuneden bir görüntü kontrastı elde etmek mümkün olamamaktadır [118].

2.7.4. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI)

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) vücudun içinde organ ve yapıların fotoğraflarını elde etmek için bir manyetik alan ve radyo dalgası enerjisi kullanan bir yöntemdir. Bu metot daha çok tıpta kullanılır ve yüksek düzeyde manyetizmayla canlı doku, yansıtma yoluyla görüntülenir. Pek çok durumda, MRI, vücuttaki yapılar hakkında röntgen, ultrason veya bilgisayarlı tomografi (Computed Tomography) taramasından farklı olarak bilgi verir. Ayrıca MRI diğer görüntüleme yöntemleriyle görülemeyen problemleri gösterebilir [119].

Bir MRI testi için, incelenen vücudun alanı güçlü bir mıknatıs içeren özel bir makinenin içine yerleştirilir. MRI taramasındaki resimler, daha fazla çalışma için kaydedilebilen ve bilgisayarda saklanabilen dijital görüntülerdir. Görüntüler aynı zamanda bir klinikte veya ameliyathanede olduğu gibi uzaktan incelenebilir. Bazı durumlarda, bazı yapıları daha net göstermek için MRI taraması sırasında kontrast madde kullanılabilir.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) birçok nedenden dolayı kullanılmaktadır. Bu yöntem, tümörler, kanama, yaralanma, kan damarı hastalıkları veya enfeksiyon gibi sorunları bulmak için kullanılır. MRI sırasında kontrast malzeme, anormal dokuyu daha net göstermek ve onun hakkında daha fazla bilgi almak için kullanılabilir. MRI testi yapılırken vücudun üzerinde (veya vücuda enjekte olan nanopartiküller) metal olursa bu metal, ayrıntılı MRI görüntülerinin bazılarını bulanık hale getirebilir [120].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan çalışmalar üç ana iş paketinden (İP) oluşmaktadır.

- İP1. Nanopartikül Üretim ve Karakterizasyonu
 - a. Manyetit Nanopartikül Sentezi
 - b. Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu
 - c. Altın kaplı Manyetit Nanopartikül Sentezi
 - d. Altın kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu
 - e. Altın kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu
 - f. Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu
- İP2. Antikor İmmobilizasyonu ve Nanopartiküllerin Sitotoksite Testi
 - a. Sisteamin ile Yüzeyi Modifiye Olmuş Nanopartiküllerin Üzerine Antikor İmmobilizasyonu
 - b. Antikor İmmobilizasyonulu Nanopartiküllerin Karakterizasyonu
 - c. Antikor-Nanopartikül Bağlanma Oranının Hesaplanması
 - d. Sitotoksite Testinin Yapılması
- İP3. İn-vitro ve Hayvan Model (İn-vivo) Çalışmaları

3.1. Kimyasallar

3.1.1. Manyetit ve Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Sentezi için Kullanılan Kimyasallar

Manyetit nanopartikülün sentezi için demir (II) klorür tetrahidrat (Iron(II) chloride tetrahydrate [$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]), Demir (III) klorür heksahidrat (Iron(III) chloride hexahydrate [$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]), Sodyum hidroksit (NaOH) ve Tetrametilamonyum hidroksit çözeltisi [$(\text{CH}_3)_4\text{N}(\text{OH})$] Sigma-Aldrich' ten satın alma yoluyla temin edilmiştir. Altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi için ise trisodyum sitrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Tetrakloroaurik asit trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich' ten ve oksalik asit dihidrat [$(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$] Merck' ten satın alınarak temin edilmiştir.

3.1.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu ve Antikor İmmobilizasyonu için Kullanılan Kimyasallar

Yüzey modifikasyonu için sisteamin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) ve etanol (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Yüzeyi modifiye olmuş altın kaplı manyetit nanopartiküllerin üzerine antikor bağlanması için kullanılan kimyasallar ise EDC [N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide], monoklonal antikor (MONOCLONAL ANTI-N CAM Clone NCAM-OB11), NHS (N-hydroxysuccinimide) (Sigma-Aldrich) ve PBS (Phosphate buffered saline) olarak belirlenmiştir.

3.1.3. İn-vitro ve İn-vivo Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar

İn-vitro çalışmalarında hücre kültürü ortamı için FBS, DMEM, Pen Strep (Penisilin/Streptomisin), Sodyum Piruvat ve Sodyum Bikarbonat (Sigma-Aldrich), HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] (Sigma-Aldrich), L-Glutamin ve apoptoz-nekrozu belirlemek için ikili boyama çözeltisi (Hoechst 33342, Propidium İodide) kullanılmıştır. İn-vivo çalışmalarında ise farelerde anestezi için isoflurane kullanılmıştır.

3.2. Cihazlar

Nanopartiküllerin sentezinde ve karakterizasyonunda kullanılan cihazlar; Isıtılmalı Mekanik Karıştırıcı (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik), Manyetik Ayırıcı, Santrifüj (Allegra 64R - Beckman Coulter), Sonikatör (Sonic Medflex UC05L Ultrasonic Cleaner), Shaker (Laboratory shaker incubator KS 4000 ic control), Zetapals Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation), FTIR Spektroskopisi (FTS 6000 Spectrometer), Titreşimli Manyetometre (VSM)(Fieldial Mark II Varian, Germany) ve TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu)(FEI, Tacnai G² Spirit Biotwin) olarak belirlenmiştir.

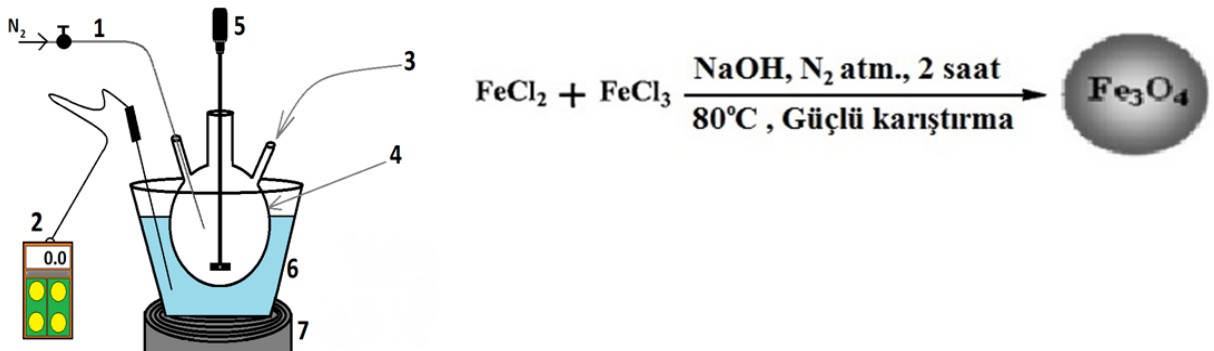
İn-vitro ve in-vivo çalışmalarındaki cihazlar ise ELISA cihazı (iMark™ Microplate Absorbance Reader), Floresan mikroskop (Leica DMI70, Germany) ve MRI cihazı (HT-MRS 160-60 KY) kullanılmıştır.

3.3. Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu iş paketinde ilk olarak manyetit nanopartikül sentezlenmiştir ve karakterizasyon yapıldıktan sonra altın ile kaplanmıştır. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmıştır ve ikinci iş paketine (Antikor immobilizasyonu) uygun olması için sisteamin (Cysteamine) molekülü kullanarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır.

3.3.1. Manyetit Nanopartikül Sentezi

Bu sentezde ikili çökeltme yöntemi (yüksek sıcaklıkta, mekanik karıştırıcı) kullanılmıştır. Bu işlem Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilen sistemde gerçekleştirilmiştir. Üç boyunlu bir reaktörde, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, N₂ atmosferinde, 80 ° C'deki 32 ml iyonize suya 24 ml 5 M NaOH solüsyonu ilave edilmiştir ve daha sonra 24 ml 1.25 M Fe⁺² ve Fe⁺³ tuzu solüsyonu yavaş yavaş karışıma eklenmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelti oluşumu gözlenmiştir. Siyah çözelti 80°C'de, çok yüksek bir karıştırma hızında, 2 saat süre ile karıştırılmıştır. Manyetik ayırıcı yardımıyla, manyetit partiküller ve manyetit olmayan parçacıklar ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra 0.1 M tetrametil amonyum hidroksit çözeltisi ile stabilize edilmiştir.



Şekil 3.1 Manyetit Nanopartikül Sentezi için Deney Düzeneği. (1) Vana; (2) Termokupl; (3) Demir ve NaOH çözeltisi için besleme ağızı; (4) Reaktör; (5) Mekanik karıştırıcı; (6) Su banyosu ve (7) Elektrikli ısıtıcı.

Sentezlenen manyetit nanopartikül çözeltisinden 1 ml, petri (önceden ağırlığı hassas terazi ile ölçülmüş) üzerine damlatılmıştır ve 50°C'de ısıtılmış fırında kuruması için bekletilmiştir. Nanopartiküller kuruduktan sonra petri ağırlığı yeniden ölçülüp nanopartikül miktarı elde edilmiştir. Daha sonra nanopartiküllerin konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin hidrodinamik boy dağılımı ve yüzey yük grafiğinin değerlendirilmesi için zeta-sizer (Zetapals Analyzer Brookhaven Instruments Corporation) cihazında bakılarak karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin kızılötesi spektrumunu elde etmek için (bağ titreşimleri) FTIR cihazı kullanılmıştır. Nanopartiküllerin manyetit özelliğini değerlendirmek için titreşimli manyetometre kullanılmıştır. Transmisyon elektron mikroskop (FEI, Tacnai G² Spirit Biotwin) nanoyapıların kristalografi görüntülerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

3.3.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Sentezi

Önceki aşamada üretilen manyetit nanopartiküller bu etapta altın ile kaplanmıştır. Literatür bilgileri ve önceki çalışmalarımızda elde edilen bulgular ışığında uygulanan yöntem şöyledir: Uygun derişimdeki (bu çalışmada 100 µg/ml) tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş manyetit nanopartikül süspansiyonundan 1.2 ml alınıp, 100 ml deiyonize suda dağıtılmış ve karışıma 0.7 ml 0.155 M trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilmiştir. Sitrat iyonlarının OH⁻ iyonları ile değişmesi için çözelti, 15 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra süspansiyon, yüksek bir karıştırma hızında (96° C) kaynaya kadar ısıtılmıştır. Manyetit Nanopartiküllerin çevresinde altın iyonlarının indirgemesi için 10 ml, 0.01 M tetrakloroürat ilave edilmiştir ve 15 dakika kaynama noktasında karıştırılmıştır. Bu süre sonunda çözelti oda sıcaklığına gelinceye kadar yüksek hızda karıştırmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık gri olan çözelti rengi kahverengi ve koyu renge dönerek en son parlak kırmızı kahve olmuştur ve bu altın kaplamanın işaretidir. (Şekil 3.2)

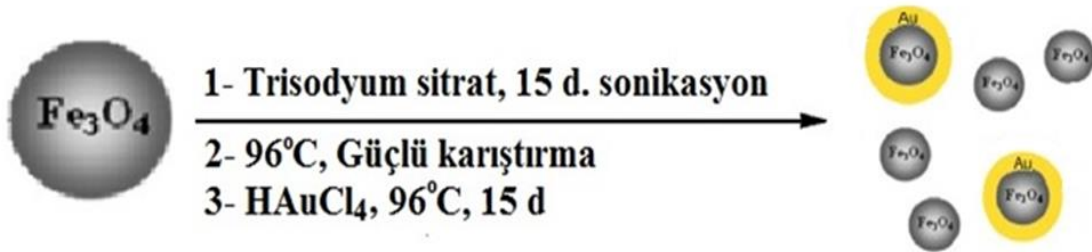
Süspansiyon 15000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve mıknatıs yardımıyla manyetik ve manyetik olmayan nanopartiküller ayrılmıştır ve işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra altın ile kaplanmamış manyetit nanopartiküller ve altın kaplı olanları ayırmak için karışım 0.02 M'lık oksalat çözeltisinde 1 saat mekanik karıştırıcı

yardımıyla karıştırılmıştır. Çözelti su ile birkaç kez yıkanmıştır ve manyetik ayırıcı ile toplanmıştır.

Tekrarlanan sentez çalışmalarımızda elde edilen önemli bulgular şunlardır: Kaplama kalınlığını etkileyen en önemli parametre indirgeyici ajanın (trisodyum sitrat) miktarıdır. Eğer sentezde iyi stabilizasyon sağlanmazsa düzgün bir kaplama gerçekleştirilememektedir, dolayısıyla oksalat ile saflaştırma basamağında önemli miktarda partikül kaybı yaşanmaktadır. Özellikle düşük miktarlarda sentez yapıldığında bu kayıp miktarı çok daha fazladır ve epey geniş boy dağılımını kapsamaktadır. Kaplama kalınlığını etkileyen diğer parametre birim nanopartikül başına kullanılan altın tuzunun miktarıdır. Yani altın tuzunun miktarının artmasıyla kaplama kalınlığı artmaktadır, fakat o zaman iki olumsuz durum ortaya çıkmaktadır. Birincisi manyetit nanopartiküllerin kaplanması yanı sıra çok miktarda altın nanopartiküllerin oluşmasıdır. İkinci olumsuz durum kaplama kalınlığının artmasıyla nanopartiküllerin manyetik özelliklerin azalmasıdır.

100 ml DW + 1.2 ml SPIONs + 0.7 ml, 0.155 M Trisodyum Citrate → 15 Dakika Sonikasyon

Çözelti kaynama noktası + 10 ml, 0.01 M Tetrakloroürat → 15 Dakika Karıştırma



Şekil 3.2 Altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi

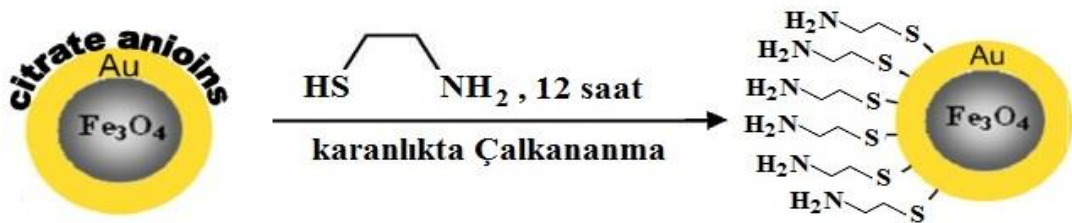
Sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküller; zeta-sizer, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), VSM (Titreşimli Manyetometre) ve TEM (Transmisyon Elektron Mikroskop) kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.3.3. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu (Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Sentezi)

Tez kapsamında altın kaplı manyetit nanopartiküllere antikor bağlanması planlanmıştır. Antikorların bir ucunda amino grubu ve diğer ucunda karboksil grubu bulunmaktadır. Antikorlar amino uçlarından antijenlere veya reseptörlere bağlanmaktadır. Dolayısı ile bu işlevselliği korumak ve antikorun nanopartiküllere bağlanması için karboksil ucu kullanılmıştır.

Antikorların altın kaplı manyetit nanopartiküllere bağlanması için farklı yöntemler (kovalent ve non-kovalent) bulunmaktadır. Literatür çalışmalarının göz önüne alınarak kovalent bağı ile bağlanmasına karar verilmiştir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu için, kendiliğinden yerleşen tek tabakalar ("self assembling monolayers"-SAMs) kabiliyete sahip moleküllerin kullanılması planlanmıştır. Bunun için önceki çalışmalarımızda kullanılan – ilgili literatürde de en çok çalışılan- bir ucunda altın ile etkileşecek tiyol (SH) diğer ucunda amino grubu (NH₂) bulunan molekül olarak 2-aminoethantiyol (sisteamin) seçilmiştir. Sisteamin -SH grubuyla altın yüzeyine tek tabaka oluşturacak şekilde yerleşip diğer ucundaki -NH₂ grubu nedeniyle antikorun karboksil gurubuyla amit bağı oluşturur.

Yüzey modifikasyonu için ilk olarak 1 mM sisteamin çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 1 ml altın kaplı manyetit nanopartikül çözeltisine 225 µl sisteamin (1 mM) ilave edilmiş ve çözelti 12 saat boyunca karanlıkta shake edilmiştir (Çalkalandı). İşlem sonunda sisteamin nanopartiküllere bağlanıp, süspansiyonundan ayırmak için mıknatıs kullanılmıştır. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi

Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller sentezlendikten sonra zeta-sizer ve FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ile karakterize edilmiştir.

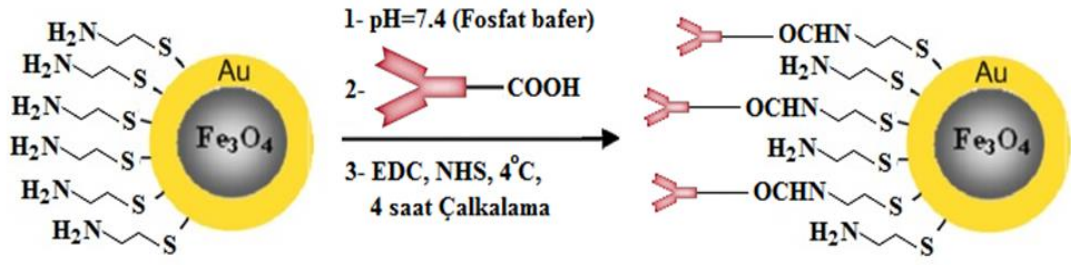
3.4. Antikor İmmobilizasyonu ve Nanopartiküllerin Sitotoksisite Testi

Tezin bu aşamasında ilk olarak tümör hücreleri (Bu çalışmada meme kanseri üzerinde çalışıldığı için MCF7 hücre hattı kullanılmıştır) üstünde bulunan reseptörlere spesifik olarak bağlanan monoklonal antikor (MONOCLONAL ANTI-NCAM Clone NCAM-OB11) kullanılarak sentezlenen sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül üzerine immobilizasyon yapılmıştır. Daha sonra antikor-nanopartikül bağlanma oranı hesaplanarak deneylerde en yüksek bağlanma oranı olan konsantrasyon kullanılmasına karar verilmiştir. Bu iş paketinin ikinci aşamasında ise sitotoksisite testleri yapıp sonuçlar alındıktan sonra bağlanma oranı sonuçlarını da göz önünde tutularak en doğru konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

3.4.1. Nanopartiküllerin Üzerine Antikor İmmobilizasyonu

Modifiye altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yüzeyine monoklonal antikor bağlanması için EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide] / NHS (N-hydroxysuccinimide) yöntemi kullanılmıştır [121, 122]. EDC ve NHS nanopartikül ve antikor arasında amid bağ oluşumuna neden olacaktır. Bu işlem için ilk olarak sentezlenen sisteamin fonksiyonize altın kaplı manyetit nanopartiküller birkaç kez su ile yıkandıktan sonra, pH 7.4 fosfat tamponu çözeltisi içinde dağıtılmıştır. Daha sonra antikor ve nanopartikül çözeltisi 1:3 (hacim / hacim) oranında karıştırılıp, antikorda mevcut olan -COOH grubu aktive edilmesi için 0.2 M EDC ve 0.05 M NHS ilave edilmiştir. Çözelti 4 saat boyunca 4 °C'de çalkalandı. Aktive karboksil grubu amid bağı oluşturmak için sisteamin bağlı altın-kaplı manyetit nanopartiküllerin -NH₂ grubu ile bağlanmaktadır. 4 saatin ardından çözeltiler fosfat tampon (pH 7.4) ile birkaç kez yıkanarak, ardından santrifüj ile toplanmıştır. En yüksek antikor-nanopartikül bağlanma oranını hesaplamak için farklı konsantrasyonda nanopartikül (5, 10, 20, 40 µg/ml) ile deneyler tekrarlanmıştır. (Şekil 3.4)

Antikor immobilizasyonu yapılan nanopartiküllerin karakterizasyonu FTIR ve ninhydrin testi kullanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 Sisteamin fonksiyonize altın kaplı manyetit nanopartiküllere antikor immobilizasyonu

3.4.2. Nanopartiküllerin Sitotoksosite Testleri

Nanopartiküllerin (Altın kaplı manyetit ve antikor bağlı altın kaplı manyetit) toksisitesini belirlemek için MTT testi (3-4,5-dimetil-tiyazol-2,5-difenil tetrazolium bromid) yapılmıştır. MTT tahlili, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için bir kolorimetri analizidir bu yüzden endirekt şekilde hücre canlılığını ve dolayısıyla nanopartiküllerin toksisitesini belirlemek için kullanılır [123].

MTT testi için 3T3 hücre hattı (Standart fibroblast hücreleri) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan nanopartiküllerin en iyi sonuç veren konsantrasyonunu belirlemek için 4 farklı konsantrasyonda (5, 10, 20, 40 µg/ml) nanopartikül hazırlanıp MTT testi yapılmıştır.

İlk olarak 45 ml DMEM, 5 ml PBS ve 0.5 ml Pen Strep ile bir solüsyon hazırlanmıştır. Plate içindeki hücrelerin sıvı kısmı dışarı atılıp 4 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra 1 ml tripsin enzimi eklenip karıştırılmıştır ve üzerine 2 ml DMEM çözeltisi eklenerek tüm hücrelerin plate' den ayrılması için iyice karıştırılmıştır. Çözelti falkona alınıp 5 dakika 20°C, 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılıp hücreler falkonun dip kısmında toplanmıştır. Falkondaki hücrelerin üzerine 6 ml DMEM çözeltisi eklenerek pipet yardımı ile iyi bir şekilde karıştırılmıştır. 96 kuyucuklu bir kültür kabında, her bölmeye 100 µl yukarıdaki çözülden alınarak yaklaşık 400 hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler 5 grup halinde (5 µg/ml grubu, 10 µg/ml grubu, 20 µg/ml grubu, 40 µg/ml grubu ve kontrol grubu) ve her grup için 7 kuyucuk şeklinde ekilmiştir. Ekim işlemi bittikten sonra hücreler karbon dioksit inkübatörde (37 °C, % 5 CO₂) 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra DMEM çözeltisi kullanılarak hazırlanan nanopartikül konsantrasyonları (her kuyucuk için 100 µl) inkübe edilen hücrelere (canlı olup olmadıkları kontrol edildikten sonra) ilave edilip

pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. İşlem bittikten sonra hücreler tam 24 saat olacak şekilde inkübe edilmiştir. Üçüncü gün MTT çözeltisi 5 mg/ml konsantrasyonu ile PBS kullanarak hazırlanmış ve her kuyucuğa 10 µl bu çözülden eklenmiştir. Hücreler 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda kuyucukların sıvı kısmı dışarı atılıp her kuyucuğa 100 µl formazan eklenip 20 dakika 150 rpm'de çalkalanmıştır. Daha sonra ELISA kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir.

3.5. İn-vitro ve Hayvan Model (İn-vivo) Çalışmaları

Bu iş paketinde önceki aşamalarda sentezlenip, karakterize edilip ve sitotoksosite değeri belirlenen, antikor ile hedeflenmiş modifiye altın kaplı manyetit nanopartiküller kullanılarak önce hücre kültürü (in-vitro) çalışmaları yapılmıştır ve daha sonra bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak hayvan modellerine uygulanıp in-vivo sonuçları değerlendirilmiştir.

3.5.1. Hücre Kültürü Çalışmaları (İn-vitro Deneyleri)

Hücre kültürü çalışmaları için daha önceden literatürde çalışılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiş MCF-7 kanser hücre hattı kullanılmıştır. Kültür vasatı; %10 PBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren DMEM/F12 kullanılarak MCF-7 hücrelerin kültürü için hazırlanıp hücreler ilave edildikten sonra 37±0.5°C sıcaklığında ve % 5 CO₂ atmosferinde (Karbon dioksit inkübatör) inkübe edilmiştir.

MCF-7 hücreleri kriyo tüpün içinde ve -80°C'lik derin dondurucuda saklanır. Deneylere başlamak için MCF-7 hücreleri çözündürülüp falkon tüpe aktarılıp üzerine 1 ml vasat ilave edilmiştir. Karışım 3000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır. Falkon tüpün alt kısmında kalan hücrelerin üzerine 4 ml vasat ilave edilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonra MCF-7 hücreleri 75 cm³'lük flasklara ekilip 2 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe işlemi bittikten sonra flaskların vasatı atılıp her birine 0.5 ml tripsin-EDTA enzimi eklenip aşağı yukarı hareketlerle enzimin tüm yüzeylere temas etmesi sağlanmıştır. Flasklar 3-4 dakika inkübatörde bekletilip hücrelerin ayrılması kontrol edilmiştir. Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak için hücrelerin üzerine 1 ml vasat eklenip 4000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip süpernatant kısım atılmıştır. Her bir hücre çökeltisi üzerine 1 ml vasat ve 1 µl trypan blue çözeltisi eklenip hücre sayım cihazı (Invitrogen-Countess) ile sayım yapılmıştır. Vasat ile seyreltilmiş falkon tüpteki MCF-7

hücrelerinden (Toplam hacim 10 ml) her bir kültür kabının kuyucuğuna(well) 150 µl (her well 10×10³ hücre) ekim yapılmıştır. 4 saat inkübe edilip sonra hücrelerin morfolojisi ve kontaminasyon olup olmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir.

Her deney için 48 well' de ve her well için 10000 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve hazırlanan örnekler ile (Altın kaplı manyetit, Antikor bağlı altın kaplı manyetit) 48 saat boyunca etkileşime bırakılmıştır. Bunun için 4 saat inkübatörden sonra her bir kuyucuğun vasatı çıkartılıp yerine 200 µl hazırlanan örneklerden ilave edilip inkübatöre bırakılmıştır. Deneyler üç gurup şeklinde yapılmıştır. Birinci gurupta MCF-7 hücrelerine altın kaplı manyetit nanopartikül eklenmiştir. İkinci gurupta well' de ekilen hücelere antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül eklenmiş ve üçüncü gurupta ise antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül eklendikten sonra RF radyasyonu yapılmıştır. RF radyasyonu için anten model RF (144.015 MHz, 120 W, 50 dakika) kullanılmıştır. Daha sonra tüm gruplar 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve hücreler ikili apoptoz nekroz boyama yöntemiyle boyanıp ve Floresan Mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.5.1.1. Apoptoz-Nekroz Saptaması için İkili Boyama Metodu

İkili boyama yönteminde hücrelerin çekirdeği boyanıp hücrelerin apoptoz ve/veya nekroza uğradıkları gösterilir. Bu yöntemde Hoechst 33342 (+4°C'de saklanır) ve Propidium İodide (-20°C'de saklanır) boya ları kullanılmaktadır.

İkili boyama solüsyonu hazırlamak için önce kullanılan maddelerin stokunu hazırlamamız gerekmektedir, bunun için 1 ml PBS'ye 10 mg Ribonükleaz A, 1 ml PBS'ye 200µg Hoechst ve 1 ml PBS'ye ise 100 µg Propidium İodide olacak şekilde ilave edilir. İkili boyama çalışma solüsyonunun hazırlaması için 10 ml PBS içerisine, 500 µl Hoechst boyası stokundan, 100 µl Propidium İodide (PI) boyası stokundan ve 100 µl Ribonükleaz A stokundan ilave edilir.

Boyamada sadece DNA'nın boyanması için Ribonükleaz A, RNA'yı pirimidin bazlarında kesip yok eder. Hoechst boyası hücrelerin çekirdeklerini maviye boyayıp apoptoz evresine giden hücreleri gösterir. PI ise normal hücrelerin zarından geçemediğinden dolayı ölmüş ve/veya zarı hasar görmüş hücrelerin zarından geçebilir ve DNA'yı kırmızıya boyayıp hücrelerin nekrozunu gösterir.

48 saat inkübe edilen hücrelerin apoptoz-nekroz oranını belirlemek için hücrelerin üst kısmındaki süpernatant kısmı atılıp her kuyucuğa 70 µl ikili boyama çalışma

çözeltisi eklenmiş ve karanlık ortamda 15 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Devamında sıvı kısım pipet yardımıyla alınıp floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoz ve FITC yardımıyla nekroz olmuş hücrelerin değerlendirilmesi yapıp yüzde şeklinde ifade edilmiştir.

3.5.2. Hipertermi Tedavisinde Kullanılan RF' in Kuruluşu

Hipertermi için kullandığımız anten modülü RF jeneratörü, çeşitli parçaların birleştirmesinden yapılmıştır. RF amplifayer cihazında mikro taban ve 132-174 MHz tekrarlayıcı istasyonlar olarak Motorola® (68P81036E40-B) ve telsiz olarak KG-UVD1P kullanılmıştır. Anten modülü RF hazırlamasında anten kısmı 130 cm uzunluğa sahip olacak şekilde seçilmiştir. Elle kontrol edilen güç devresi (5-200 W), RF gücünü ayarlamak için sisteme eklenmiştir. Yukarıda adı geçen parçaları birleştirerek RF jeneratörünün tasarımı ve yapımı tamamlanmış ve RF hipertermisi hücre kültüründe kanserli hücrelere ve in-vivo deneylerde tümör üzerine uygulanmıştır. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 Anten modülü RF (Laboratuvarda Tasarladığımız)

3.5.3. Hayvan Model Çalışmaları (İn-vivo Deneyleri)

Tez kapsamında yapılan deneylerin bu aşamasında, hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlardan esinlenerek in-vivo çalışmaları Urmia Üniversitesi Pioneers

of Clinical Sciences merkezinde yapılmıştır. İn-vivo deneylerde literatür araştırma sonucu hayvan olarak nude fare kullanılmasına karar verilmiştir.

Hayvan deney çalışmaları birkaç evreden oluşmaktadır; Farelerde tümör oluşturma, Sentezlenen nanopartiküllerin tümörlü farelere enjeksiyonu, Enjekte edilen farelerde MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme) yardımıyla vücuttaki nanopartiküllerin görüntülenmesi, RF (Radyofrekans) hipertermi kullanarak tümör tedavisi, RF tedavi sonrası MRI kullanarak tümör boyut küçülmesinin ve tedavinin başarılı olup olmamasının değerlendirilmesi.

Nude farelerde tümör oluşturmak için ilk olarak fareler teker teker tartılıp daha sonra isoflurane kullanarak soluma anestezisi yapılmıştır. Devamında hazırlanan MCF-7 hücre çözeltilisinden 80 µl (yaklaşık 3,000,000 hücre) Subkutan (deri altı) ventral (karın kısmı) olarak enjekte edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin enjekte edildiği fareler iyi yaşam şartları altında beslenilmiştir. Birinci haftanın sonundan itibaren enjekte edilen kısımda tümör oluşumu göz ile görünür hale gelmektedir ve 3-4 hafta sonra tümörün boyutu deney yapılacak seviye kadar büyümektedir. (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. Nude farelerin beslenme ortamı ve tümör büyüme aşamasının değerlendirilmesi

Fareler deney esnasında nanopartiküllerin enjekte edilme şekline göre 3 gruba ayrılmıştır. Birincisi intra-tümör enjeksiyon grubu; antikor bağlı nanopartikül direkt olarak tümörün ortasına enjekte edilir. İkinci grup intra-venöz enjeksiyon; bu grubun farelerinde antikor bağlı nanopartiküller farenin kuyruk damarı yoluyla enjekte edilir. Üçüncü grup ise; kontrol grubu olarak seçilir. Daha sonra farelere hazırladığımız antikor bağlı altın kaplı nanopartikül enjekte edilmiştir. Nanopartikül dozajı intra-tümör grubu için 50 µl ve intra-venöz grubu için 150 µl olarak enjekte edilmiştir.

Enjeksiyondan sonra, vücuda enjekte edilen nanopartikülleri görüntülemek için MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme) kullanılmıştır. Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller, antikor sayesinde kanser hücrelerinin reseptörlerine spesifik olarak bağlanıp dolayısıyla tümöre toplanır ve bu nanopartiküllerin manyetit özelliğinden dolayı tümöre toplandıkça MRI görüntüsünde tümör siyah renk alıp görüntüsü tamamen kaybolur.

Tez kapsamında planlanmış hipertermi tedavi için in-vivo çalışmaların devamında RF radyasyonu, nanopartikül enjekte edilen fareler üzerinde kullanılmıştır. RF jeneratörü 120 W çıkış gücünde ve 144.015 MHz dalga şeklinde ayarlanarak tedavi 1 kez ve 50 dakika süre ile tümör üzerinde uygulanmıştır. Tedaviden sonra 3 hafta boyunca tümör boyutu ve görüntüsü gözlenip sonuçlar incelenmiştir.

3.5.4. Histopatoloji Değerlendirme

Histopatoloji, anormal doku üzere mikroskopik çalışma yöntemi ve hastalıklı dokunun histolojik incelenmesinde uzmanlaşan patoloji dalıdır. Anatomik patoloji açısından önemli bir araç olan histopatoloji, aynı zamanda kanser ve diğer hastalıkların doğru ve kesin teşhisi için kullanılır ve bu açıdan da büyük bir önem arz etmektedir.

Vücutta kanser oluşumun tam olarak teşhisinin konulabilmesi için mutlaka parça alınması ve bunun patoloji laboratuvarında incelenmesi gerekmektedir. Bu inceleme önce gözle yapılır, daha sonra ince kesitler alınarak mikroskop altında yapılmaktadır. Bazı durumlarda alınan ince kesitleri, çeşitli boya, kimyasal ve immünokimyasal maddeler ile muameleye tabi tutularak mikroskop altında incelenmek gerekmektedir.

Meme kanserinde patoloji raporu; tümörün yapısı (Duktal ve/veya Lobüler), tümörün kanal veya süt bezinin dışına çıkıp çıkmadığı, hücresel grade (seviye), nekroz durumu, tümörün çapı, lenfatik ve vasküler invazyon (saldırı) durumu ve cerrahi sınırlar hakkında bilgi vermektedir.

Histopatoloji değerlendirme aşamasında patoloji laboratuvarına gelen dokuların histopatolojik ve histomorfolojik görüntüleri alınıp ve incelenmiştir. Histopatoloji deneyi, numunelerin hazırlanması ve numunelerin ışık mikroskopu altında incelenmesinden oluşmaktadır. Örnek doku % 10 formalin ile sabitlenir, parafin içine

gömülür ve Mikrotom cihazı ile 2-3 mm kalınlığında dilimlenir. Parafin Wax' tan arındırılmış doku dilimleri bir sonraki aşamada, hematoksilin–eozin (H&E) ile boyanıp veya başka bir işlem için kullanılır [124].

Histopatolojik değerlendirme süreci boyunca, standart, güvenilir ve yorumlanabilir sonuçlar elde etmek için çok sayıda kritik adım ve prosedür izlenmesi gerekmektedir. Şekil 3.7. dokuların histopatoloji değerlendirme aşamalarını detaylı bir şekilde göstermektedir.



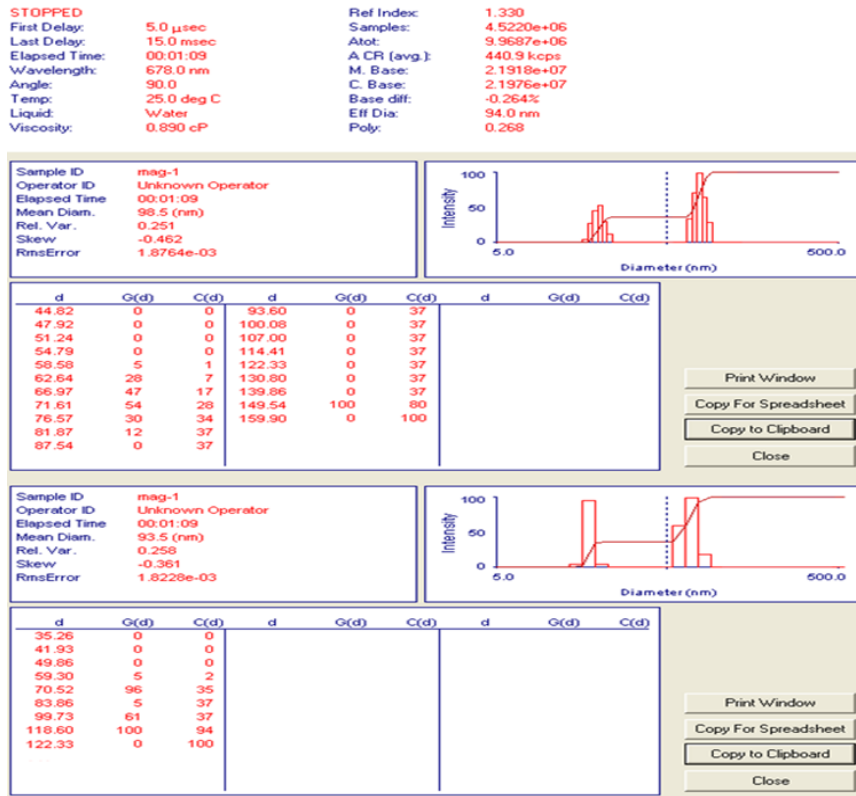
Şekil 3.7. Dokunun histopatoloji testi ve değerlendirme aşamaları

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Sentezlenen Nanopartiküllerin Boyut Analizi

4.1.1. Manyetit Nanopartiküllerin Boyut Analizi (Zeta-sizer)

Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin hidrodinamik boy dağılımını ölçmek için zeta-sizer (Zetapals) cihazı kullanılmıştır. Bunun için zeta-sizer cihazın küvetinin içindeki 1 ml saf suya 10 µl manyetit nanopartikül eklenip cihaza yerleştirilip ölçüm yapılmıştır. Şekil 4.1’ de tipik bir dağılım eğrisi verilmiştir. Sonuçlar manyetit nanopartiküllerin farklı boyutlarda sentezlendiğini ve onların ortalama boyutunun 93 nm olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.1)

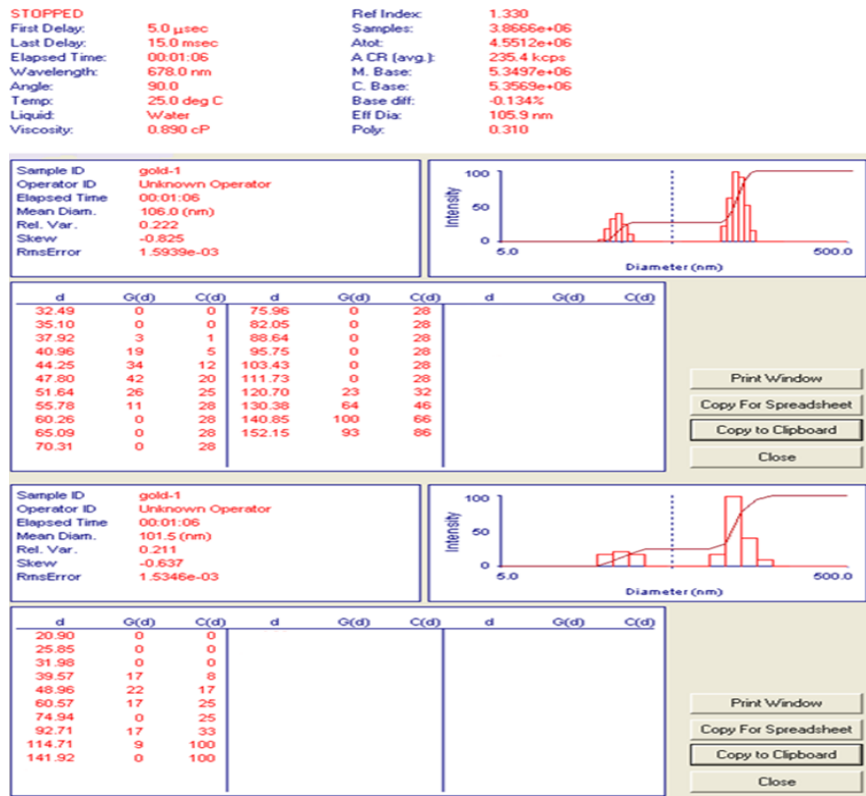


Şekil 4.1 Zetapals cihazında ölçülen manyetit nanopartiküllerin boyutu

Zeta-sizer cihazın çalışma prensibi olan dinamik ışık saçılması yönteminin kısıtlamalarından dolayı nanopartiküllerin gerçek boyutu yukarıdaki grafikten daha küçük olup gerçek boyutları TEM analizinde elde edilmiştir.

4.1.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Hidrodinamik Çap Ölçümü

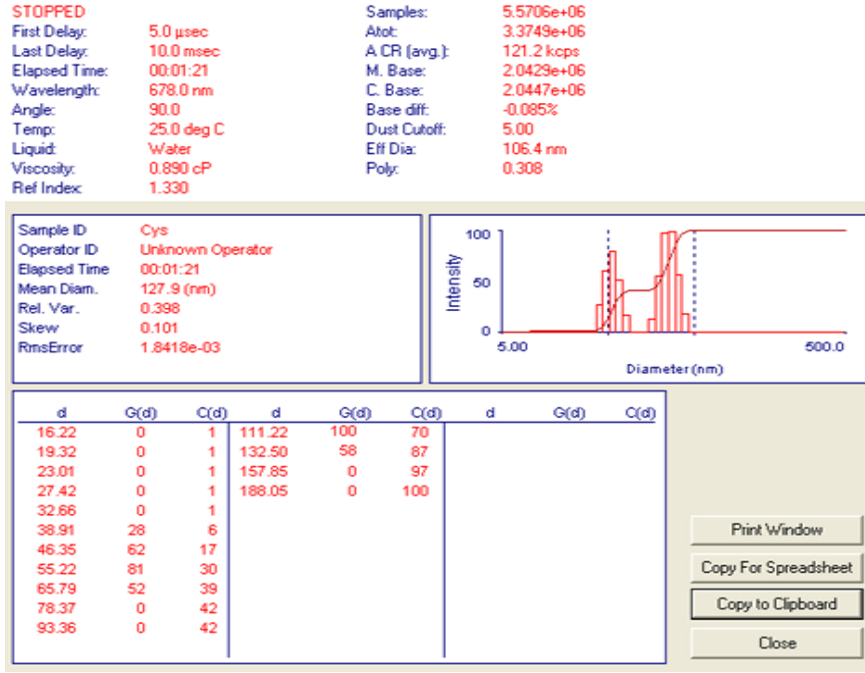
Manyetit nanopartiküller altın ile kaplandıktan sonra nanopartiküllerin boyutu zetapals cihazı ile incelenmiştir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortalama büyüklüğü 106 nm olarak kaydedilmiştir. Böylece altın kaplama kalınlığının yaklaşık 12 nm olduğu söylenebilir. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boy dağılımı (zeta-sizer)

4.1.3. Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Boyut Analizi

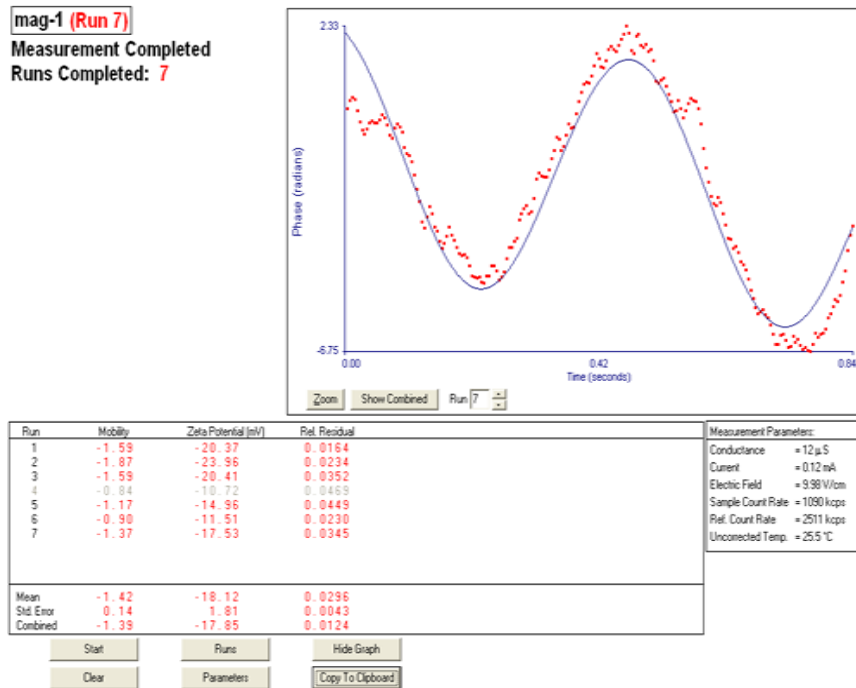
Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boyut dağılımı, sisteamin molekülü ile yüzey modifikasyonu yapıldıktan sonra da incelenmiştir. Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortalama boyutları 127 nm olarak kaydedilmiştir. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta-sizer analizi

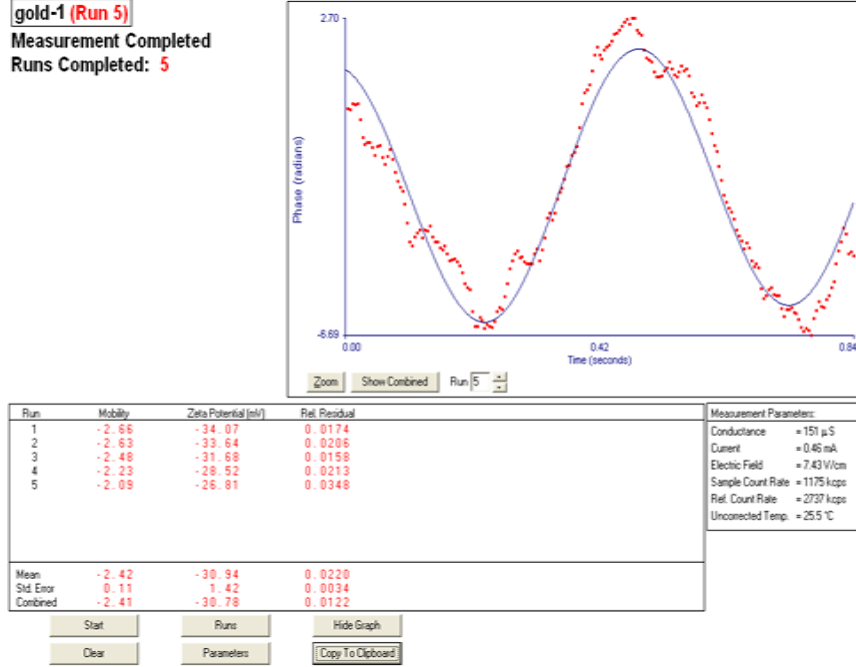
4.2. Sentezlenen Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

Manyetit, altın kaplı manyetit ve sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyeli (nanopartiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü) zetapals cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri şekil 4.4'te gösterildiği gibi -18 mv olarak kaydedilmiştir.



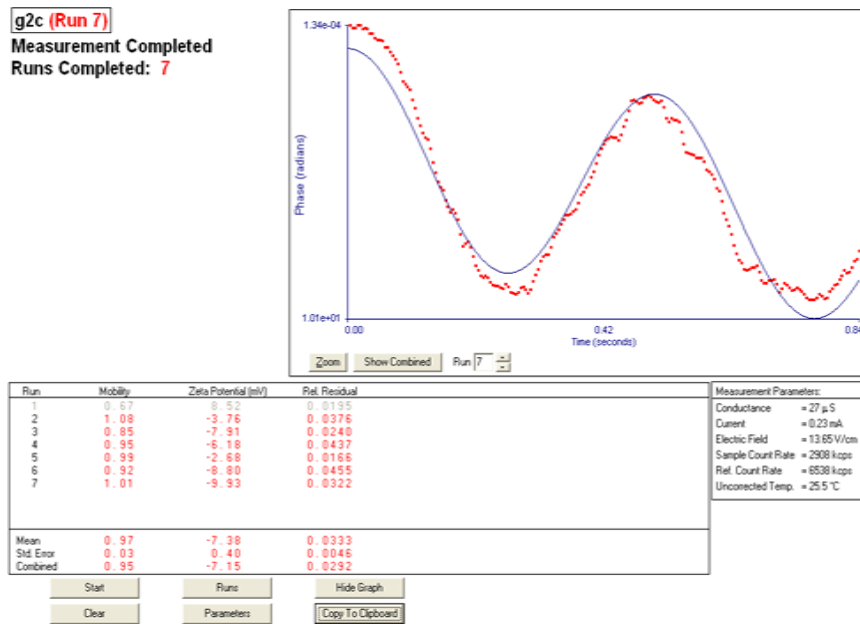
Şekil 4.4 Manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri (mv)

Manyetit nanopartiküller altın ile kaplandıktan sonra yüzey yükleri (zeta potansiyeli) ve boyut dağılımları değişmektedir ve bu sonuçlar kaplama için bir kanıt olarak gösterilmektedir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortalama zeta potansiyeli -30 mv olarak hesaplanmıştır. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi

Altın kaplı manyetit nanopartiküllere sistemin bağlandıktan sonra ortalama zeta potansiyeli -7 mv olarak kaydedilmiştir. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 Sistemin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi

Zetapals cihazı kullanarak sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizlerinin sonucu aşağıdaki çizelgede verilmektedir.

Çizelge 4.1 Sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel sonuçları

	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mv)
Manyetit Nanopartikül	93	-18
Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül	106	-30
Yüzey modifiye altın kaplı manyetit nanopartikül	127	-7

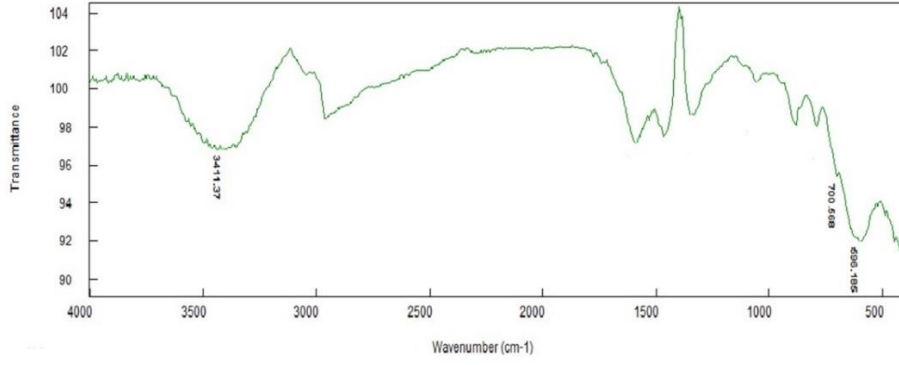
4.3. Nanopartiküllerin FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopi)

Analizi

Manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması, altın kaplı nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ve sisteamin ile yüzey modifikasyon yapılan nanopartiküllere antikor bağlanmasını göstermek için FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopi) analizi yapılmıştır.

4.3.1. Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi

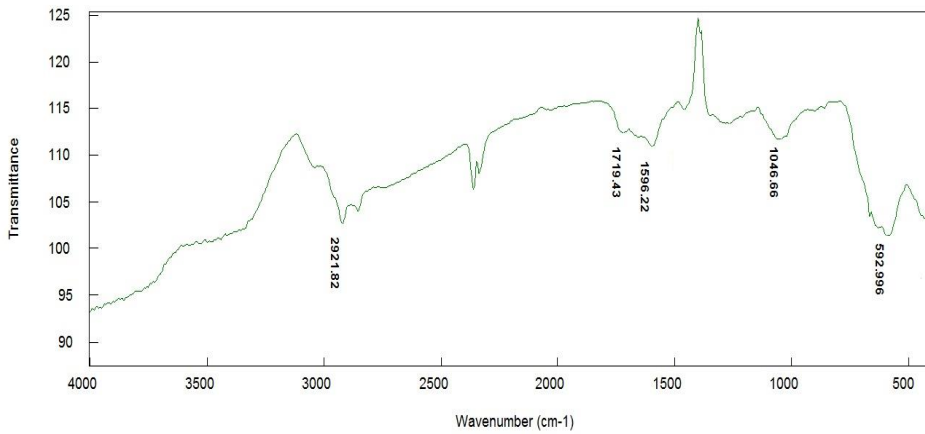
Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Bunun için eser miktarda örnekler, örnek kısmına yerleştirilmiş (ATR yöntemi) ve örneklerin spektrumları oda sıcaklığında çekilmiştir. Manyetit nanopartiküllerin FTIR analizinde gözlenen 596 ve 700 cm^{-1} pikleri demir oksit nanopartiküllerin Fe-O bağı titreşimine (karakteristik pikler) aittir. Bu karakteristik pikler manyetitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini işaret eden piklerdir. 3411'deki pik ise Fe₃O₄ nanopartiküllerin tarafından emilen OH' ı göstermektedir. FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatürde rapor edilenlerle uyum içindedir.



Şekil 4.7 Manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi

4.3.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi

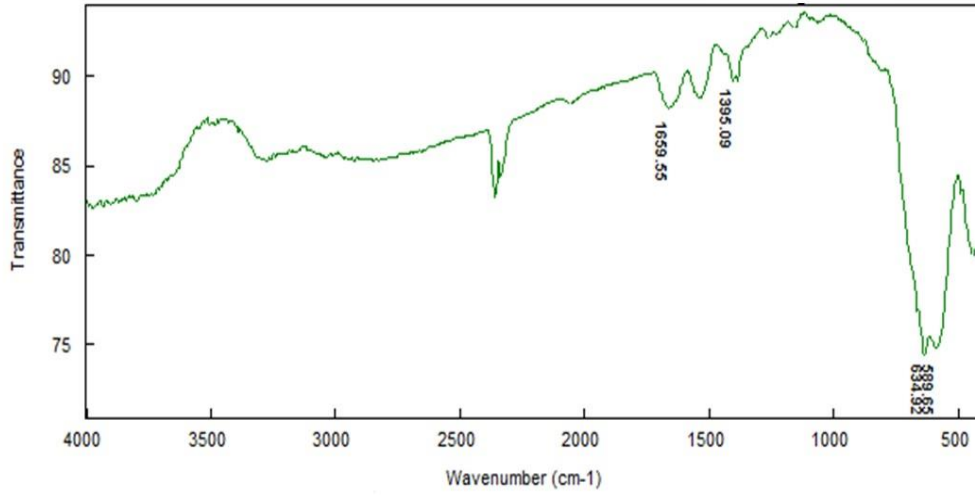
Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizine baktınız zaman, manyetit nanopartiküllerdeki 596 cm^{-1} pik 592 cm^{-1} 'e kaymış ve 700 cm^{-1} 'deki pik tamamen kaybolmuş, 1719 ve 1596 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler sırasıyla manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat yapısındaki karboksilat gruplarına ve $\text{CH}_2\text{-O}$ deformasyonuna ait piklerdir. Bu sonuçlar, Fe_3O_4 nanopartiküllerin altın iyonları ile kaplanmasını göstermektedir. (Şekil 4.8)



Şekil 4.8 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi

4.3.3. Sisteamin Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin FTIR Analizi

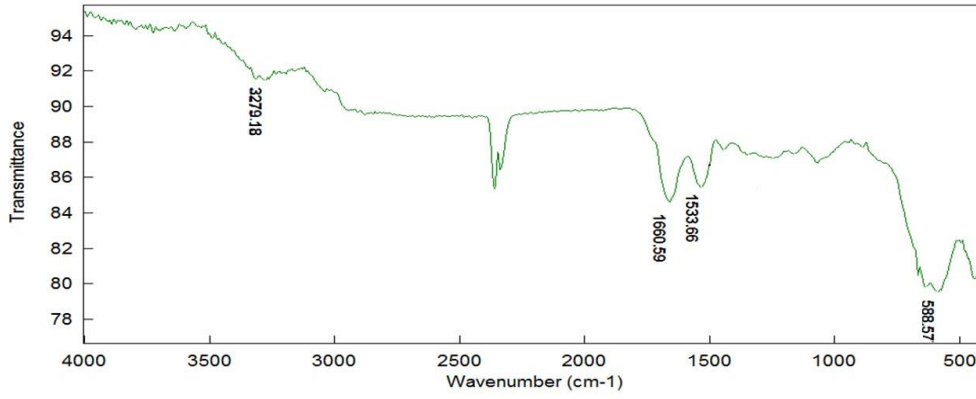
2-aminoethantiyol bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizine baktığımız zaman, 1659 cm^{-1} 'deki pik N-H bağı ve 1395 cm^{-1} 'deki pik C-N (HSCH₂CH₂NH₂) bağına ve 589 cm^{-1} 'deki pik Fe-O bağı titreşimine aittir. Sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR sonuçlarını altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR sonuçları ile kıyasladığımız zaman, N-H bağı ve C-N bağı görülmemektedir çünkü altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yapısında nitrojen ve karbon bulunmamaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak sisteamin molekülünün altın kaplı manyetit nanopartiküllere bağlandığını söyleyebiliriz. (Şekil 4.9)



Şekil 4.9 2-aminoethantiyol bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi

4.3.4. Antikor İmmobilizasyonlu Nanopartiküllerin FTIR Analizi

Yüzeyi modifiye olmuş altın kaplı nanopartiküllere antikor immobilizasyonu yapıldıktan sonra FTIR analizi yapılmıştır. FTIR analizinde, 1660 cm^{-1} 'deki pik güçlü C=O bağına, 3280 cm^{-1} 'deki pik ikincil Amin'in N-H bağına, 1534 cm^{-1} ve 1660 cm^{-1} 'deki pikler sekonder ve primer amitlerin N-H bağına aittir. Sonuçlar, antikorun başarılı bir şekilde nanopartiküllere bağlandığını göstermektedir. (Şekil 4.10)

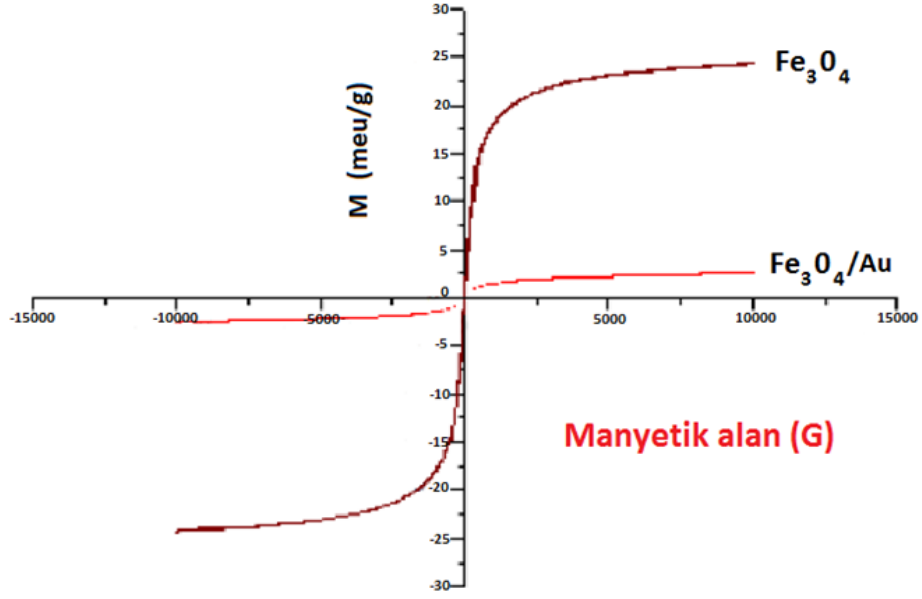


Şekil 4.10 Antikor immobilizasyonu altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizi

4.4. Titreşimli Manyetometre ile Nanopartiküllerin Doğunluk Miknatıslığı Analizi

Titreşimli örnek manyetometre (VSM), manyetik özellikleri ölçen bilimsel bir araçtır. Bir numune, miknatıslanması için muntazam bir manyetik alanın içine yerleştirilip sinüzoidal olarak titreşime tabi tutulur. Başlatma bobininde oluşan voltaj, numunenin manyetik momenti ile orantılıdır, ancak uygulanan manyetik alanın mukavemetine bağlı değildir.

Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikül 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doğunluk miknatıslığı gösterirken altın kaplı manyetit nanopartikül (Au@SPIONs) 10000 Gauss manyetik alanda 3 emu/g (Ms) doğunluk miknatıslığı göstermektedir. Manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu doğunluk miknatıslığının azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla manyetit nanopartiküllerin etrafının altın ile kaplanması sonucu nanopartiküllerin manyetik özelliğinin azaldığını söylenebilir. (Şekil 4.11)

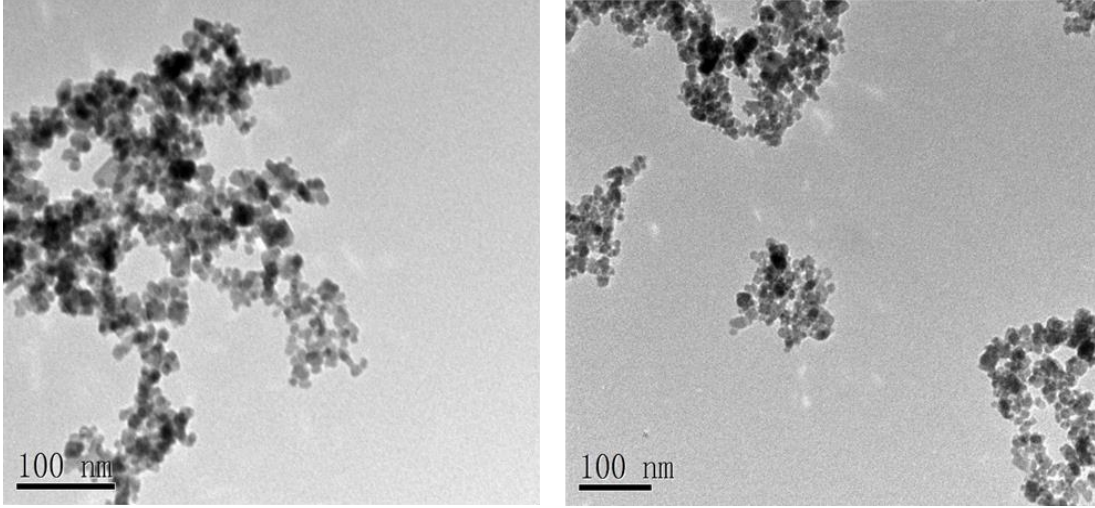


Şekil 4.11 Fe₃O₄ ve Au@SPIONs nanopartiküllerin mıknatıslık eğrileri

4.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskop) Analizi

4.5.1. Manyetit Nanopartiküllerin TEM Analizi

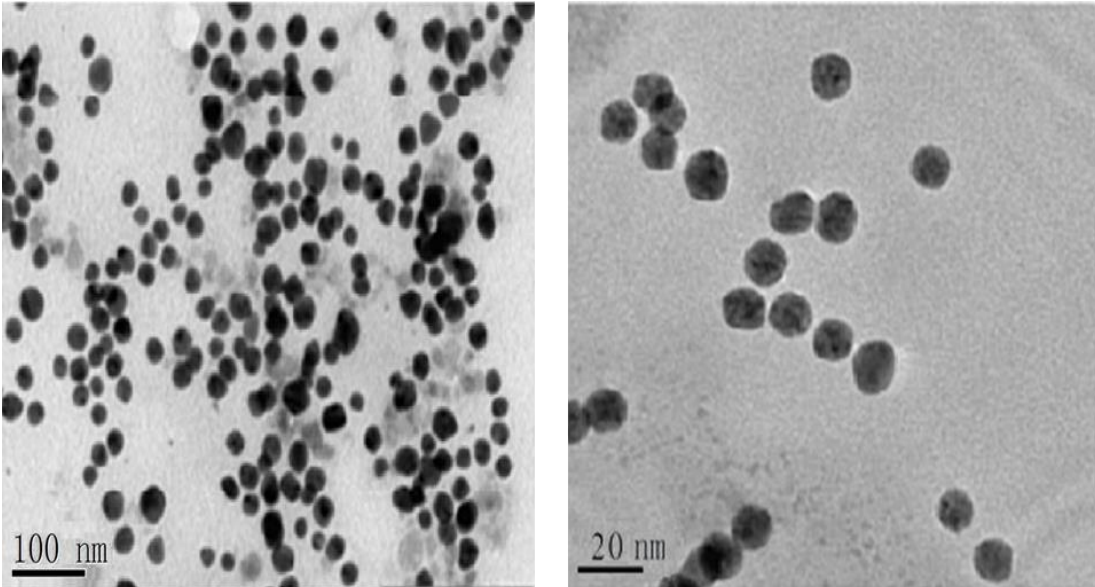
Zeta-sizer cihazının çalışma prensibi olan dinamik ışık saçılma yönteminden kaynaklanan kısıtlamalardan dolayı, nanopartiküllerin gerçek boy dağılımının tespiti için TEM kullanılmıştır. Bunun için manyetit nanopartiküller seyreltikten sonra geçirimli elektron mikroskopu deneyleri için kullanılan grid üzerine yerleştirilmiş ve yüksek enerjili elektronlar örnekler içinden geçirilip görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, manyetit nanopartiküllerin görüntüsü bulanık, çünkü nanopartiküllerin manyetik özellikleri, onların grid üzerinde toplanmalarına neden olur ve bu elektron ışını parçacıkları ile etkileşime girer. TEM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre, manyetit nanopartiküllerin boyutları, 10-15 nm civarında olduğu ispatlanmaktadır.



Şekil 4.12 Manyetit nanopartiküllerin TEM analizi

4.5.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin TEM Analizi

Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM analizine baktığımız zaman, şekil 4.13'de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküller altın ile kapladıktan sonra, aldığımız görüntü çok daha net ve nanopartiküllerin gerçek boyutlarını göstermektedir. TEM görüntüsünden elde edilen değerlere göre, nanopartiküllerin % 80'ni 20-30 nm boyutundadır.



Şekil 4.13 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM analizi

4.6. Ninhydrin Test Analizi

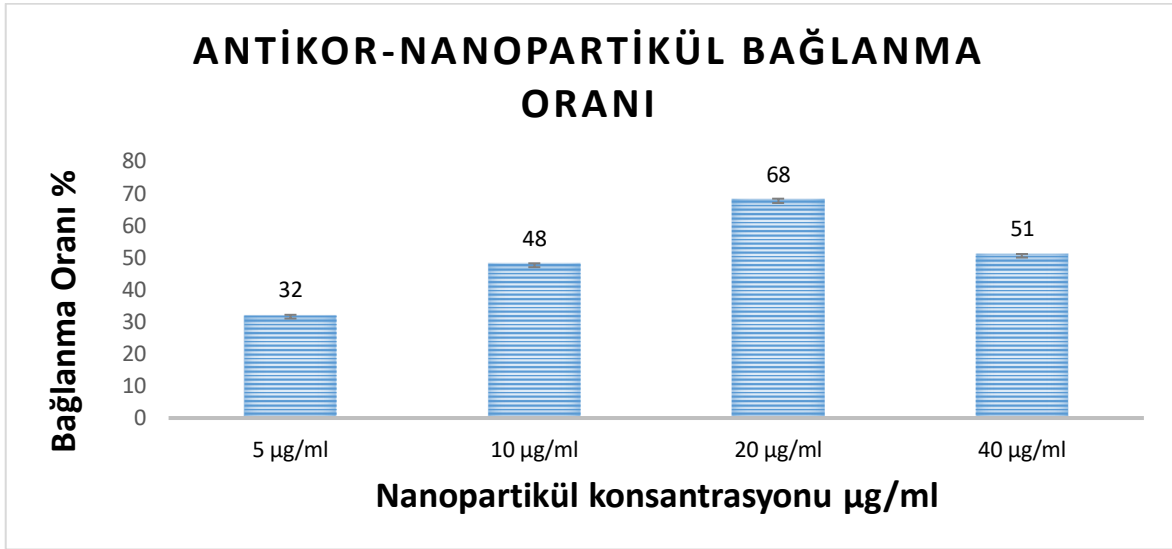
Antikorların, sisteamin bağlı altın kaplı nanopartiküllere bağlandığını göstermek için Ninhydrin testi kullanılmıştır. Ninhydrin, amonyak veya birincil ve ikincil aminleri tespit etmek için kullanılan bir kimyasal ve oda sıcaklığında etanol ve asetonda çözünen beyaz bir katı maddedir. Ninhydrin serbest aminler ile reaksiyona girdiğinde, Ruhemann'ın moru olarak bilinen çok koyu mavi veya mor renk ortaya çıkar. Bu amaçla antikorların altın kaplı manyetit nanopartiküllere bağlandığını göstermek için ilk olarak ninhydrin solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 0.35 g ninhydrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) tozu 100 ml etanol' da çözülmüştür. Daha sonra 500 µl antikor bağlı altın kaplı nanopartikül süspansiyonuna, 500 µl ninhydrin solüsyonu eklenmiş ve süspansiyon kaynar su içerisinde 4 dakika bekletilmiştir. Sürecin sonunda karışım siyah (çok koyu mor) renge dönüştü ki bu süspansiyonda antikor olduğunun ispatıdır.

4.7. Monoklonal Antikor-Nanopartikül Bağlanma Oranı

Yapılan bu çalışmada monoklonal antikor farklı konsantrasyonlardaki modifiye altın kaplı manyetit nanopartiküller ile etkileşime bırakılmış ve sonuçlara göre in-vitro ve in-vivo deneylerde en yüksek bağlanma oranı olan nanopartikül konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu amaçla antikor miktarı (10 µg/ml) sabit tutularak 4 farklı nanopartikül konsantrasyonu ile (5, 10, 20, 40 µg/ml) etkileştirilmiştir. Etkileştirme sonucu elde edilen örnekler santrifüjlenmiş ve su ile birkaç kez yıkanmıştır. Daha sonra antikor immobilize modifiye nanopartiküller 1 ml distile su içerisinde dağıtılmıştır. Antikor bağlanma yüzdesini elde etmek için Cobas Integra 400 plus cihazı kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki çizelgede verilmektedir. (Şekil 4.14)

Çizelge 4.2 Antikor-Nanopartikül bağlanma oranı

mAb µg/ml	Np µg/ml	Bağlanma µg/ml	Bağlanma oranı %	STDEV.S
10	5	3.2	32	0.15811
10	10	4.8	48	0.2
10	20	6.8	68	0.33912
10	40	5.1	51	0.1



Şekil 4.14 Antikor-Nanopartikül bağlanma oranı

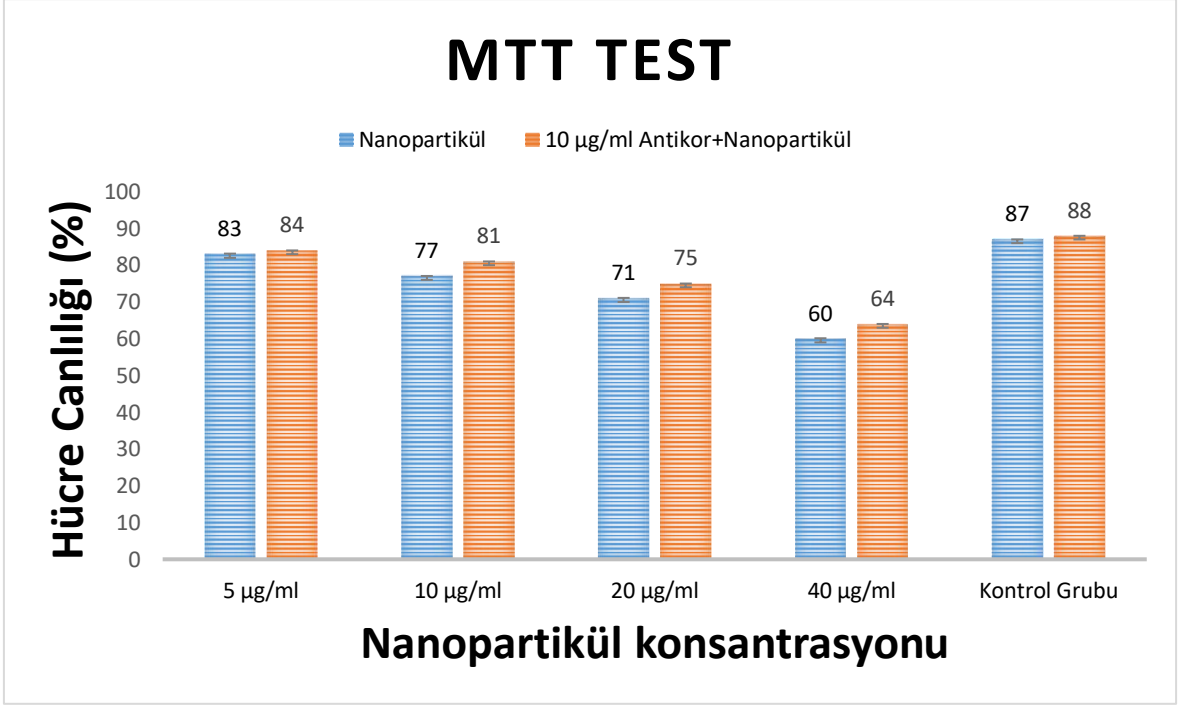
4.8. Sitotoksosite Testi

Nanopartiküllerin ve antikor bağlı nanopartiküllerin toksisitesini belirlemek için MTT testi yapılmıştır. MTT testinde 3T3 (3T3 hücre hattı - standart fibroblast hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır. Dört farklı konsantrasyonlarda nanopartikül ve antikor bağlı nanopartikül çözeltisi hazırlanmış (5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$) ve hücrelerle muamele edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki çizelgelerde verilmektedir. (Şekil 4.15)

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyondaki nanopartikül ve antikor bağlı nanopartiküllerin sitotoksosite test sonuçları

Nanopartikül	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	Kontrol
Hücre Canlılığı %	83	77	71	60	87

Nanopartikül bağlı antikor	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	Kontrol
Hücre Canlılığı %	84	81	75	64	88



Şekil 4.15 Sitotoksosite test sonuçları

Bir önceki aşamadan elde edilen sonuçlara göre en yüksek bağlanma oranı 20 µg/ml nanopartikel konsantrasyonunda gerçekleşti ve diğer yandan MTT test sonuçları da göz önüne alınarak in-vitro ve in-vivo deneylerde 20 µg/ml konsantrasyonu kullanılmıştır.

4.9. İn-vitro Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

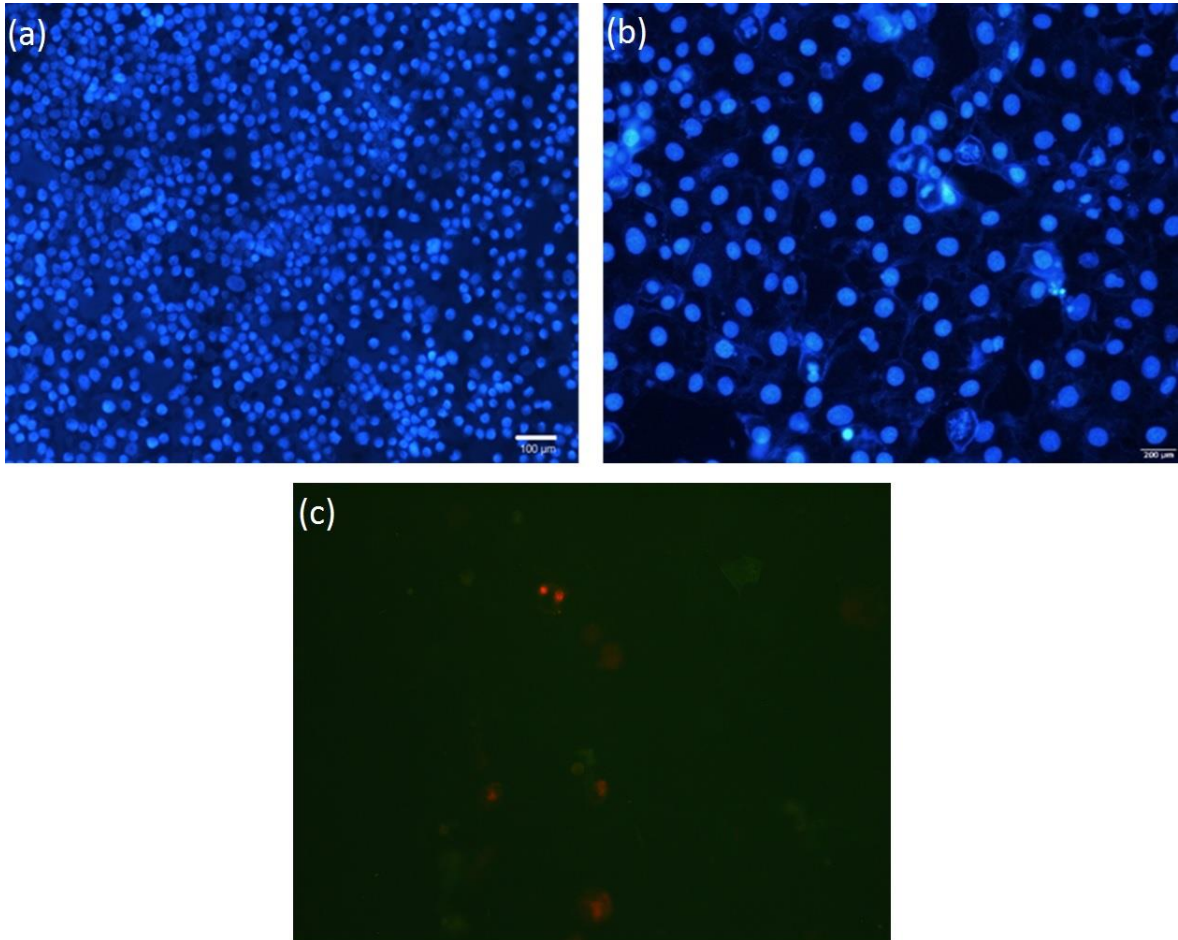
Hücre kültürü çalışmaları için daha önceden literatürde çalışılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiş MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri uygun hücre kültürü şartlarında hazırlanmış, devamında hücreler, hücre sayım cihazı kullanarak sayılmış ve 48 well ve her well 10000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve örneklerle (Altın kaplı manyetit, Antikor bağlı altın kaplı manyetit) 48 saat boyunca etkileştirilmiştir. 48 saatin sonunda hücreler ikili apoptoz nekroz boyama yöntemiyle boyanıp ve Floresan Mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak değerlendirilmiştir. Üçüncü grupta ise altın kaplı manyetit nanopartiküller, hücre kültürüne eklendikten sonra RF radyasyonu yapılmıştır. RF radyasyonu için anten model RF (144.015 MHz, 120 W, 50 dk.) kullanılmıştır. Daha sonra hücreler ikili

apoptoz nekroz boyama yöntemiyle boyanıp ve Floresan Mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları 4 grup şeklinde yapılmıştır. Birincisi kontrol grubu; kontrol grubu hücrelerinin apoptoz, nekroz ve canlılık oranını hesaplamak için 10 farklı alan ve yaklaşık 1000 hücre sayılarak incelenmiştir. Bu grubun sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmektedir. (Şekil 4.16)

Çizelge 4.4 Kontrol grubunda apoptoz ve nekroz oranı

	Canlılık indeksi yüzde (%)	Apoptoz Oranı %	Nekroz Oranı %
Kontrol Grubu	91.61	6.56	2.34



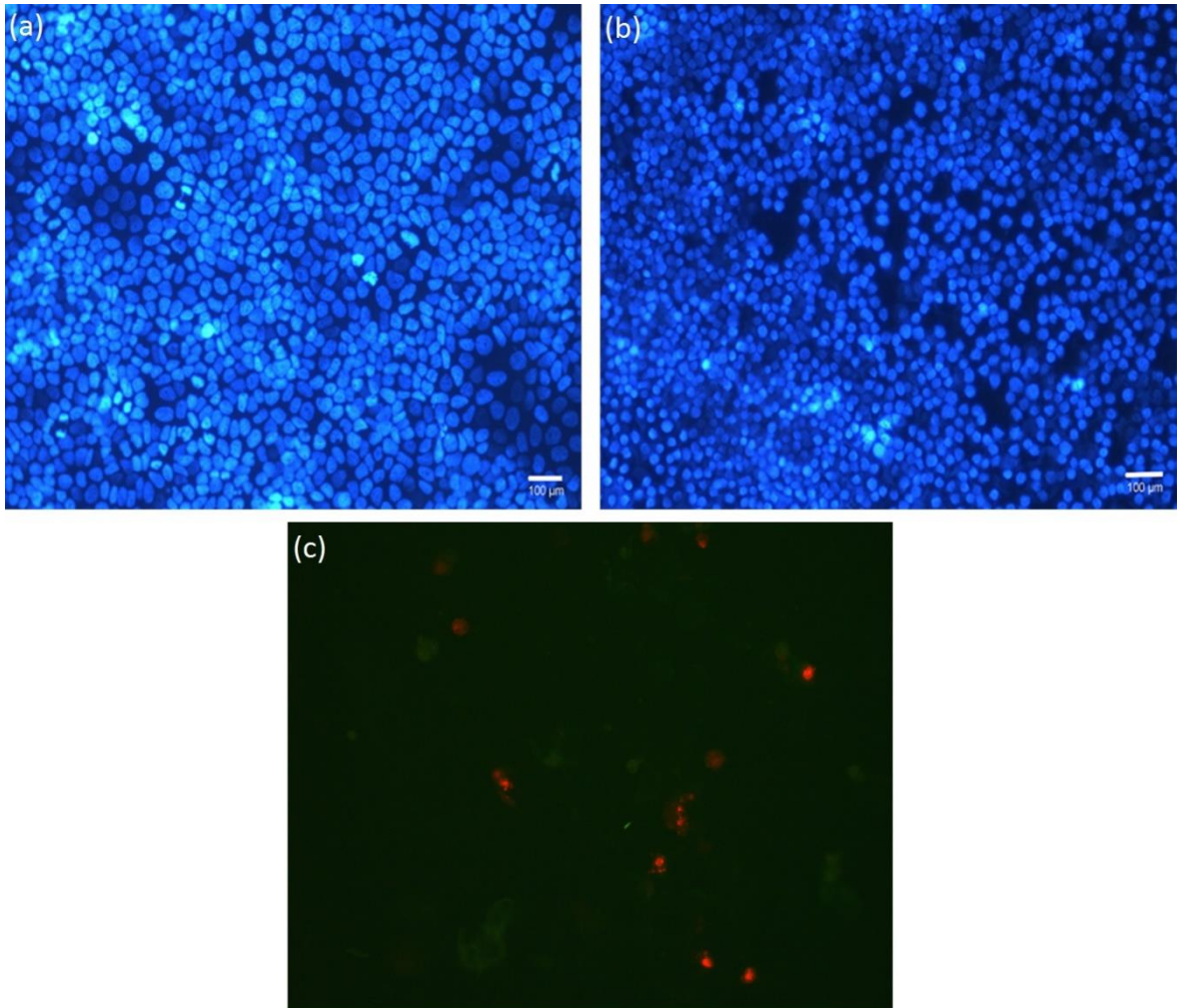
Şekil 4.16 MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopta DAPI filtresi (a,b) ve FITC (480-520 nm dalga boyu)(c) kullanılarak çekilen fotoğrafları

Kontrol grubundan elde edilen veriler hücrelerin sağlıklı olduklarına işaret etmektedir.

Hücre kültür çalışmalarında ikinci grup, altın kaplı manyetit nanopartikül grubu olarak ayarlanmıştır. Bu amaçla 20 µg/ml altın kaplı manyetit nanopartikülün hücreler üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Dolayısıyla MCF-7 hücre kültürüne altın kaplı manyetit nanopartiküller ilave edilip inkübe edildikten sonra şekil 4.17’de görüldüğü gibi apoptoz, nekroz ve canlılık değerleri 10 farklı alan ve 1000 hücre sayılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede verilmektedir.

Çizelge 4.5 Altın kaplı manyetit nanopartikül grubunda apoptoz ve nekroz oranı

	Canlılık indeksi %	Apoptoz Oranı %	Nekroz Oranı %
Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküller	83.3	10.44	6.53

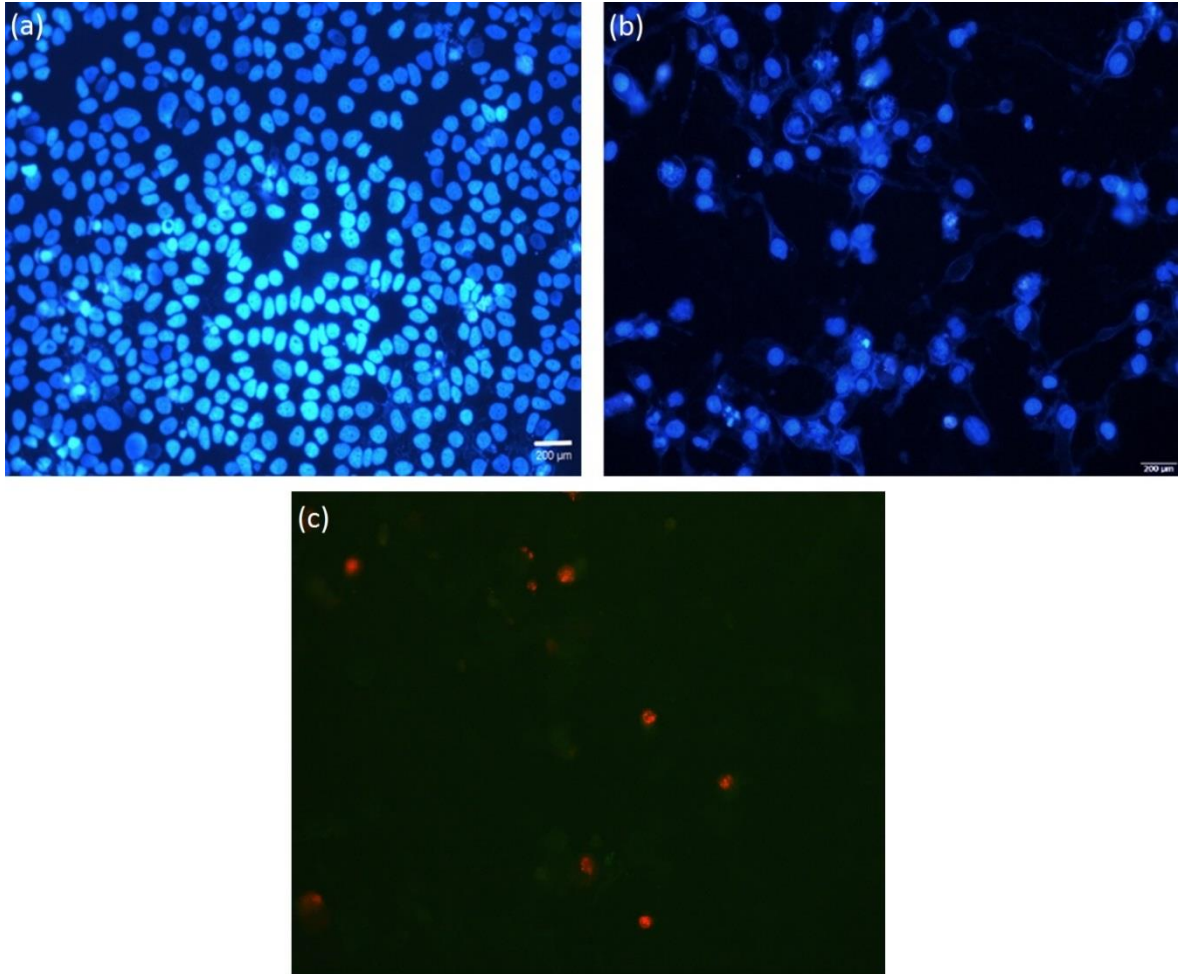


Şekil 4.17 Altın kaplı nanopartiküllerin(20 µg/ml) MCF-7 hücreleriyle etkileşimini gösteren fotoğraflar; (a,b) DAPI filtresi ve (c) FITC (480-520 nm dalga boyu)

İn-vitro çalışmalarında üçüncü grupta MCF-7 hücre kültürüne antikor bağlı altın kaplı nanopartikül ilave edilmiştir. Bu gruptaki hücelere RF hipertermisi uygulanmamıştır. Bu deneyde 20 µg/ml antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartikül hücrelerle etkileşime sokulmuş ve şekil 4.18’de görüldüğü üzere hücrelerin canlılık, apoptoz ve nekroz oranı hesaplanması için 10 farklı alanda 1000 hücre sayılarak incelenmiştir. Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin RF’den önce, hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmektedir.

Çizelge 4.6 Antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartiküllerin apoptoz ve nekroz oranı

	Canlılık indeksi %	Apoptoz Oranı %	Nekroz Oranı %
Antikor Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküller	84.47	9.23	6

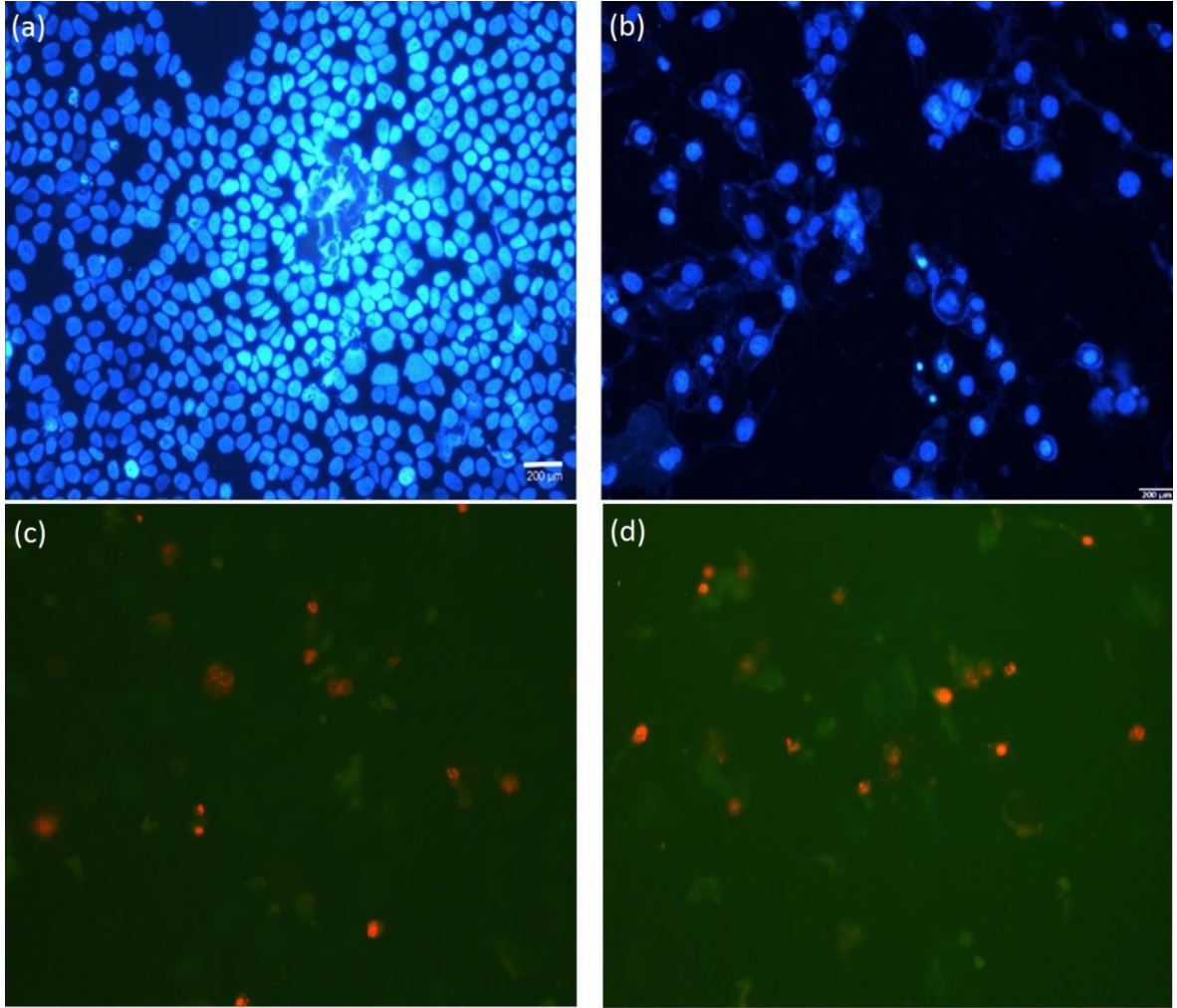


Şekil 4.18 Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller (20 µg/ml) ile MCF-7 hücrelerin etkileşimlerinin RF’den önce fotoğrafları; (a,b) DAPI filtresi ve (c) FITC (480-520 nm dalga boyu)

Hücre kültürü deneylerin dördüncü grubunda ise nanopartiküller MCF-7 hücrelere ilave edildikten sonra RF hipertermisi (144.015 MHz, 120 W, 50 dk.) uygulanmıştır. Bu grupta da diğerleri gibi 10 farklı alanda 1000 hücre sayılarak inceleme yapıp canlılık indeksi yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Elde edilen apoptoz ve nekroz oranı çizelge 4.7’de verilmektedir. (Şekil 4.19)

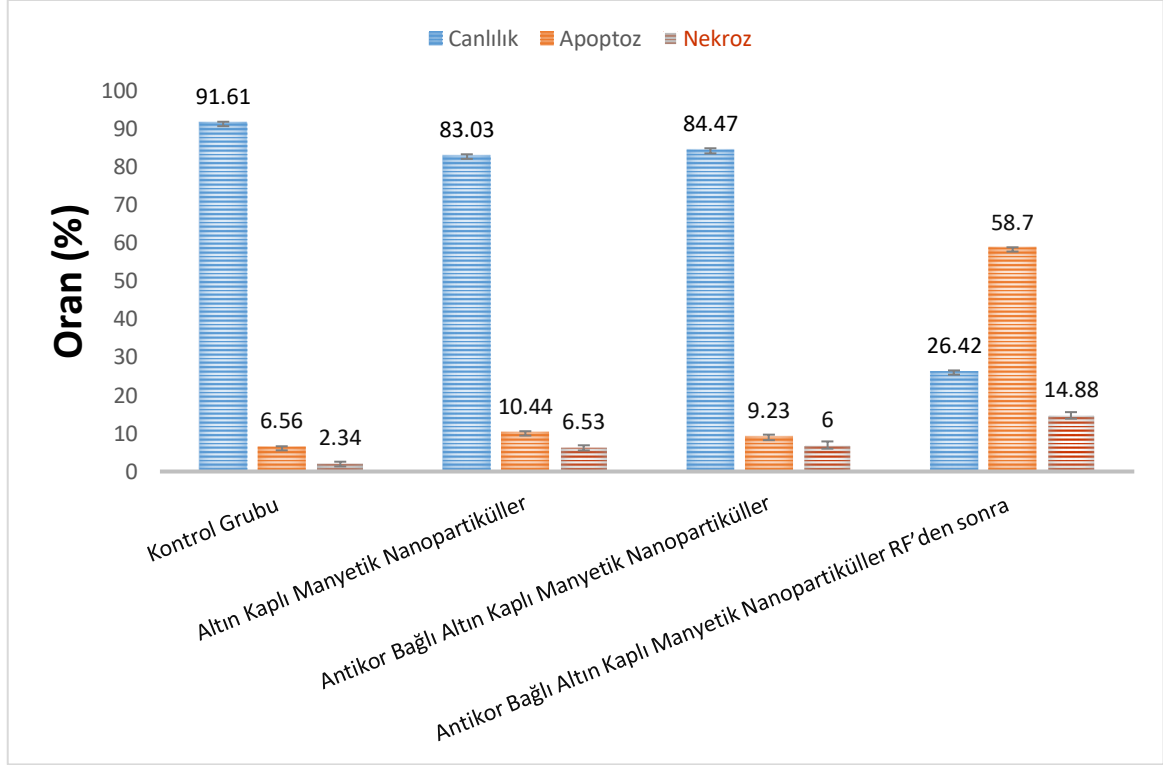
Çizelge 4.7 Antikor bağlı nanopartiküller ile MCF-7 hücreler etkileşimine RF uygulandıktan sonra elde edilen apoptoz ve nekroz oranı

	Canlılık indeksi %	Apoptoz Oranı %	Nekroz Oranı %
Antikor Bağlı Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküller RF’den sonra	26.42	58.7	14.88



Şekil 4.19 Antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküller (20 µg/ml) ile MCF-7 hücrelerin etkileşimlerinin RF’den sonra fotoğrafları; (a,b) DAPI filtresi ve (c,d) FITC (480-520 nm dalga boyu)

Antikor bağı altın kaplı manyetit nanopartiküller ile MCF-7 hücrelerin etkileşimlerine RF hipertermi uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlara göre, bize hiperterminin başarılı bir şekilde apoptoz ve nekrozu indüklediğini göstermektedir. (Şekil 4.20)



Şekil 4.20 Hücre kültürü deneylerinden elde edilen sonuçlar

4.10. İn-vivo Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

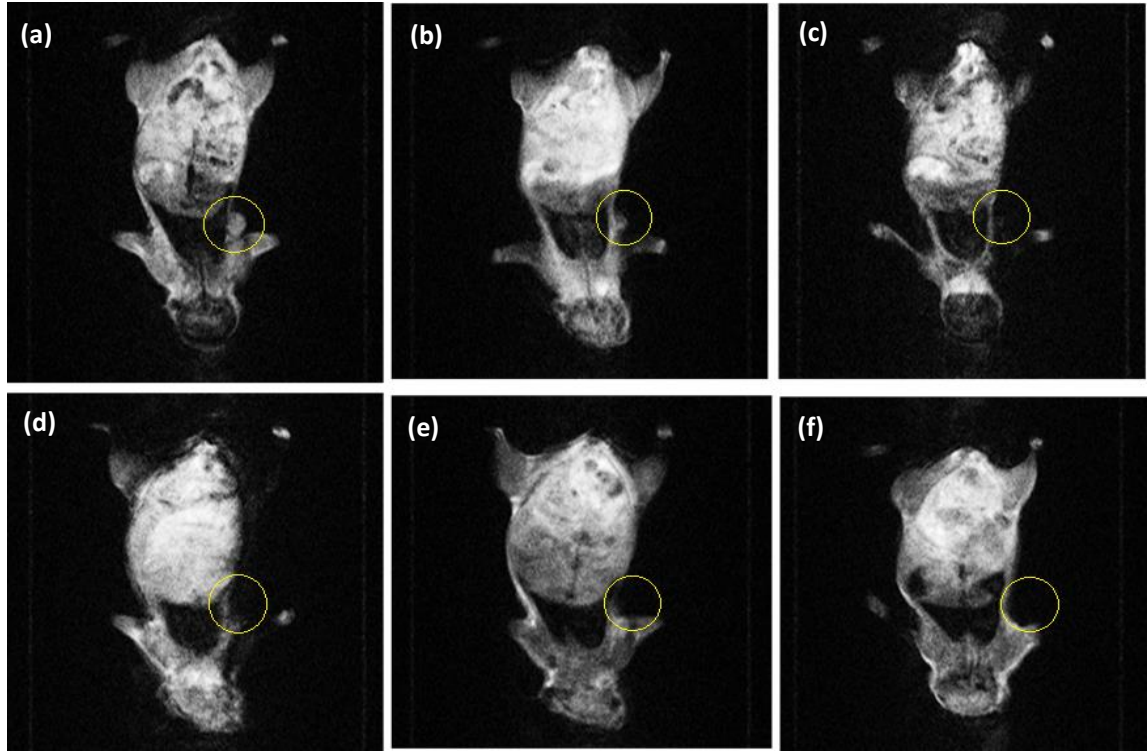
İn-vivo çalışmaları Urmia Üniversitesi Pioneers of Clinical Sciences merkezinde yapılmıştır. Kanser hücresi (MCF-7 meme kanser hücre hattı) enjekte edilerek, vücudunda tümör oluşan nude fareler, hayvan deneylerinde 3 gruba ayrılarak deneye başlanmıştır; Kontrol grubu, İntra tümör enjeksiyon grubu ve İntra venöz enjeksiyon grubu.

Daha sonra farelere (kontrol grubundakiler hariç) hazırladığımız antikor bağı altın kaplı manyetit nanopartikül enjekte edilmiştir. Kontrol grubundaki farelere de sadece altın kaplı manyetit nanopartikül enjekte edilmiştir. Kontrol grubundaki fareler nanopartikülün enjeksiyon yoluna göre iki gruba ayrılmıştır (intra tümör kontrol grubu ve intra venöz kontrol grubu). Nanopartikül dozajı intra tümör grubu için 50 µl ve intra venöz grubu için 150 µl olarak hesaplanıp enjekte edilmiştir. İntra tümör

grubunda, nanopartiküller tümörün tam orta kısmına ve intra venöz grubunda ise, nanopartiküller kuyruk kısmındaki venöz içine enjekte edilmiştir. Enjekte edilen nanopartikülleri farelerin vücudunda görüntülemek için MRI (Manyetik rezonans görüntüleme) kullanılmıştır.

Enjekte edilen nanopartiküllerin manyetik özelliğinden dolayı MRI (Manyetik rezonans görüntüleme) görüntüsü alındığında vücudun her hangi bir kısmına veya organına toplandığı zaman o bölge veya organın görüntüsü siyah bir hal alıp fotoğrafta kaybolur.

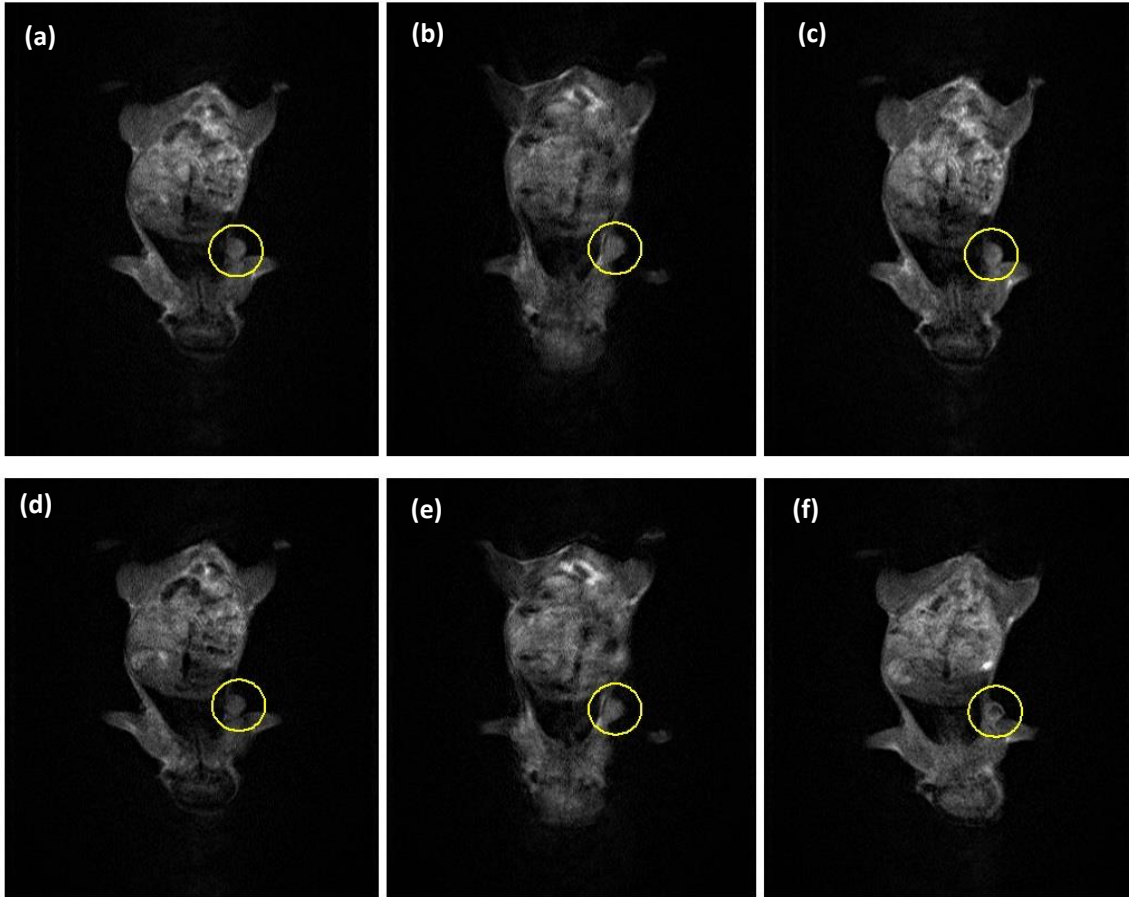
Nanopartiküller intra venöz olarak enjekte edilen grupta, şekil 4.21'deki fotoğraflarda gösterildiği gibi, enjeksiyondan 2 saat sonra nanopartiküller tümör bölgesine toplanmaya başlar ve enjeksiyondan 4 saat geçtikten sonra nanopartiküller tüm kanserli hücrelere bağlanır. Görüldüğü gibi nanopartiküller tümöre toplandıkça tümör siyah olup fotoğrafta kayboluyor. Nanopartiküllerin kanserli hücrelere bağlandığından dolayı 24 saat sonra MRI görüntüsü alındığında, hala tümör bölgesi siyah görülmektedir ve bu tasarlayıp sentezlediğimiz nanopartiküllerin, kanserli hücrelere bağlandığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.21 İntra venöz grubuna antikör bağlı nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a) Enjekteden hemen önce b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra

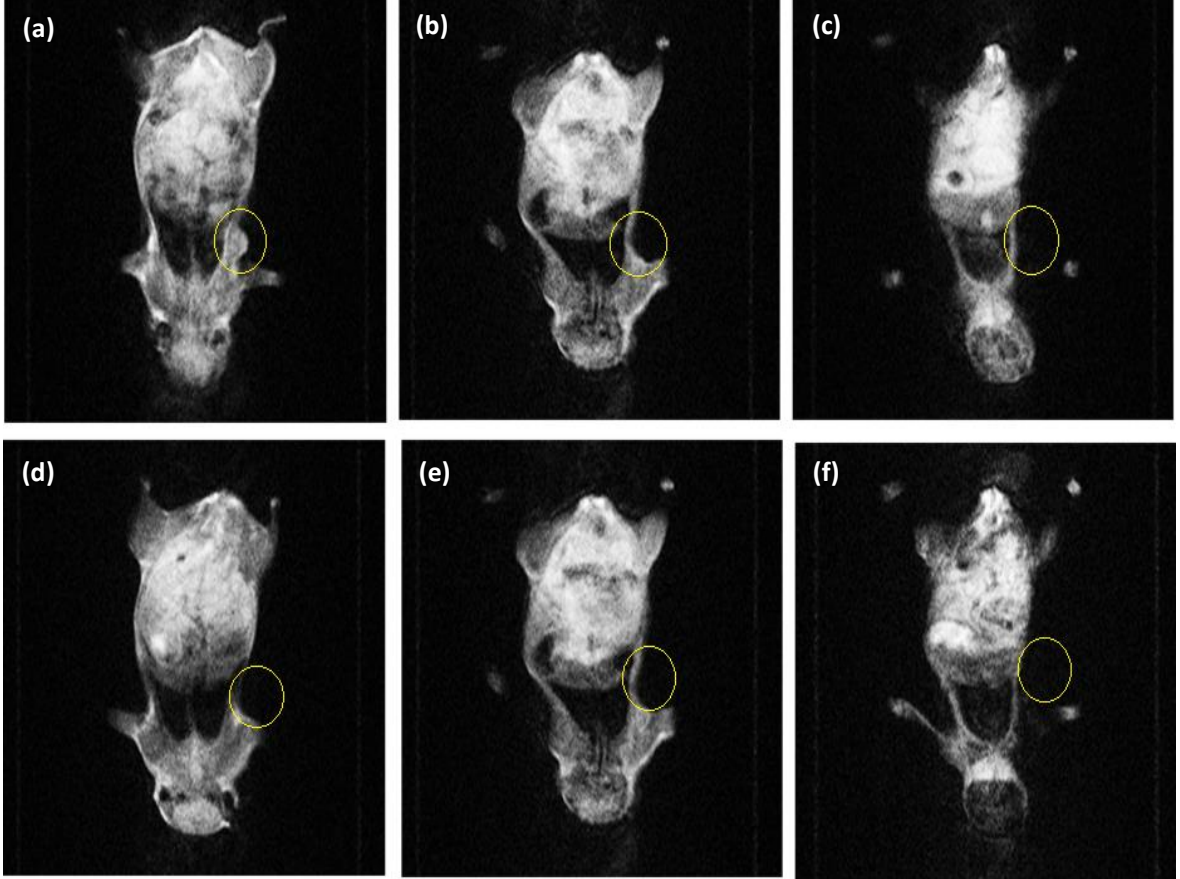
Nanopartiküllere immobilize edilen monoklonal antikor (MONOCLONAL ANTI-NCAM-OB11) MCF7 hücrelerinin üzerinde bulunan reseptörlere spesifik olarak bağlanır ve dolayısıyla altın kaplı manyetit nanopartiküller tümörde toplanır. Bu nedenle tümör siyah görülür.

İntra venöz olarak enjekte edilen grubun kontrol grubuna, altın kaplı manyetit nanopartikül enjekte edilmiştir (enjekte edilen nanopartiküllere antikor bağlı değil). Şekil 4.22'deki fotoğraflarda gösterildiği gibi; kanserli hücrelerin reseptörüne özel olarak bağlanan antikorların, nanopartiküllere immobilize olmadığından dolayı enjeksiyondan sonra MRI görüntüsü alındığında tümör rahatlıkla görülmektedir. Başka deyişle enjekte edilen nanopartiküller tümörde toplanmak yerine kan dolaşımı yoluyla vücutta dağıtılmıştır.



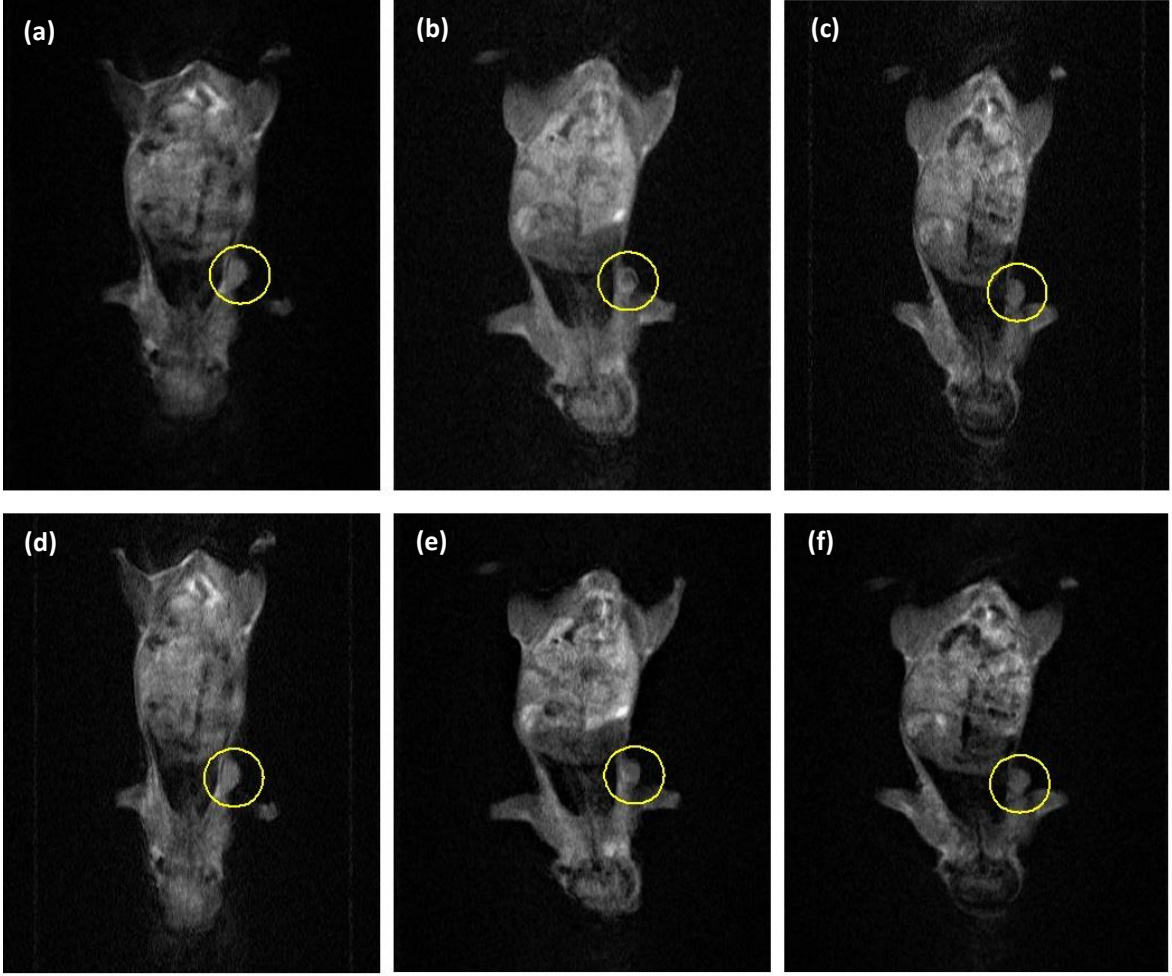
Şekil 4.22 İntra venöz grubunun kontrol grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a) Enjektenden hemen önce b) Enjektenden 2 saat sonra c) Enjektenden 4 saat sonra d) Enjektenden 8 saat sonra e) Enjektenden 12 saat sonra f) Enjektenden 24 saat sonra

Şekil 4.23'de görüldüğü gibi intra tümör grubunda nanopartiküller enjekte edildikten hemen sonra kanserli hücrelerin reseptörlerine bağlanmaya başlar ve toplu şekilde tümörün içinde kalır. Bu yüzden 2 saat sonra MRI görüntüsü alındığında tümör siyah olarak görülmektedir. MRI (Manyetik rezonans görüntüleme) görüntüsü 24 saat içinde tekrarlandığında nanopartiküllerin tümör bölgesinde olduğu görünmektedir.



Şekil 4.23 İntra tümör grubuna antikor bağlı nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a) Enjektenden hemen önce b) Enjektenden 2 saat sonra c) Enjektenden 4 saat sonra d) Enjektenden 8 saat sonra e) Enjektenden 12 saat sonra f) Enjektenden 24 saat sonra

İntra tümör olarak enjekte edilen grubun kontrol grubuna, altın kaplı manyetit nanopartikül (antikor bağlı değil) enjekte edilmiştir. Şekil 4.24'deki fotoğraflarda gösterildiği gibi; aynı intra venöz grubunun kontrol grubu gibi altın kaplı manyetit nanopartiküller kanserli hücrelere bağlanmadığından dolayı tümör içinde kalmak yerine kan dolaşımı ile vücutte dağıtılmıştır.



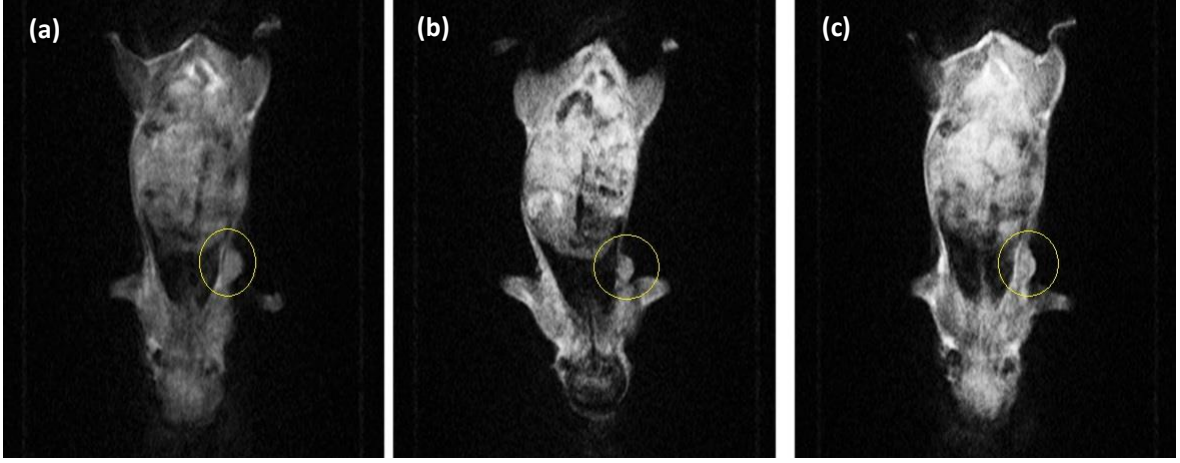
Şekil 4.24 İntra tümör grubunun kontrol grubuna nanopartikül enjekte edildikten sonra MRI görüntüsü a) Enjekteden hemen önce b) Enjekteden 2 saat sonra c) Enjekteden 4 saat sonra d) Enjekteden 8 saat sonra e) Enjekteden 12 saat sonra f) Enjekteden 24 saat sonra

MRI görüntülerinden elde edilen sonuçlar, tasarlayıp sentezlediğimiz antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartiküllerin başarılı bir şekilde kanserli hücrelere bağlanıp tümöre toplandıklarını göstermektedir.

4.10.1. Nanopartikül Enjekte Edilen Farelere Radyo Frekans Uygulama

Hayvan modeli çalışmalarında da aynı in-vitro çalışmaları gibi RF hipertermisi (144.015 MHz, 120 W, 50 dk.) uygulanmıştır. İntra tümör ve intra venöz grubundaki nude farelere radyo frekans uygulaması yapıldıktan sonra 1, 2 ve 3. haftaların sonunda tekrar MRI görüntüsü alındı ve tümör boyutları incelenmiştir.

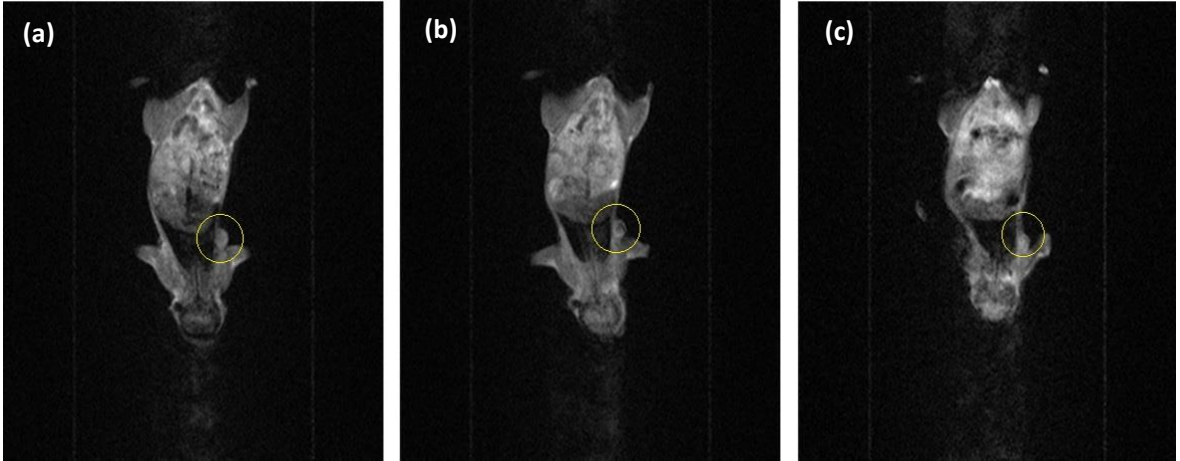
Birinci, ikinci ve üçüncü haftaların sonunda intra venöz grubundaki farelerin MRI görüntüsü şekil 4.25'de verilmektedir.



Şekil 4.25 İntra venöz enjeksiyon grubunun RF uygulamasından sonra MRI görüntülemesi a) bir hafta sonra b) 2 hafta sonra c) 3 hafta sonra

Şekil 4.25’de gözlemlendiği gibi intra venöz grubundaki farelere RF uygulandıktan sonra 3 hafta sonunda tümör büyümemekte ve aksine tümör boyutunda küçülme olmaktadır. Bunun nedeni RF hipertermi sonucu kanserli hücrelerin apoptoz ve nekroza uğramasıdır.

Şekil 4.26’de RF hipertermi uygulandıktan sonra birinci, ikinci ve üçüncü haftanın sonunda intra tümör grubundaki farelerin MRI görüntüsü verilmektedir.



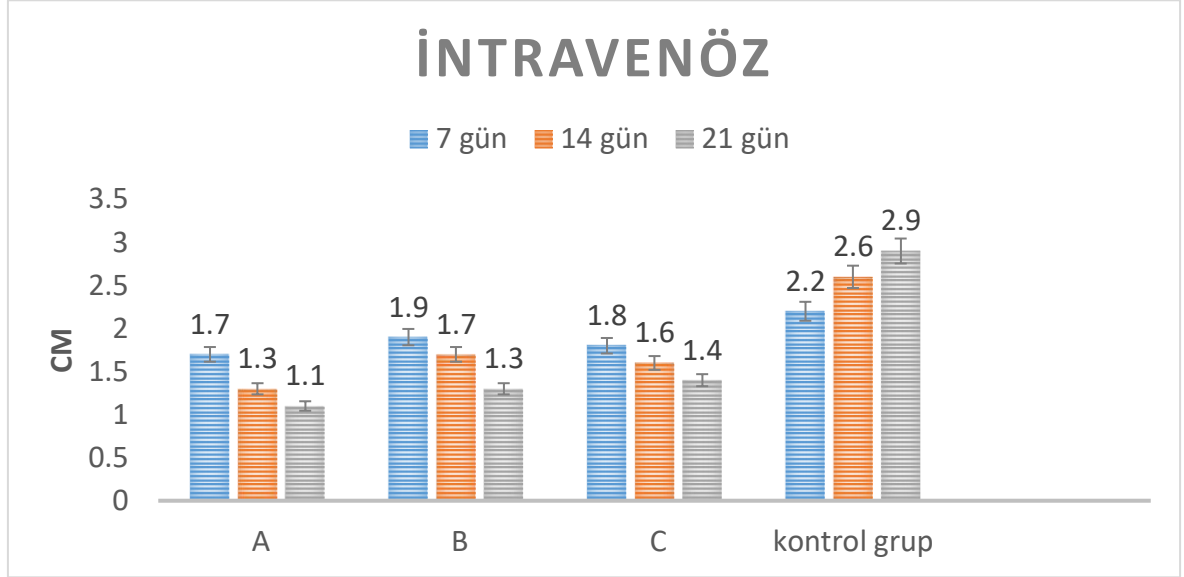
Şekil 4.26 İntra tümör enjeksiyon grubunun RF uygulamasından sonra MRI görüntülemesi a) Bir hafta sonra b) 2 hafta sonra c) 3 hafta sonra

Şekil 4.26’de görüldüğü gibi aynı intra venöz grubundaki fareler şeklinde intra tümör grubunda da tümör büyümenin aksine küçülmektedir.

Radyo frekans hipertermi uygulama sonrası intra venöz grubunda tümör boyutları düzenli olarak kontrol edilmiştir. Bu gruptaki farelerin tümörlerinde küçülme miktarı çizelge 4.8’de verilmektedir. (Şekil 4.27)

Çizelge 4.8 İntra venöz grubunda tümör boyutunda küçülme miktarı

	7. gün	14. gün	21. gün	STDEV.S
A	1.7 cm	1.3 cm	1.1 cm	0,249444
B	1.9 cm	1.7 cm	1.3 cm	0,249444
C	1.8 cm	1.6 cm	1.4 cm	0,163299
Kontrol Grubu	2.2 cm	2.6 cm	2.9 cm	0,286744



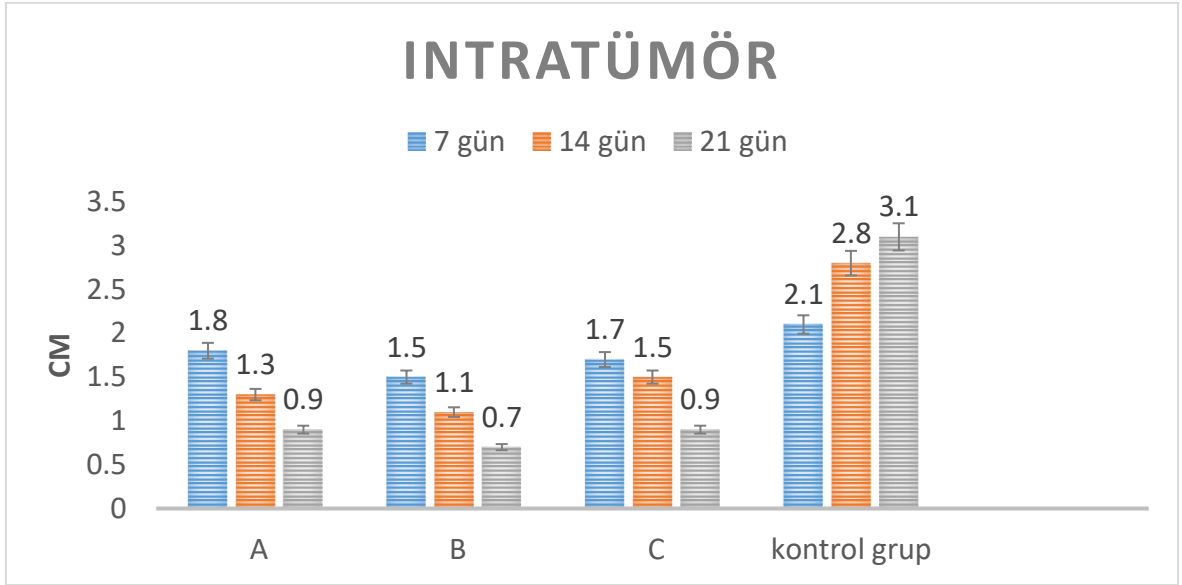
Şekil 4.27 RF uygulama sonrası intra venöz grubun verileri

İntra venöz grubundaki farelerin tümör boyutları incelendiğinde, radyo frekans hipertermi sonrası üçüncü hafta sonunda tümör boyutlarında yaklaşık % 34 küçülme gözlenmektedir. Radyo frekans uygulandığında altın kaplı manyetit nanopartiküller titreşmeye başlar ve bu titreşme sonucu dokunun sıcaklığı vücudun normal seviyesinin (37° C) üstüne çıkmaktadır. RF uygulamasında 120 W çıkış gücünde 50 dakikanın sonunda doku sıcaklığı yaklaşık 45.2° C’de kadar ısınmaktadır. Bu olağanüstü ısınma sonucu kanserli hücreler apoptoz ve nekroza doğru hareket etmektedir.

RF uygulama sonrası intra tümör grubunda tümör boyutları devamlı olarak kontrol edilmiştir. Tümör boyutundaki küçülme miktarı çizelge 4.9'de verilmektedir. (Şekil 4.28)

Çizelge 4.9 İntra tümör grubundaki farelerin tümör boyutlarında küçülme miktarı

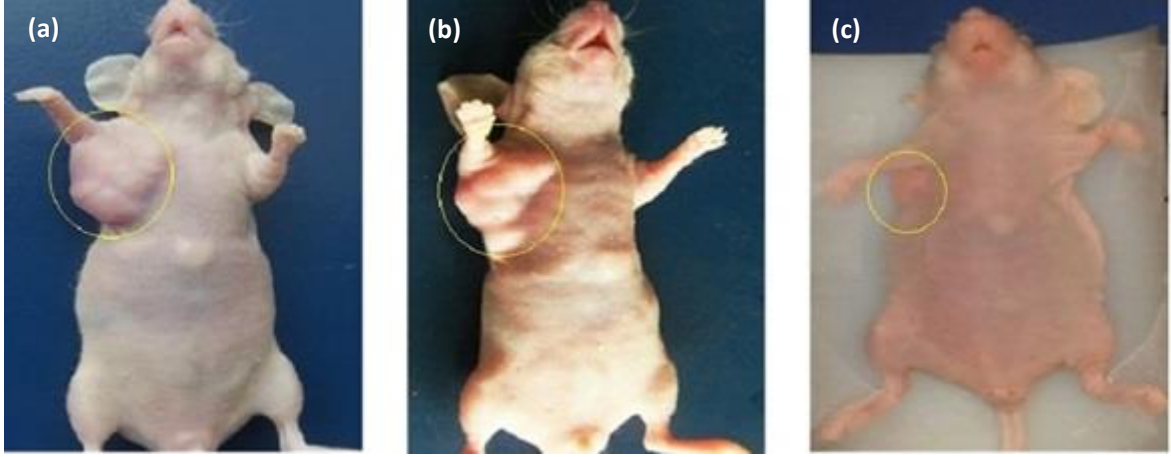
	7. gün	14. gün	21. gün	STDEV.S
A	1.8 cm	1.3 cm	0.9 cm	0,368179
B	1.5 cm	1.1 cm	0.7 cm	0,326599
C	1.7 cm	1.5 cm	0.9 cm	0,339935
Kontrol Grubu	2.1 cm	2.8 cm	3.1 cm	0,418994



Şekil 4.28 Radyo frekans hipertermi sonrası intra tümör gurubu verileri

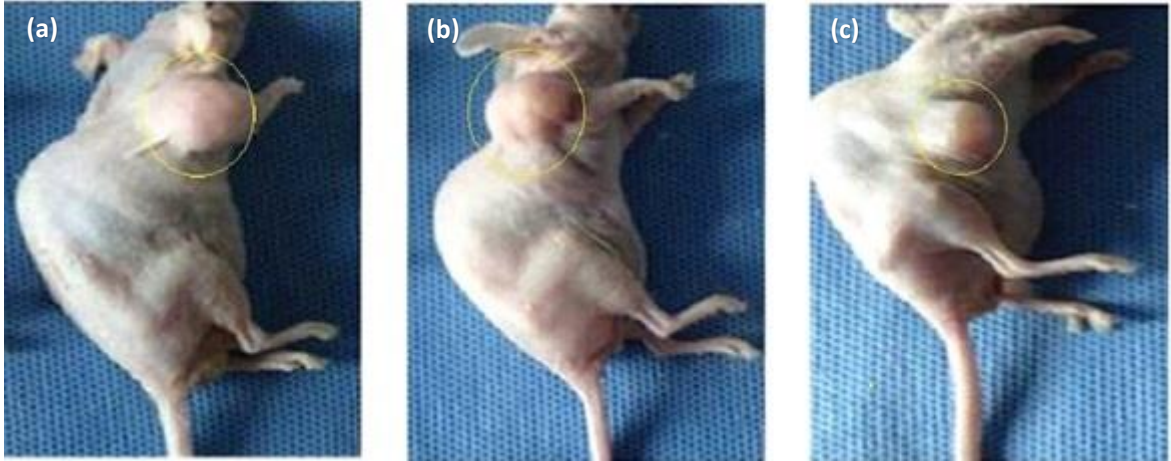
Şekil 4.28'deki veriler incelendiği zaman, RF hipertermi sonrası üçüncü hafta sonunda intra tümör grubundaki farelerin tümör boyutlarında yaklaşık % 53 küçülme kaydedilmektedir. Radyo frekans hipertermi sonucu kanserli hücreler apoptoz ve nekroza uğrayıp tümör boyutunun küçülmesi görülmektedir.

Şekil 4.29'de radyo frekans hipertermi ile tedavi edilen intra tümör grubundaki nude farelerin tedaviden sonra tümör boyutlarının küçülmesi gösterilmektedir.



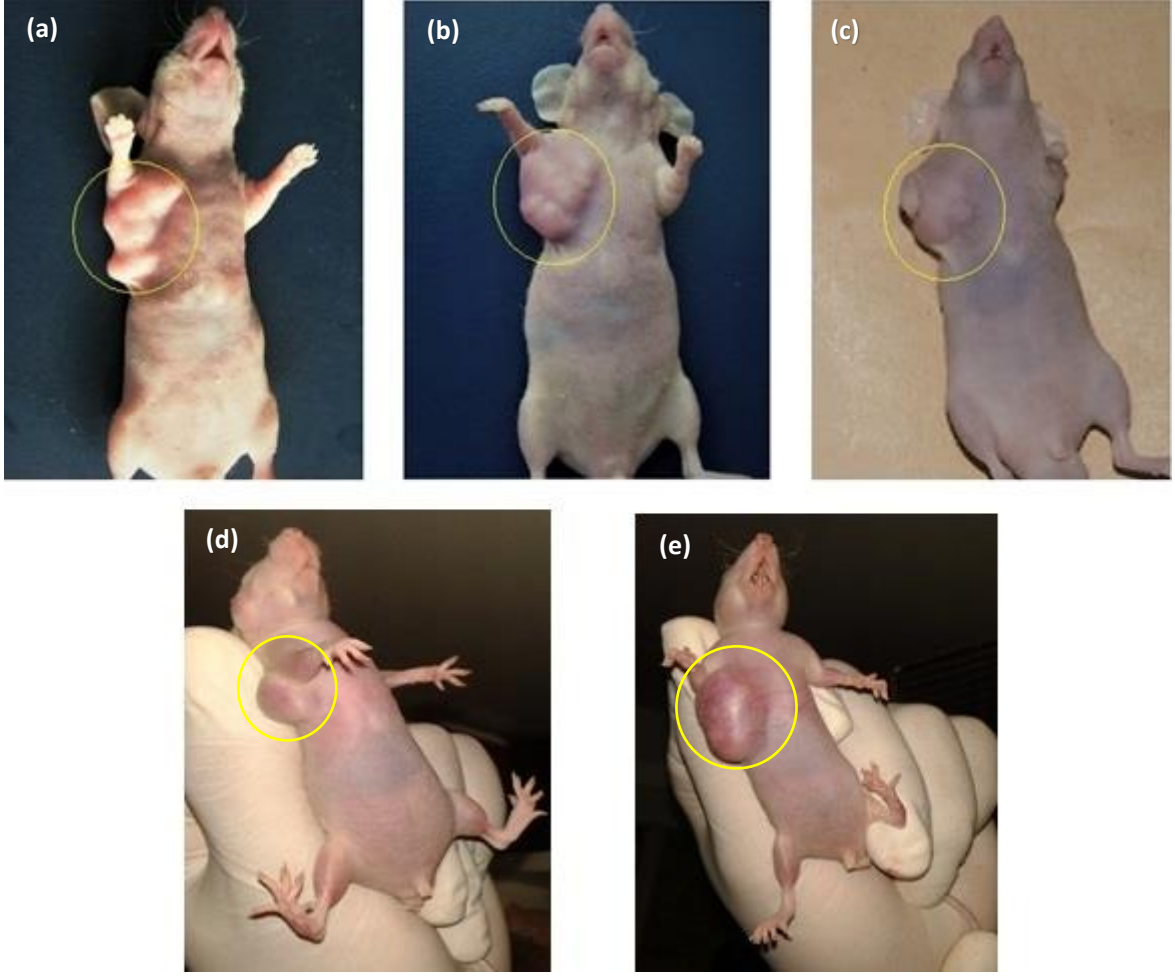
Şekil 4.29 RF uygulama sonrası farelerin fotoğrafı a) İntra tümör grubu RF'den hemen sonra b) İntra tümör grubu RF'den 1 hafta sonra c) İntra tümör grubu RF'den 3 hafta sonra

Şekil 4.30'de radyo frekans hipertermi ile tedavi edilen intra venöz grubundaki nude farelerin tedaviden sonra tümör boyutlarını gösterilmektedir.



Şekil 4.30 RF uygulama sonrası farelerin fotoğrafı a) İntra venöz grubu RF'den hemen sonra b) İntra venöz grubu RF'den 1 hafta sonra c) İntra venöz grubu RF'den 3 hafta sonra

Şekil 4.31'de her iki kontrol gurubundaki nude farelerin radyo frekans uygulama sonrası tümör boyutlarını gösterilmektedir.



Şekil 4.31 Kontrol grupları farelerin fotoğrafı a) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan hemen sonra b) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 1 hafta sonra c) 1. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 3 hafta sonra d) 2. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan hemen sonra e) 2. kontrol grubu nanopartikül enjeksiyonundan 3 hafta sonra

Şekil 4.29 ve 4.30'deki fotoğrafları karşılaştırdığımızda radyo frekans uygulama sonucu antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartikülleri tümör içine enjekte ettiğimiz zaman kanserli hücrelerde apoptoz ve nekroz oranı artmaktadır ve dolayısıyla intra tümör grubundaki farelerde tümör boyutu intra venöz grubundaki farelere nazaran daha küçülmektedir. Şekil 4.31'de gösterildiği gibi kontrol grubunda ise hiçbir tedavi uygulanmamasından dolayı tümör boyutu zamanla artmaktadır.

4.10.2. Tümörlerin Tedavi sonrası Histopatoloji Değerlendirmesi

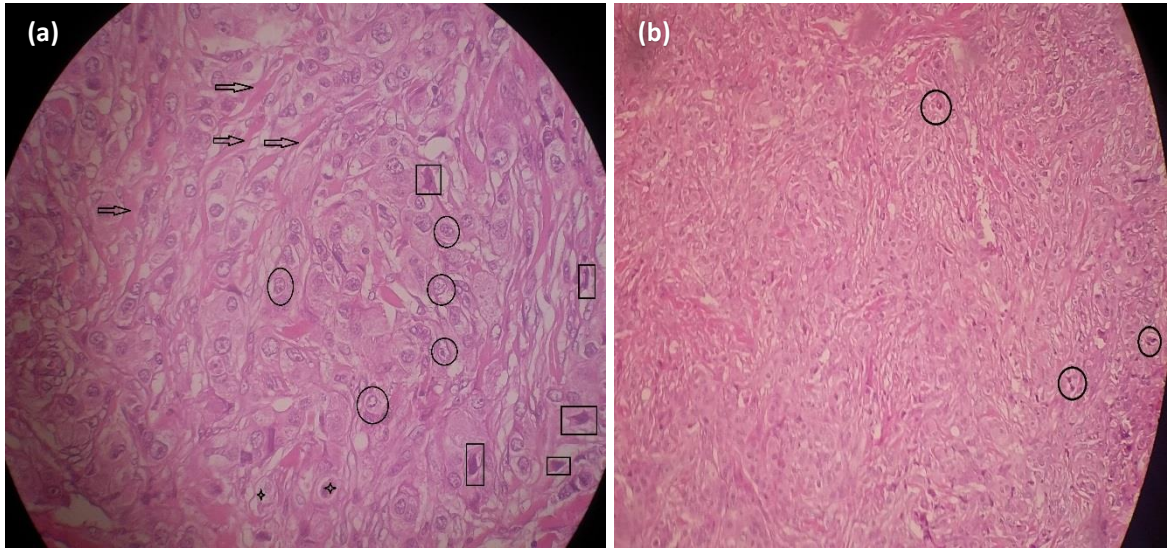
Histopatolojik ve histomorfolojik doku kesitleri, Urmia Üniversitesi, patoloji anabilim dalında hazırlanıp mikroskop görüntüleri alınmıştır. (Şekil 4.32)



Şekil 4.32 Mikrotom Cihazı

Alınan kodu kesitleri Hematoksilin/Eosin yöntemi ile boyanmış ve optik mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.33'de kontrol gruplarındaki farelerin tümörlerinden elde edilen doku kesitleri gösterilmektedir.

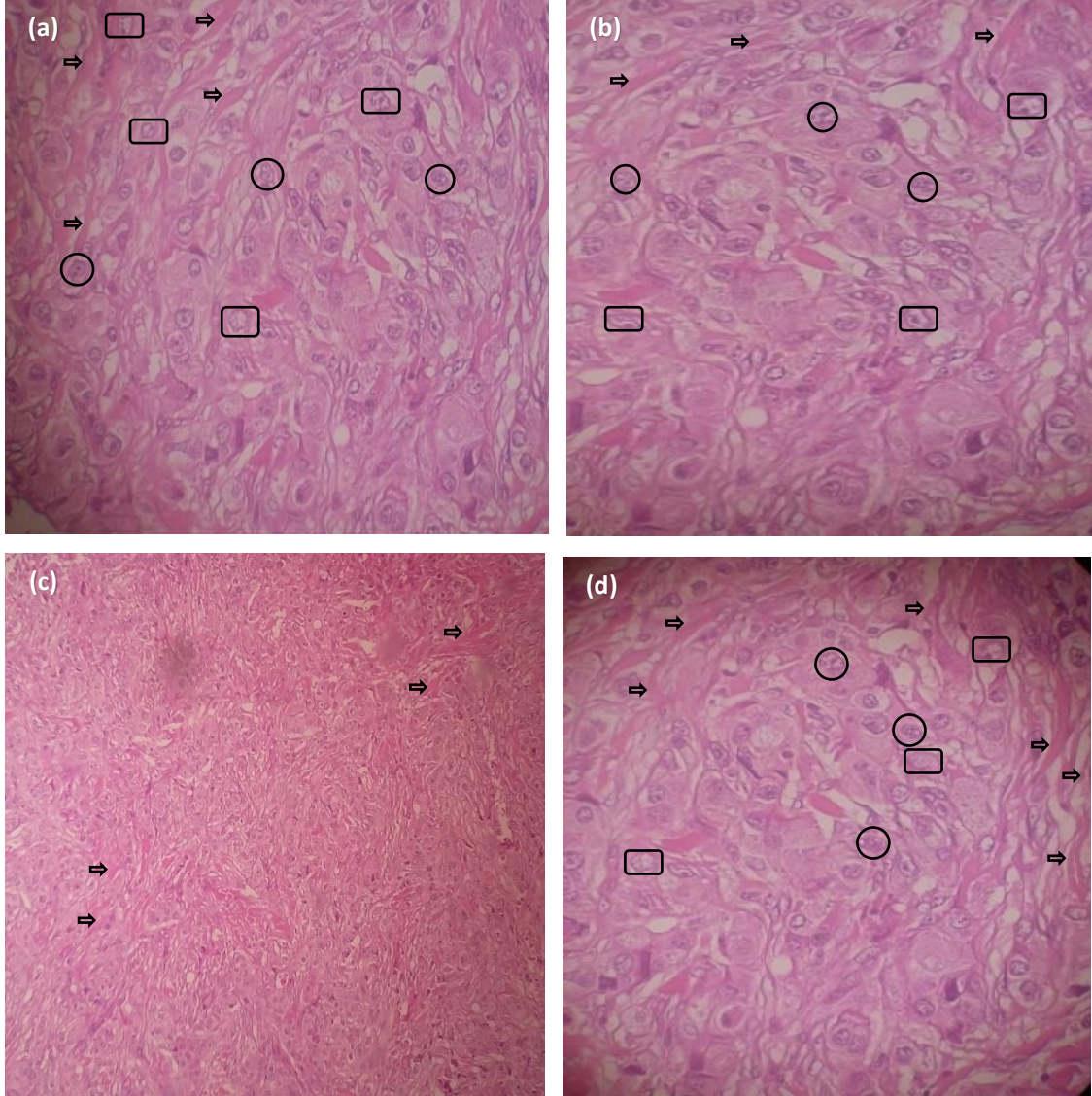


Şekil 4.33 Kontrol grupların histopatoloji mikroskopik görüntüleri

Şekil 4.33 a)'deki oklar, dokuda kollajen liflerinin birikimini göstermektedir, başka bir deyişle normal doku yerine bağ dokusu oluşmaktadır (Desmoplazi). Resimdeki halkalar, tümör hücrelerini göstermektedir. Tümör hücreleri yoğunlaşmış ve düzensiz bir şekilde, parçalanmış çekirdekleri ile resmin tamamında görünmektedir. Resimdeki küpler daha kötü huylu özelliklere sahip hücreyi temsil etmektedir.

Resimdeki yıldızlar ise makrofaq hücreleri göstermektedir. Şekil b)'deki çemberler mitotik bölünmeler varlığını göstermektedir ve bu tümör tespiti için pozitif bir indekstir.

Şekil 4.34'de RF hipertermi tedavi sonrası farelerin tümörlerinden elde edilen doku kesitleri gösterilmektedir.



Şekil 4.34 RF hipertermi tedavi sonrası tümörlerin histopatoloji mikroskopik görüntüleri (a,b intra tümör grubu ve c,d intra venöz grubu)

Şekil 4.34'de a),b) RF hipertermi tedavi sonrası intra tümör enjeksiyon grubun ve c),d) intra venöz grubun tümörlerinin histopatoloji mikroskopik görüntülerini göstermektedir. Resimlerdeki halkalar, tümör hücrelerini gösterir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör hücrelerin sayısı azalmaktadır. Ayrıca bazı yerlerde tümör

hücrelerin kalıntıları gözlenmektedir. Tedavi sonrası kanserli hücreler deforme olmuştur ve morfolojileri değişmiştir. Resimlerdeki dikdörtgenler histosit hücrelerini göstermektedir. Histiositler tedavi sonrası apoptoz ve nekroza uğrayan hücrelerin ortadan kaldırılma görevini yapmaktadır. Resimlerdeki oklar fibrotik dokuları göstermektedir. Fibröz doku oluşması, dokunun tamir edilmesi, harap olmuş dokunun yerine bağ dokusunun gelmesi ve tamir sürecine girmesi göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlar genel olarak aşağıda özetlenmiştir;

Çalışmanın birinci iş paketinin ilk aşamasında manyetit nanopartiküller ikili çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen manyetit nanopartiküller Zeta-sizer, Zeta-potansiyel, FTIR, TEM ve VSM kullanarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre, sentezlenen manyetit nanopartiküllerin ortalama boyutları 10-15 nm arasında, yüzey yüklerinin -18 mv ve 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı gösterdikleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1, şekil 4.4, şekil 4.7, şekil 4.11 ve şekil 4.12'de verilmiştir.

Çalışmanın birinci iş paketinin ikinci aşamasında sentezlenen manyetit nanopartiküller altın iyonları ile kaplanmıştır. Sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküller Zeta-sizer, Zeta-potansiyel, FTIR, TEM ve VSM kullanarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyondan elde edilen verilere göre altın kaplı manyetit nanopartiküllerin (Au@SPIONs) ortalama boyutları 20-30 nm arasında, yüzey yükleri -30 mv ve 10000 Gauss manyetik alanda 3 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı gösterdikleri ispatlanmıştır. Bulduğumuz veriler şekil 4.2, şekil 4.5, şekil 4.8, şekil 4.11 ve şekil 4.13'de verilmektedir.

Çalışmanın birinci iş paketinin üçüncü aşamasında sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin yüzeyine antikor bağlanması için yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Bu amaç için sisteamin molekülü (bir ucunda amin ve diğer ucunda tiyol grubu) seçilmiştir. Sisteamin molekülünün seçilmesinin nedeni, bu molekülün tiyol ucundan altın kaplı manyetit nanopartiküllere bağlanması ve amin ucunun antikorun karboksil ucu ile amit bağı oluşturabilme özelliğidir. Yüzeyi modifiye edilmiş altın kaplı manyetit nanopartiküller Zeta-sizer, Zeta-potansiyel ve FTIR kullanılarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonucu, sisteamin bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortalama boyutları 25-35 nm arasında ve yüzey yüklerinin -7 mv olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler şekil 4.3, şekil 4.6 ve şekil 4.9'de verilmiştir.

Tezin ikinci iş paketinin birinci aşamasında yüzeyi modifiye edilmiş altın kaplı manyetit nanopartiküllere monoklonal antikor (MONOCLONAL ANTI-N CAM Clone NCAM-OB11, Sigma-Aldrich) bağlanması için EDC/NHS yöntemi kullanılmıştır.

Antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartiküller elde edildikten sonra FTIR ve Ninhydrin test analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartiküllerin FTIR analizinde, 1660 cm^{-1} 'deki pik güçlü C=O bağına, 3280 cm^{-1} 'deki pik ikincil amin' in N-H bağına ve 1534 cm^{-1} ile 1660 cm^{-1} 'deki pikler sekonder ve primer amitlerin N-H bağına aittir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.10'de verilmektedir.

Antikor bağlanma aşamasının en önemli noktası monoklonal antikorların Au@SPIONs nanopartiküllere bağlanma oranıdır. Bağlanma oranının hesaplanması için antikor miktarı (10 $\mu\text{g/ml}$) sabit tutularak 4 farklı nanopartikül konsantrasyonu ile (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) işlem yapılmıştır. Daha sonra antikor-nanopartikül bağlanma oranının hesaplanması için Cobas Integra 400 plus cihazı kullanılmış ve böylece en yüksek antikor nanopartikül bağlanma oranı 20 $\mu\text{g/ml}$ olarak elde edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci iş paketinin ikinci aşamasında sentezlenen nanopartiküllerin toksisitesini belirlemek için sitotoksite analizi olarak MTT testi yapılmıştır. MTT testinde 3T3 hücreleri (standart fibroblast hücre hattı) kullanılmıştır. Nanopartiküller (altın kaplı ve antikor bağlı altın kaplı) (5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$) hücreler ile etkileştirilmiştir. 5 $\mu\text{g/ml}$ derişimde hücre canlılığı % 84, 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hücre canlılığı % 81, 20 $\mu\text{g/ml}$ derişimde hücre canlılığı % 75 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ nanopartikül konsantrasyonunda % 64 hücre canlılığı elde edilmiştir. Sonuç olarak deneylerde 20 $\mu\text{g/ml}$ nanopartikül konsantrasyonu kullanılmıştır.

Tez kapsamı çalışmalarının devamında RF (radyo frekans) hipertermi için RF düzeneği yapılmıştır. RF jeneratörünün tasarımı için çeşitli parçalar (5-200 W güç devresi, anten vb.) kombine edilmiştir. Anten model RF jeneratörü (144.015 MHz, 120 W) hazırlandıktan sonra RF hipertermi uygulaması için in-vitro ve in-vivo deneylerinde kullanılmıştır.

Tez çalışmalarının in-vitro kısmında MCF-7 hücreleri hazırlanmış antikor bağlı nanopartiküller ile etkileştirilip RF hipertermisi uygulanmıştır. Bunun için önceden iyi şartlar altında kültüre edilen MCF-7 hücrelerine örnekler (altın kaplı manyetit nanopartikül ve antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartikül) ilave edilmiştir. Bu aşamada antikor bağlı nanopartiküller 20 $\mu\text{g/ml}$ derişim ile iki gruptaki MCF-7 hücrelerine ilave edilip ve bir grupta RF jeneratörü 120 W çıkış gücünde ayarlanarak 50 dakika süre ile çalıştırılmıştır. Tüm gruptaki hücreler 48 saat inkübe edilip süre sonunda hücreler ikili apoptoz-nekroz boyama yöntemiyle boyanmış ve Floresan

mikroskofta DAPI filtresi kullanılarak görüntüleri alınıp hücreler sayılarak apoptoz, nekroz ve canlılık oranı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MCF-7 hücrelerine Au@SPIONs ilave ettiğimizde % 10.44 ± 0.89 apoptoz oranı gözlenmiştir. Hücrelere antikor immobilize altın kaplı manyetit nanopartikül ilave ettiğimiz zaman da % 9.23 ± 1.43 apoptoz oranı görülmektedir. MCF-7 hücrelerinde (antikor bağlı nanopartikül kullanıp RF hipertermi uygulandıktan sonra) % 58.7 ± 1.12 apoptoz oranı ve % 14.8 ± 1.63 nekroz oranı hesaplanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında radyo frekans hipertermi uygulandıktan sonra hücrelerin anlamlı ve yüksek miktarda apoptoza uğramaları, tasarlayıp sentezlediğimiz nanopartiküller ve kurduğumuz RF düzeneğinin başarılı olmasının ispatıdır ve dolayısıyla hayvan model çalışmalarına ışık tutmaktadır.

Tezin in-vivo çalışmaları kısmında ilk olarak nude farelerde tümör oluşturulmuştur. Bunun için MCF-7 hücreleri (meme kanser hücre hattı) farelerin karın kısmına enjekte edilip 3-4 hafta boyunca iyi şartlarda yetiştirilmiştir. Daha sonra nanopartiküller 2 grup şeklinde farelere (İntra Tümör / İntra Venöz) enjekte edilip, MRI görüntüleri alınmıştır. Sonuçlara göre intra tümör enjeksiyonundan sonra nanopartiküllerin kanserli hücrelere bağlanmasından dolayı MRI görüntülemeye tümör görüntüsü siyah olup 24 saat sonra (nanopartiküllerin tümörde toplu olduğundan dolayı) hala devam etmektedir. İntra venöz grubunda ise, enjeksiyondan 2 saat sonra nanopartiküller kan dolaşım sistemi yoluyla tümöre gelip kanserli hücrelere bağlanmaya başlar ve 4 saat sonra, nanopartiküller tümöre toplanıp kanserli hücrelere bağlanmış dolayısıyla tümör görüntüsü siyah olmaktadır.

Tezin in-vivo kısmının ikinci aşamasında tümörler üzerine RF jeneratörü 120 W çıkış gücünde ayarlanarak 50 dakika uygulanmış ve sonuçları incelemek için tümör boyutu ve görüntüsü (MRI görüntüsü) 3 hafta boyunca gözlenmiştir. Sonuçlara göre farelere intra venöz enjeksiyonundan sonra RF uygulandığında üçüncü hafta sonunda tümör boyutunda yaklaşık % 34 küçülme kaydedilmiştir. Farelere intra tümör enjeksiyonundan sonra RF hipertermi uygulandığında ise üçüncü hafta sonunda tümör boyutunda yaklaşık % 53 küçülme kaydedilmiştir. Tümör boyutlarındaki küçülmeler, RF hipertermi sonucu kanserli hücrelerin apoptoza uğramasından kaynaklanmaktadır. İntra tümör ve intra venöz grupların arasındaki fark (tümör boyutu küçülme oranı), nanopartiküllerin damar yoluyla enjekte edildikten sonra kan dolaşım sistemi ile vücudun tüm organlarını dolaşmasından

dolayı kandaki konsantrasyonu azalır ve bu nedenle kan dolaşım sistemi ile intra tümör enjeksiyon grubuna nazaran daha az miktarda nanopartikül tümöre toplanmaktadır.

Tez çalışmalarının devamında tümör dokusundan (kontrol grubu ve tedavi edilen gruplar) kesitler alınıp histopatoloji değerlendirilmesi yapılmıştır. Kontrol grupların doku kesitlerinde tümör hücreleri yoğunlaşmış ve düzensiz bir şekilde, parçalanmış çekirdekleri ile görülebilmektedir. Bu kesitlerde mitotik bölünmeler tesbit edilmektedir. Tedavi edilen gruplarda kontrol gruplarına nazaran tümör hücrelerin sayısı azalmaktadır. Tedavi sonrası kanserli hücreler, deforme olmuş morfolojileri değişmektedir. Kesitlerde histosit hücreleri ve fibrotik dokular görülmektedir. Fibrotik dokular dokunun tamir edilmesi, harap olmuş dokunun yerine bağ dokusunun gelmesi ve tamir sürecine girmesi göstermektedir. Sonuç olarak bu tez çalışmasının en önemli orijinalliği bizim tasarlayıp sentezlediğimiz antikor bağlı altın kaplı manyetit nanopartiküllerin başarılı bir şekilde tümör hücrelerine bağlanması ve RF hipertermi sonucu kanserli hücreler apoptoz-nekroza uğrayarak tümör boyutunda küçülme kaydedilmesidir. Bu çalışmanın ileride insandaki kanser tedavisine ışık tutması ön görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Torpy, J.M., Lymn, C., Glass, R.M., JAMA patient page. Cancer: the basics, *JAMA*, 304, 1628, **2010**.
- [2] Statistics, C.C., Leading Causes of Death Total Population by Age Group and Sex, *Canadian Cancer Society*, **2012**.
- [3] Feldman, R.P., Goodrich, J.T., The Edwin Smith Surgical Papyrus, *Childs Nerv Syst*, 15, 281-4, **1999**.
- [4] Atta, H.M., Edwin Smith Surgical Papyrus: the oldest known surgical treatise, *Am Surg*, 65, 1190-2, **1999**.
- [5] Dickson, J.A., Hyperthermia in the treatment of cancer, *Lancet*, 1, 202-5, **1979**.
- [6] Quinto, C.A., Mohindra, P., Tong, S., Bao, G., Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment, *Nanoscale*, 7, 12728-36, **2015**.
- [7] Gilchrist, R.K., Medal, R., Shorey, W.D., Hanselman, R.C., Parrott, J.C., Taylor, C.B., Selective Inductive Heating of Lymph Nodes, *Annals of Surgery*, 146, 596-606, **1957**.
- [8] Choi, C.H., Zuckerman, J.E., Webster, P., Davis, M.E., Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6656-61, **2011**.
- [9] Adams, C., Torode, J., Henshall, S., Cazap, E., Ryel, A.L., Grey, N., The World Cancer Declaration: from resolution to action, *Lancet Oncol*, 12, 1091-2, **2011**.
- [10] Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Cancer statistics, 2012, *CA Cancer J Clin*, 62, 10-29, **2012**.
- [11] Herceg, Z., Hainaut, P., Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis, *Mol Oncol*, 1, 26-41, **2007**.
- [12] Sudhakar, A., History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, *J Cancer Sci Ther*, 1, 1-4, **2009**.
- [13] Harrison, G.G., Saunders, S.J., Biebuyck, J.F., Hickman, R., Dent, D.M., Weaver, V., Terblanche, J., Anaesthetic-induced malignant hyperpyrexia and a method for its prediction, *Br J Anaesth*, 41, 844-55, **1969**.

- [14] Day, E.S., Morton, J.G., West, J.L., Nanoparticles for thermal cancer therapy, *J Biomech Eng*, 131, 074001, **2009**.
- [15] Meek, A.G., Breast radiotherapy and lymphedema, *Cancer*, 83, 2788-97, **1998**.
- [16] Nieder, C., Milas, L., Ang, K.K., Tissue tolerance to reirradiation, *Semin Radiat Oncol*, 10, 200-9, **2000**.
- [17] Smith, T.J., Khatcheressian, J., Review: chemotherapy and hormonal therapy reduce recurrence and mortality at 15 years in early breast cancer, *ACP J Club*, 143, 58, **2005**.
- [18] Gibson, F., Soanes, L., *Cancer in Children and Young People*, John Wiley & Sons, Ltd, **2008**.
- [19] Brown, K.S., Cancer in Children and Young People., *Oncology Nursing Forum*, 36, 365-365, **2009**.
- [20] Alexis, F., Rhee, J.W., Richie, J.P., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., New frontiers in nanotechnology for cancer treatment, *Urol Oncol*, 26, 74-85, **2008**.
- [21] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nat Rev Cancer*, 5, 161-171, **2005**.
- [22] Whitesides, G.M., The 'right' size in nanobiotechnology, *Nat Biotechnol*, 21, 1161-5, **2003**.
- [23] LaVan, D.A., McGuire, T., Langer, R., Small-scale systems for in vivo drug delivery, *Nat Biotechnol*, 21, 1184-91, **2003**.
- [24] Farokhzad, O.C., Karp, J.M., Langer, R., Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting, *Expert Opin Drug Deliv*, 3, 311-24, **2006**.
- [25] Enderle, J., Bronzino, J., *Introduction to Biomedical Engineering*, ed. 3rd. **2011**.
- [26] Kumar, B., Yadav, P.R., Goel, H.C., Rizvi, M.M.A., Recent Developments in Cancer Therapy by the Use of Nanotechnology, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4, 51-57, **2009**.
- [27] Wang, X., Wang, Y., Chen, Z.G., Shin, D.M., Advances of cancer therapy by nanotechnology, *Cancer Res Treat*, 41, 1-11, **2009**.
- [28] Ehdai, B., Application of nanotechnology in cancer research: review of progress in the National Cancer Institute's Alliance for Nanotechnology, *Int J Biol Sci*, 3, 108-10, **2007**.

- [29] Alivisatos, P., The use of nanocrystals in biological detection, *Nature Biotechnology*, 22, 47-52, **2004**.
- [30] Alivisatos, A.P., Gu, W.W., Larabell, C., Quantum dots as cellular probes, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7, 55-76, **2005**.
- [31] Pinaud, F., Michalet, X., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Iyer, G., Weiss, S., Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes, *Biomaterials*, 27, 1679-87, **2006**.
- [32] Gao, X., Yang, L., Petros, J.A., Marshall, F.F., Simons, J.W., Nie, S., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Curr Opin Biotechnol*, 16, 63-72, **2005**.
- [33] Harisinghani, M.G., Barentsz, J., Hahn, P.F., Deserno, W.M., Tabatabaei, S., van de Kaa, C.H., de la Rosette, J., Weissleder, R., Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer, *N Engl J Med*, 348, 2491-9, **2003**.
- [34] Hood, J.D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R.A., Xiang, R., Cheresch, D.A., Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature, *Science*, 296, 2404-7, **2002**.
- [35] Auyang, Y.S., Cancer causes and cancer research on many levels of complexity, *creatingtechnology*, **2006**.
- [36] Wang, L.V., Ultrasound-mediated biophotonic imaging: a review of acousto-optical tomography and photo-acoustic tomography, *Dis Markers*, 19, 123-38, **2003**.
- [37] Singh, K.K., Nanotechnology in cancer detection and treatment, *Technol Cancer Res Treat*, 4, 583, **2005**.
- [38] Gültekin, M., Boztaş, G., Utku, E.Ş., Ergün, A.K., Sevinç, E.A., Tütüncü, S., Dündar, S., Seymen, E., Türkiye Kanser İstatistikleri, *Türkiye Birleşik Veri Tabanı*, 24-31, **2016**.
- [39] Ebbell, B., Banov, L., *The Papyrus Ebers : the greatest Egyptian medical document*, Oxford University Press: London: Levin & Munksgaard 135, **1937**.
- [40] Hilger, I., Fruhauf, K., Andra, W., Hiergeist, R., Hergt, R., Kaiser, W.A., Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology, *Acad Radiol*, 9, 198-202, **2002**.
- [41] Refaat, T., Sachdev, S., Sathiaselan, V., Helenowski, I., Abdelmoneim, S., Pierce, M.C., Woloschak, G., Small, W., Jr., Mittal, B., Kiel, K.D., Hyperthermia and radiation therapy for locally advanced or recurrent breast cancer, *Breast*, 24, 418-25, **2015**.

- [42] Zagar, T.M., Oleson, J.R., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., Craciunescu, O.I., Blackwell, K.L., Prosnitz, L.R., Jones, E.L., Hyperthermia for locally advanced breast cancer, *Int J Hyperthermia*, 26, 618-24, **2010**.
- [43] Oleson, J.R., Samulski, T.V., Leopold, K.A., Clegg, S.T., Dewhirst, M.W., Dodge, R.K., George, S.L., Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time: implications for thermal goals of treatment, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 25, 289-97, **1993**.
- [44] Field, S.B., Bleehen, N.M., Hyperthermia in the treatment of cancer, *Cancer Treat Rev*, 6, 63-94, **1979**.
- [45] Cheung, A.Y., Neyzari, A., Deep local hyperthermia for cancer therapy: external electromagnetic and ultrasound techniques, *Cancer Res*, 44, 4736s-4744s, **1984**.
- [46] Kremkau, F.W., Cancer therapy with ultrasound: a historical review, *J Clin Ultrasound*, 7, 287-300, **1979**.
- [47] Ishida, T., Kato, H., Miyakoshi, J., Furukawa, M., Ohsaki, S., Kano, E., Physical basis of RF hyperthermia for cancer therapy (1). Measurement for distribution in absorbed power from radiofrequency exposure in agar phantom, *J Radiat Res*, 21, 180-9, **1980**.
- [48] Raof, M., Cisneros, B.T., Corr, S.J., Palalon, F., Curley, S.A., Koshkina, N.V., Tumor selective hyperthermia induced by short-wave capacitively-coupled RF electric-fields, *PLoS One*, 8, e68506, **2013**.
- [49] Berns, M.W., Coffey, J., Wile, A.G., Laser photoradiation therapy of cancer: possible role of hyperthermia, *Lasers Surg Med*, 4, 87-92, **1984**.
- [50] Yakunin, A.N., Avetisyan, Y.A., Tuchin, V.V., Quantification of laser local hyperthermia induced by gold plasmonic nanoparticles, *J Biomed Opt*, 20, 051030, **2015**.
- [51] Nasser, B., Yilmaz, M., Turk, M., Kocum, I.C., Piskin, E., Antenna-type radiofrequency generator in nanoparticle-mediated hyperthermia, *Rsc Advances*, 6, 48427-48434, **2016**.
- [52] Bellizzi, G., Bucci, O.M., On the optimal choice of the exposure conditions and the nanoparticle features in magnetic nanoparticle hyperthermia, *International Journal of Hyperthermia*, 26, 389-403, **2010**.
- [53] Cherukuri, P., Glazer, E.S., Curley, S.A., Targeted hyperthermia using metal nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 339-345, **2010**.
- [54] Kim, D.H., Nikles, D.E., Brazel, C.S., Synthesis and Characterization of Multifunctional Chitosan- MnFe₂O₄ Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Drug Delivery, *Materials*, 3, 4051-4065, **2010**.

- [55] Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Lyer, S., [Nanomedicine : Magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia - new chances for cancer therapy], *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 53, 839-45, **2010**.
- [56] Johnson, R.H., Robinson, M.P., Preece, A.W., Green, J.L., Potheary, N.M., Railton, C.J., Effect of Frequency and Conductivity on Field Penetration of Electromagnetic Hyperthermia Applicators, *Physics in Medicine and Biology*, 38, 1023-1034, **1993**.
- [57] Moroz, P., Jones, S.K., Gray, B.N., Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions, *International Journal of Hyperthermia*, 18, 267-284, **2002**.
- [58] Moran, C.H., Wainerdi, S.M., Cherukuri, T.K., Kittrell, C., Wiley, B.J., Nicholas, N.W., Curley, S.A., Kanzius, J.S., Cherukuri, P., Size-Dependent Joule Heating of Gold Nanoparticles Using Capacitively Coupled Radiofrequency Fields, *Nano Research*, 2, 400-405, **2009**.
- [59] Liu, X.M., Chen, H.J., Chen, X.D., Parini, C., Wen, D.S., Low frequency heating of gold nanoparticle dispersions for non-invasive thermal therapies, *Nanoscale*, 4, 3945-3953, **2012**.
- [60] Tu, W.X., Denizot, B., Synthesis of small-sized rhenium sulfide colloidal nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 310, 167-170, **2007**.
- [61] Tartaj, P., Morales, M.D., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreno, T., Serna, C.J., The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36, R182-R197, **2003**.
- [62] Portet, D., Denizot, B., Rump, E., Lejeune, J.J., Jallet, P., Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents, *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, 37-42, **2001**.
- [63] Mullerschulte, D., Brunner, H., Novel Magnetic Microspheres on the Basis of Poly(Vinyl Alcohol) as Affinity Medium for Quantitative Detection of Glycated Hemoglobin, *Journal of Chromatography A*, 711, 53-60, **1995**.
- [64] Safarik, I., Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn Res Technol*, 2, 7, **2004**.
- [65] Xu, C.J., Xu, K.M., Gu, H.W., Zhong, X.F., Guo, Z.H., Zheng, R.K., Zhang, X.X., Xu, B., Nitrilotriacetic acid-modified magnetic nanoparticles as a general agent to bind histidine-tagged proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 3392-3393, **2004**.
- [66] Sun, H.W., Zhu, X.J., Zhang, L.Y., Zhang, Y., Wang, D.Q., Capture and release of genomic DNA by PEI modified Fe₃O₄/Au nanoparticles, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 30, 311-315, **2010**.

- [67] Miller, M.M., Prinz, G.A., Cheng, S.F., Bounnak, S., Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor, *Applied Physics Letters*, 81, 2211-2213, **2002**.
- [68] Jain, T.K., Morales, M.A., Sahoo, S.K., Leslie-Pelecky, D.L., Labhasetwar, V., Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents, *Molecular Pharmaceutics*, 2, 194-205, **2005**.
- [69] Guven, G.U., Lacin, N.T., Piskin, E., Monosize polycationic nanoparticles as non-viral vectors for gene transfer to HeLa cells, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 155-163, **2008**.
- [70] Muthana, M., Scott, S.D., Farrow, N., Morrow, F., Murdoch, C., Grubb, S., Brown, N., Dobson, J., Lewis, C.E., A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies, *Gene Therapy*, 15, 902-910, **2008**.
- [71] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chem Rev*, 108, 2064-110, **2008**.
- [72] Riffle, J.S., Rutnakornpituk, M., Lin-Gibson, S., Dailey, J.P., Harris, L.A., Magnetic nanostructured fluids., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 223, D38-D39, **2002**.
- [73] Vereda, F., Vicente, J., Hidalgo-Alvarez, R., Influence of a magnetic field on the formation of magnetite particles via two precipitation methods, *Langmuir*, 23, 3581-9, **2007**.
- [74] Baumgartner, J., Bertinetti, L., Widdrat, M., Hirt, A.M., Faivre, D., Formation of magnetite nanoparticles at low temperature: from superparamagnetic to stable single domain particles, *PLoS One*, 8, e57070, **2013**.
- [75] Kötz, R., Fannin, P.C., Trahms, L., Time domain study of Brownian and Néel relaxation in ferrofluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 149, 42-46, **1995**.
- [76] Batlle, X., Labarta, A., Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35, **2002**.
- [77] Chin, A.B., Yaacob, I.I., Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure, *Journal of Materials Processing Technology*, 191, 235-237, **2007**.
- [78] Basak, S., Chen, D.R., Biswas, P., Electro spray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law, *Chemical Engineering Science*, 62, 1263-1268, **2007**.

- [79] Albornoz, C., Jacobo, S.E., Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 305, 12-15, **2006**.
- [80] Kornak, R., Niznansky, D., Haimann, K., Tylus, W., Maurszewski, K., Synthesis of magnetic nanoparticles via the sol-gel technique, *Materials Science-Poland*, 23, 87-92, **2005**.
- [81] Salazar-Alvarez, G., Muhammed, M., Zagorodni, A.A., Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution, *Chemical Engineering Science*, 61, 4625-4633, **2006**.
- [82] Kim, E.H., Lee, H.S., Kwak, B.K., Kim, B.K., Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289, 328-330, **2005**.
- [83] Wu, W., He, Q.G., Chen, H., Tang, J.X., Nie, L.B., Sonochemical synthesis, structure and magnetic properties of air-stable Fe₃O₄/Au nanoparticles, *Nanotechnology*, 18, **2007**.
- [84] Wan, J.X., Chen, X.Y., Wang, Z.H., Yang, X.G., Qian, Y.T., A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods, *Journal of Crystal Growth*, 276, 571-576, **2005**.
- [85] Petcharoen, K., Sirivat, A., Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials*, 177, 421-427, **2012**.
- [86] Wu, S., Sun, A.Z., Zhai, F.Q., Wang, J., Xu, W.H., Zhang, Q., Volinsky, A.A., Fe₃O₄ magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation, *Materials Letters*, 65, 1882-1884, **2011**.
- [87] Sharifi, I., Shokrollahi, H., Doroodmand, M.M., Safi, R., Magnetic and structural studies on CoFe₂O₄ nanoparticles synthesized by co-precipitation, normal micelles and reverse micelles methods, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324, 1854-1861, **2012**.
- [88] Daniel, M.C., Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104, 293-346, **2004**.
- [89] Lee, S.H., Bae, K.H., Kim, S.H., Lee, K.R., Park, T.G., Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers, *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 94-101, **2008**.
- [90] Kim, J.H., Jang, H.H., Ryou, S.M., Kim, S., Bae, J., Lee, K., Han, M.S., A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA, *Chemical Communications*, 46, 4151-4153, **2010**.

- [91] Rink, J.S., McMahon, K.M., Chen, X.J., Mirkin, C.A., Thaxton, C.S., Kaufman, D.B., Transfection of pancreatic islets using polyvalent DNA-functionalized gold nanoparticles, *Surgery*, 148, 335-345, **2010**.
- [92] Wang, F., Wang, Y.C., Dou, S., Xiong, M.H., Sun, T.M., Wang, J., Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells, *Acs Nano*, 5, 3679-3692, **2011**.
- [93] Dreaden, E.C., Austin, L.A., Mackey, M.A., El-Sayed, M.A., Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery, *Ther Deliv*, 3, 457-78, **2012**.
- [94] Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C., Tsai, T., Chang, J., Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy, *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 6, 172-178, **2014**.
- [95] Li, X., Li, G., Yang, M., Chen, L.C., Xiong, X.L., Gold nanoparticle based signal enhancement liquid crystal biosensors for tyrosine assays, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 215, 152-158, **2015**.
- [96] Li, Y.Y., Schluesener, H.J., Xu, S.Q., Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bulletin*, 43, 29-41, **2010**.
- [97] Elghanian, R., Storhoff, J.J., Mucic, R.C., Letsinger, R.L., Mirkin, C.A., Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science*, 277, 1078-1081, **1997**.
- [98] Liu, D.B., Wang, Z., Jiang, X.Y., Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules, *Nanoscale*, 3, 1421-1433, **2011**.
- [99] Jans, H., Huo, Q., Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis, *Chemical Society Reviews*, 41, 2849-2866, **2012**.
- [100] Zhang, F.X., Han, L., Israel, L.B., Daras, J.G., Maye, M.M., Ly, N.K., Zhong, C.J., Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles, *Analyst*, 127, 462-465, **2002**.
- [101] Bai, Y., Yang, H., Yang, W.W., Li, Y.C., Sun, C.Q., Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 124, 179-186, **2007**.
- [102] Mahmoud, K.A., Male, K.B., Hrapovic, S., Luong, J.H.T., Cellulose Nanocrystal/Gold Nanoparticle Composite as a Matrix for Enzyme Immobilization, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 1, 1383-1386, **2009**.

- [103] Parolo, C., de la Escosura-Muniz, A., Merkoci, A., Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes, *Biosensors & Bioelectronics*, 40, 412-416, **2013**.
- [104] Tang, J.A., Tang, D.P., Su, B.L., Huang, J.X., Qiu, B., Chen, G.N., Enzyme-free electrochemical immunoassay with catalytic reduction of p-nitrophenol and recycling of p-aminophenol using gold nanoparticles-coated carbon nanotubes as nanocatalysts, *Biosensors & Bioelectronics*, 26, 3219-3226, **2011**.
- [105] Thanh, N.T.K., Rosenzweig, Z., Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 74, 1624-1628, **2002**.
- [106] Dykman, L., Khlebtsov, N., Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chemical Society Reviews*, 41, 2256-2282, **2012**.
- [107] Kesanli, B., Cui, Y., Smith, M.R., Bittner, E.W., Bockrath, B.C., Lin, W.B., Highly interpenetrated metal-organic frameworks for hydrogen storage, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44, 72-75, **2005**.
- [108] Loo, C., Lin, A., Hirsch, L., Lee, M.H., Barton, J., Halas, N., West, J., Drezek, R., Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer, *Technol Cancer Res Treat*, 3, 33-40, **2004**.
- [109] Tan, G., Onur, M.A., Saglam, N., Utilization of gold nanostructures in biomedical applications, *Turkish Journal of Biology*, 36, 607-621, **2012**.
- [110] Tan, G., Onur, M.A., Saglam, N., Nano Gold and Biomedicine: Scientific Letter, *Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi*, 32, 499-506, **2012**.
- [111] Janeway, C.A., How the immune system protects the host from infection, *Microbes and Infection*, 3, 1167-1171, **2001**.
- [112] Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M.E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L.R., Lebrilla, C.B., Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review, *Journal of Autoimmunity*, 57, 1-13, **2015**.
- [113] Breedveld, F.C., Therapeutic monoclonal antibodies, *Lancet*, 355, 735-740, **2000**.
- [114] Iwama, I., Kagimoto, S., Anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy for intestinal Behcet disease in an adolescent, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 53, 686-8, **2011**.
- [115] Carter, P., Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies, *Nature Reviews Cancer*, 1, 118-129, **2001**.

- [116] Fedyanin, M., Polyanskaya, E., Sekhina, O., Tryakin, A., Tjulandin, S., A population study of correlation between the treatment rate for monoclonal antibodies (Mabs) and mortality rate in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in Russia, *Annals of Oncology*, 27, 15-15, **2016**.
- [117] Zacharovova, K., Berkova, Z., Girman, P., Koblas, T., Pektorova, L., Dovolilova, E., Vancova, M., Nebesarova, J., Saudek, F., Transmission electron microscopy of islets labeled with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging, *Xenotransplantation*, 14, 503-503, **2007**.
- [118] Akhtar, S., Stromberg, M., de la Torre, T.Z.G., Russell, C., Gunnarsson, K., Nilsson, M., Svedlindh, P., Stromme, M., Leifer, K., Real-Space Transmission Electron: Microscopy Investigations of Attachment of Functionalized Magnetic Nanoparticles to DNA-Coils Acting as a Biosensor, *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 13255-13262, **2010**.
- [119] Shanavas, A., Sasidharan, S., Bahadur, D., Srivastava, R., Magnetic core-shell hybrid nanoparticles for receptor targeted anti-cancer therapy and magnetic resonance imaging, *Journal of Colloid and Interface Science*, 486, 112-120, **2017**.
- [120] Gogola, D., Strbak, O., Krafcik, A., Skratek, M., Frollo, I., Magnetic resonance imaging of the static magnetic field distortion caused by magnetic nanoparticles: Simulation and experimental verification, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 261-265, **2015**.
- [121] Sharma, A., Matharu, Z., Sumana, G., Solanki, P.R., Kim, C.G., Malhotra, B.D., Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection, *Thin Solid Films*, 519, 1213-1218, **2010**.
- [122] Vrana, N.E., Builles, N., Kocak, H., Gulay, P., Justin, V., Malbouyres, A., Ruggiero, F., Damour, O., Hasirci, V., EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 18, 1527-1545, **2007**.
- [123] Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, **1983**.
- [124] Slaoui, M., Fiette, L., Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation, *Methods Mol Biol*, 691, 69-82, **2011**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Reza DIDARIAN

Doğum Yeri : Oroumieh-IRAN

Medeni Hali : Evli

E-posta : didarian.reza@hacettepe.edu.tr , rd.ir.tr@gmail.com

Adresi : 4/5 Meriç sokak, Beştepe, Yenimahalle, Ankara

Eğitim

Lise : Shahed

Lisans : --

Yüksek Lisans: 1997-2003 Doctor of Veterinary Medicine Azad University of Urmia

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İyi)

İş Deneyimi

12 Yıl

Deneyim Alanları

Hücre Kültür Uygulamaları, Hayvan Deneşleri, İlaç Tedavisi, Nanopartikül Sentezi, Hipertermi,

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

1- R. DIDARIAN, E. BISKIN. Design and Production of Gold-Coated Magnetic Nanoparticles for Imaging and Annihilating the Tumor Cells. ICNN 2014: International Conference on Nanotechnology and Nanomedicine Prague, Czech Republic, 2014.

2- R. DIDARIAN, M. T. AZAR and N. SAGLAM. Devise and manufacture of cysteamine functionalized-gold nanoparticles for detecting and expunging the tumor cells. 5th World Congress on Biotechnology, Valencia, Spain, 2014.

3- R. DIDARIAN, E. BİŞKİN. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Sentezi, Yüzey Modifikasyonu ve Antikor İmmobilizasyonu. NANOTR 10, İstanbul, Türkiye, 2014.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 13/04/2017

Tez Başlığı / Konusu: **Antikor Taşıyan Nanopartiküller Kullanarak Hipertermi ile Tümör Dokusunun Tedavisi**

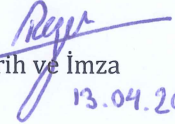
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 77 sayfalık kısmına ilişkin, 09/03/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

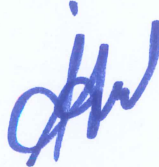
Gereğini saygularıyla arz ederim.


Tarih ve İmza
13.04.2017

Adı Soyadı: Reza Didarian
Öğrenci No: N09240856
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Programı: Birinci Öğretim Nanoteknoloji ve Nanotıp
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Prof. Dr. İBRAHİM VARGEL

(Unvan, Ad Soyad, İmza)